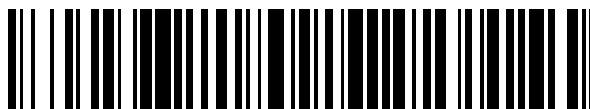


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 885 245**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2015** **E 19179287 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.05.2021** **EP 3608334**

54 Título: **Proteínas de fusión TATk-CDKL5, composiciones, formulaciones y uso de estas**

30 Prioridad:

28.02.2014 US 201461946280 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.12.2021

73 Titular/es:

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI
BOLOGNA (100.0%)
Via Zamboni, 33
Bologna, IT**

72 Inventor/es:

**CIANI, ELISABETTA y
LACCONE, FRANCO**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 885 245 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión TATk-CDKL5, composiciones, formulaciones y uso de estas

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de EE.UU. con número de serie 61/946.280, presentada el 28 de febrero de 2014, que tiene el título "PROTEÍNAS DE FUSIÓN TATk-CDKL5, COMPOSICIONES, FORMULACIONES Y SUS METODOS DE FABRICACIÓN Y METODOS DE USO", cuya descripción se incorpora a la presente memoria en su totalidad.

Listado(s) de secuencias

- 10 Esta solicitud contiene un listado de secuencias presentada en formato electrónico como un fichero ASCII.txt titulado 02158765.txt, creada el 27 de febrero de 2015 y que tiene un tamaño de 84.059 bytes. El contenido del listado de secuencias se incorpora a la presente memoria en su totalidad.

Antecedentes

- 15 La mutación/deficiencia de cinasa dependiente de ciclina 5 (CDKL5, por sus siglas en inglés), también denominada síndrome de Rett atípico, es un trastorno neurológico posnatal debilitante presente en todo el mundo en 1 de cada 17000 a 38000 nacimientos de mujeres. Existen también hombres afectados, pero con menor incidencia. Este trastorno no se limita al origen étnico o racial. Los síntomas de mutación/deficiencia de CDKL5 varían de leves a graves y se presentan como crisis epiléptica de aparición temprana, discapacidad cognitiva, hipotonía, así como alteraciones neurovegetativas, del sueño y gastrointestinales. Los síntomas de la enfermedad resultan de la deficiencia de una proteína CDKL5 funcional.

- 20 Las mutaciones en el gen CDKL5 ligadas a X o las deficiencias de la proteína CDKL5 en individuos intervienen en el desarrollo del síndrome de Rett atípico o congénito. Véase Bertani et al., J. biol. Chem. 2006, 281:32048-320 56, Scala et al., J. Med. Gen., 2005. 42:103-107 y Kalscheuer et al., Am. J. Hum. Genet. 2003. 72:1401-1411. El gen CDKL5 se ubica en el cromosoma X y codifica una proteína que es esencial para el desarrollo y el funcionamiento normal del cerebro. La proteína CDKL5 es una proteína multifuncional que tiene múltiples efectos en una célula neuronal. Por ejemplo, CDKL5 puede actuar como una cinasa y fosforilar MeCP2. Las niñas que padecen mutaciones o deficiencias de CDKL5 típicamente tienen antecedentes prenatales normales; irritabilidad y somnolencia en el período perinatal; epilepsia de aparición temprana con aparición antes de los 5 meses, características similares a Rett, incluida la desaceleración del crecimiento de la cabeza, estereotipos, escaso a nulo uso voluntario de las manos y alteraciones del sueño y retardo mental grave con escaso contacto visual y prácticamente nulo uso de lenguaje. Ver Bahi-Buisson and Bienvenu. 2012. Mol. Syndromol. 2:137-152.

Los tratamientos actuales para las mutaciones/deficiencias de CDKL5 se centran principalmente en tratar los síntomas. Sin embargo, no existen actualmente tratamientos para mejorar la respuesta neurológica de los sujetos con mutaciones o deficiencias de CDKL5. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar terapias para tratar las mutaciones y deficiencias de CDKL5.

- 35 Compendio

- En la presente memoria se describen proteínas de fusión que tienen una secuencia polipeptídica de CDKL5, en donde la secuencia polipeptídica de CDKL5 tiene aproximadamente 50 % a 100 % de identidad de secuencia con respecto a SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO: 16, y una secuencia polipeptídica de TATk, en donde la secuencia polipeptídica de TATk tiene aproximadamente 90 % a aproximadamente 100 % de identidad de secuencia con respecto a SEQ ID NO: 4, en donde el polipéptido de TATk está funcionalmente acoplado al polipéptido de CDKL5. En algunos aspectos, la proteína de fusión puede contener un polipéptido de secuencia líder de cadena de Igk, en donde la secuencia líder de cadena de Igk está funcionalmente acoplada al polipéptido de CDKL5. En aspectos adicionales, la proteína de fusión puede contener un polipéptido de proteína indicadora, en donde el polipéptido de proteína indicadora está funcionalmente acoplado al polipéptido de CDKL5. En otros aspectos, la proteína de fusión puede contener un polipéptido de etiqueta proteica, en donde el polipéptido de etiqueta proteica está funcionalmente acoplado al polipéptido de CDKL5. En algunos aspectos, las proteínas de fusión pueden aumentar el crecimiento, alargamiento, cantidad de ramificaciones o densidad de ramificaciones axónico en el cerebro de un sujeto en comparación con un testigo. En otros aspectos, las proteínas de fusión pueden reducir la apoptosis neuronal en el cerebro de un sujeto en comparación con un testigo. En algunos aspectos, la proteína de fusión puede tener una secuencia polipeptídica según la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 14.

- También se proporcionan en la presente memoria formulaciones farmacéuticas que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión que tiene una secuencia polipeptídica de CDKL5, en donde la secuencia polipeptídica de CDKL5 tiene aproximadamente 50 % a 100 % de identidad de secuencia con respecto a SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO: 16, y una secuencia polipeptídica de TATk, en donde la secuencia polipeptídica de TATk tiene aproximadamente 90 % a aproximadamente 100 % de identidad de secuencia con respecto a SEQ ID NO: 4, en donde el polipéptido de TATk está funcionalmente acoplado al polipéptido de CDKL5 y un portador

farmacéuticamente aceptable. En algunos aspectos la proteína de fusión contenida en las formulaciones farmacéuticas puede contener un polipéptido de secuencia líder de cadena de Igk, en donde la secuencia líder de cadena de Igk está funcionalmente acoplada al polipéptido de CDKL5. En algunos aspectos, la proteína de fusión contenida en las formulaciones farmacéuticas puede contener un polipéptido de proteína indicadora, en donde el polipéptido de proteína indicadora está funcionalmente acoplado al polipéptido de CDKL5. En aspectos adicionales, la proteína de fusión contenida en las formulaciones farmacéuticas puede tener una secuencia polipeptídica según la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 14. En aspectos adicionales, la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión puede tratar uno o más síntomas de una deficiencia de CDKL5, síndrome de Rett o variante de síndrome de Rett en un sujeto en comparación con un testigo. En aspectos adicionales, la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión puede aumentar el crecimiento, alargamiento, cantidad de ramificaciones o densidad de ramificaciones axónico en el cerebro de un sujeto en comparación con un testigo. En otros aspectos, la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión puede reducir la apoptosis neuronal en el cerebro de un sujeto en comparación con un testigo. En aspectos adicionales, la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión puede mejorar la motricidad en un sujeto en comparación con un testigo. En algunos aspectos, la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión puede mejorar la función cognitiva en un sujeto en comparación con un testigo.

En la presente memoria se proporcionan métodos para administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación farmacéutica que contiene una cantidad de una proteína de fusión, donde la proteína de fusión contiene una secuencia polipeptídica de CDKL5, en donde la secuencia polipeptídica de CDKL5 tiene aproximadamente 50 % a 100 % de identidad de secuencia con respecto a SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO: 16 y una secuencia polipeptídica de TATk, en donde la secuencia polipeptídica de TATk tiene aproximadamente 90 % a aproximadamente 100 % de identidad de secuencia con respecto a SEQ ID NO: 4, en donde el polipéptido de TATk está funcionalmente acoplado al polipéptido de CDKL5 y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunos aspectos, el sujeto que lo necesita padece o se sospecha que padece una deficiencia de CDKL5, síndrome de Rett o variante de síndrome de Rett. En otros aspectos del método para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la formulación farmacéutica, la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión puede tratar uno o más síntomas de una deficiencia de CDKL5, síndrome de Rett o variante de síndrome de Rett en un sujeto en comparación con un testigo.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una realización de un método para producir una proteína de fusión de CDKL5, en donde la proteína de fusión de CDKL5 se produce a partir de las células cultivadas y se secreta en los medios de cultivo circundantes.

La Figura 2 muestra una realización de un método para producir una proteína de fusión de CDKL5, en donde la proteína de fusión de CDKL5 no se secreta en los medios de cultivo celular circundantes.

La Figura 3 muestra una realización del método para suministrar una proteína de fusión de CDKL5 a través de una célula autóloga.

Las Figuras 4A y 4B demuestran resultados del análisis de transferencia western de la expresión proteica de TATk-CDKL5 en células HEK293T transfectadas. La proteína de fusión TATk-CDKL5 se etiquetó con una proteína GFP para posibilitar el análisis de transferencia western mediante el uso de un anticuerpo anti-GFP. La Figura 4A demuestra la expresión de la proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 en el extracto celular de células HEK293T transfectadas. La Figura 4B demuestra la purificación de la proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 a partir de medio de cultivo celular 20 veces concentrado de células HEK293T transfectadas con TATk-GFP-CDKL5.

Las Figuras 5A y 5B demuestran los resultados de un ensayo de actividad de cinasa (Figura 5A) que demuestra que la proteína de fusión TAT-GFP-CDKL5 conserva la actividad de autofosforilación de CDKL5.

La Figura 6 muestra el efecto del tiempo de incubación sobre la eficacia de la transducción de una realización de una proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 en células HEK 293T.

Las Figuras 7A y 7B muestran la localización de CDKL5 en células HEK 293T tratadas con TATk-GFP-CDKL5 (Figura 7B). Las Figuras 7A y 7B demuestran la eficacia de la transducción de células HEK 293T con una proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 en comparación con el testigo (Figura 7A) (panel a la izquierda). La inmunodetección se llevó a cabo usando un anticuerpo anti-GFP y las células se contratiñeron con DAPI. Las flechas blancas indican las células HEK 293T transducidas.

La Figura 8 es una imagen que demuestra una serie de 12 imágenes (1-12) de microscopía confocal que demuestra la transducción de TATk-GFP-CDKL5 en células SH-SY5Y tratadas con proteína TATk-GFP-CDKL5 purificada durante 30 minutos. El tamaño de la pila Z fue de 0,4 μ m. La Figura 8 demuestra la eficacia de la transducción de células SH-SY5Y con una proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5.

Las Figuras 9A y 9B demuestran el efecto de CDKL5 transducida en células de neuroblastoma (SH-SY5Y) sobre la proliferación celular. Se observó que las células tratadas con TATk-GFP-CDKL5 (Figura 9B) tienen una proliferación

reducida en comparación con células tratadas con TATk-GFP (testigo) (Figura 9A). Las flechas blancas indican los núcleos mitóticos.

La Figura 10 muestra un gráfico que demuestra el índice mitótico de células SH-SY5Y tratadas con las proteínas de fusión TATk-GFP o TATk-GFP-CDKL5. El eje y muestra las células mitóticas/total de células y se expresan en porcentaje. Los datos se muestran como una media \pm ET *** $P < 0,001$ (prueba de la t).

Las Figuras 11A-11B son imágenes que demuestran una imagen de contraste de fase representativa de células SH-SY5Y tratadas con TATk-GFP (testigo) (Figura 11A) y células SH-SY5Y tratadas con TATk-GFP-CDKL5 (Figura 11B). Se observó un mayor crecimiento axónico en células SH-SY5Y tratadas con TATk-GFP-CDKL5, en comparación con células testigo.

La Figura 12 muestra un gráfico que demuestra la cuantificación del crecimiento axónico de células SH-SY5Y tratadas con las proteínas de fusión TATk-GFP (testigo) o TATk-GFP-CDKL5. Los datos se muestran como una media \pm ET * $P < 0,05$ (prueba de la t). El eje y muestra la longitud axónica/célula en micrones.

Las Figuras 13A-13B muestran imágenes que demuestran la morfología dendrítica y la cantidad de células granulares hipocámpicas recién nacidas como se muestra mediante inmunohistoquímica para doblecortina (DCX) en ratones naturales (Figura 13A) y con CDKL5 inactivada (KO) (Figura 13B). Barra de escala = 50 μ m. Abreviaturas: GR, capa granular; H, Hilio.

Las Figuras 14A-14B muestran imágenes de doble fluorescencia de células precursoras neuronales (NPC, por sus siglas en inglés) diferenciadas que demuestran una reducción en la generación y maduración de nuevas neuronas (células rojas) en cultivos neuronales derivados de ratones con CDKL5 inactivada (-/-) (Figura 14A) en comparación con cultivos neuronales naturales (+/+) (Figura 14B). Las células con un fenotipo neuronal son inmunopositivas para β -tubulina III (rojo) y las células con un fenotipo astrocítico son inmunopositivas para GFAP (verde). Los núcleos celulares se tiñeron mediante el uso de tinte Hoechst (azul). Barra de escala = 25 μ m.

Las Figuras 15A-15C muestran imágenes representativas de cultivos precursores neuronales de ratones con CDKL5 inactivada (Figuras 15B y 15C), transducidos con TATk-GFP (Figura 15B) o TATk-GFP-CDKL5 (Figura 15C), así como cultivos precursores neuronales de ratones naturales (Figura 15A). Barra de escala = 20 μ m.

La Figura 16 muestra un gráfico que demuestra la cuantificación de la maduración neuronal según se mide mediante la longitud axónica total de neuronas diferenciadas (neuronas positivas para β -tubulina III) en cultivos precursores neuronales de ratones naturales y CDKL5 KO tratados con TATk-GFP o TATk-GFP-CDKL5. Los valores representan la media \pm ET. ** $p < 0,01$ en comparación con la condición natural; # $p < 0,01$ en comparación con muestras KO no tratadas (prueba de Bonferroni después de ANOVA).

Las Figuras 17A-17F muestran imágenes que demuestran la inmunodetección de CDKL5 en los cerebros de ratones (día 7 posnacimiento) tratados sistémicamente (una sola inyección) con el medio de cultivo concentrado (vehículo) (Figuras 17A y 17D), TATk-GFP (Figuras 17B y 17E) y TATk-GFP-CDKL5 (Figuras 17C y 17F). Las Figuras 17D-17F ilustran ampliaciones de los cuadros punteados en las Figuras 17A-17C, respectivamente. La localización de TATk-GFP-CDKL5 y TATk-GFP en el cerebro se evaluó mediante inmunohistoquímica con el uso de un anticuerpo anti-GFP (rojo). Las imágenes se tomaron al nivel de la corteza sensorial y motora. Barra de escala = 60 μ m (ampliación inferior) y 20 μ m (ampliación superior).

Las Figuras 18A-18D muestran imágenes de secciones cerebelosas que demuestran la inmunodetección de CDKL5 en los cerebros de ratones (día 7 posnacimiento) tratados sistémicamente como en las Figuras 17A-17F con el medio de cultivo (vehículo) (Figuras 18A y 18B) y TATk-GFP-CDKL5 (Figuras 18C y 18D). La localización de TATk-GFP-CDKL5 en el cerebro se evaluó mediante inmunohistoquímica con el uso de un anticuerpo anti-GFP (Figuras 18A-18B). Los cubreobjetos se montaron con DAPI para teñir los núcleos celulares (Figuras 18B, 18C). Abreviaturas: EGL, capa granular externa; IGL, capa granular interna; ML, capa molecular; PL, capa de Purkinje. Barra de escala = 60 μ m.

La Figura 19 demuestra la colocación de la cánula para la administración intraventricular de la proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 a ratones.

La Figura 20 muestra un dibujo que representa el implante y la pauta de inyección de la proteína de fusión para el estudio demostrado en las Figuras 21-33.

Las Figuras 21A-21C muestran imágenes de secciones de circunvolución dentada del hipocampo inmunoteñidas para DCX que demuestran una longitud axónica y cantidad reducidas de células granulares recién nacidas en ratones con CDKL5 inactivada en comparación con ratones naturales (Figuras 21B y 21A, respectivamente). Se observó que la proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 administrada intraventricularmente en cinco días consecutivos aumenta la longitud axónica y la cantidad de células granulares recién nacidas en ratones con CDKL5 inactivada (Figura 21C) hasta niveles similares a los naturales (Figura 21A). Barra de escala = 70 μ m.

Las Figuras 22A-22C ilustran ampliaciones de las imágenes en la Figura 21 a nivel de la capa granular de la circunvolución dentada. Barra de escala = 25 μ m.

Las Figuras 23A-23B muestran ejemplos del árbol dendrítico reconstruido de células granulares recién nacidas de ratones macho naturales (+/Y) (Figura 23A), con CDKL5 inactivada (-/Y) (Figura 23B) y con CDKL5 inactivada tratados con una proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 a través de inyecciones intraventriculares suministradas una vez al día durante 5 días consecutivos (-/Y + TATk-GFP-CDKL5) (Figura 23C).

Las Figuras 24A-24B muestran gráficos que demuestran la cuantificación de la longitud dendrítica total media (Figura 24A) y la cantidad media de segmentos dendríticos (Figura 24B) de células granulares recién nacidas (células positivas para DCX) de la circunvolución dentada de ratones macho naturales (+/Y), ratones macho con CDKL5 inactivada (-/Y) y ratones macho con CDKL5 inactivada tratados con una proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 a través de inyecciones intraventriculares suministradas una vez al día durante 5 días consecutivos (-/Y + TATk-GFP-CDKL5). Los valores representan la media \pm ET. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ en comparación con la +/Y; # $p < 0,05$ en comparación con las muestras -/Y (prueba de Bonferroni después de ANOVA).

Las Figuras 25A-25B muestran gráficos que demuestran la cuantificación de la longitud media (Figura 25A) y la cantidad media (Figura 25B) de ramificaciones de los diferentes órdenes de células granulares recién nacidas de la circunvolución dentada de ratones macho naturales (+/Y), ratones macho con CDKL5 inactivada (-/Y) y ratones macho con CDKL5 inactivada tratados con una proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 a través de inyecciones intraventriculares suministradas una vez al día durante 5 días consecutivos (-/Y + TATk-GFP-CDKL5). Los valores representan la media \pm ET. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ en comparación con la +/Y; # $p < 0,05$ en comparación con las muestras -/Y (prueba de Bonferroni después de ANOVA).

La Figura 26 muestra un gráfico que demuestra la cuantificación de células apoptóticas (células positivas para caspasa-3) en ratones macho naturales (+/Y), ratones macho con CDKL5 inactivada (-/Y) y ratones macho con CDKL5 inactivada tratados con una proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 a través de inyecciones intraventriculares suministradas una vez al día durante 5 días consecutivos (-/Y + TATk-GFP-CDKL5). Los valores representan la media \pm ET. * $P < 0,05$ en comparación con la +/Y; # $p < 0,05$ en comparación con las muestras -/Y (prueba de Bonferroni después de ANOVA).

Las Figuras 27 muestran un gráfico que demuestra la cuantificación de la cantidad de células positivas para DCX en la DG de ratones macho naturales (+/Y), ratones macho con CDKL5 inactivada (-/Y) y ratones macho con CDKL5 inactivada tratados con una proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 a través de inyecciones intraventriculares suministradas una vez al día durante 5 días consecutivos (-/Y + TATk-GFP-CDKL5). Los datos se expresan como la cantidad de células/mm² * $p < 0,05$ en comparación con +/Y; # $p < 0,05$ en comparación con las muestras -/Y (prueba de Bonferroni después de ANOVA).

Las Figuras 28A-28C muestran imágenes representativas que demuestran secciones de cerebro procesadas para inmunofluorescencia con sinaptofisina (SYN) de la capa molecular de la circunvolución dentada (DG, por sus siglas en inglés) de un ratón macho natural (+/Y) (Figura 28A), un ratón macho con CDKL5 inactivada (-/Y) (Figura 28B) y un ratón macho con CDKL5 inactivada tratado con una proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 a través de inyecciones intraventriculares suministradas una vez al día durante 5 días consecutivos (-/Y + TATk-GFP-CDKL5) (Figura 28C). Barra de escala = 80 μ m. Abreviaturas: GR, capa granular; Mol, capa molecular.

Las Figuras 29A-29C muestran imágenes representativas que demuestran secciones de cerebro procesadas para inmunofluorescencia con fosfo-AKT (P-AKT) de la capa molecular de la circunvolución dentada (DG) de un ratón macho natural (+/Y) (Figura 29A), un ratón macho con CDKL5 inactivada (-/Y) (Figura 29B) y un ratón macho con CDKL5 inactivada tratado con una proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 a través de inyecciones intraventriculares suministradas una vez al día durante 5 días consecutivos (-/Y + TATk-GFP-CDKL5) (Figura 29C). Barra de escala = 80 μ m. Abreviaturas: GR, capa granular; Mol, capa molecular.

Las Figuras 30A-30B muestran gráficos que demuestran la cuantificación de la densidad óptica de sinaptofisina (SYN) en la capa molecular del hipocampo (Figura 30A) y la capa III de la corteza (Figura 30B) en ratones macho naturales (+/Y), ratones macho con CDKL5 inactivada (-/Y) y ratones macho con CDKL5 inactivada tratados con una proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 a través de inyecciones intraventriculares suministradas una vez al día durante 5 días consecutivos (-/Y + TAT-GFP-CDKL5). Los datos se proporcionan como la diferencia en volumen con respecto a la zona correspondiente de la capa molecular o corteza de los ratones naturales. Los valores representan la media \pm ET. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ en comparación con la +/Y; # $p < 0,05$ en comparación con las muestras -/Y (prueba de Bonferroni después de ANOVA).

Las Figuras 31A-31B muestran gráficos que demuestran la cuantificación de la densidad óptica de Ser437 fosforilada por AKT (PAKT) en la capa molecular del hipocampo (Figura 31A) y la capa V de la corteza (Figura 31B) en ratones macho naturales (+/Y), ratones macho con CDKL5 inactivada (-/Y) y ratones macho con CDKL5 inactivada tratados con una proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 a través de inyecciones intraventriculares suministradas una vez al día durante 5 días consecutivos (-/Y + TATk-GFP-CDKL5). Los datos se proporcionan como la diferencia en volumen con respecto a la zona correspondiente de la capa molecular o corteza de los ratones

naturales. Los valores representan la media \pm ET. ** $p < 0,01$ en comparación con la +/Y; # $p < 0,01$ en comparación con las muestras -/Y (prueba de Bonferroni después de ANOVA).

La Figura 32 muestra un dibujo que representa el implante y la pauta de inyección de la proteína de fusión para el estudio conductual demostrado en las Figuras 33-34.

- 5 La Figura 33 muestra un gráfico que demuestra la cuantificación de la fase de aprendizaje según se determina a través de la prueba de laberinto de agua de Morris en ratones macho naturales (+/Y; $n=8$), ratones macho con CDKL5 inactivada (-/Y; $n=8$) y ratones macho con CDKL5 inactivada tratados con una proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 (-/Y + TATk-GFP-CDKL5; $n=6$). Los valores representan la media \pm ET. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ en comparación con la condición natural no tratada y # $P < 0,01$ en comparación con la condición con CDKL5 inactivada no tratada según se evaluaron con Fisher LSD después de ANOVA.

- 10 Las Figuras 34A-34B muestran gráficos que demuestran la capacidad de memoria según se determina a través de la prueba de evitación pasiva en ratones macho naturales (+/Y; $n=8$), ratones macho con CDKL5 inactivada (-/Y; $n=8$) y ratones macho con CDKL5 inactivada tratados con una proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 (-/Y + TATk-GFP-CDKL5; $n=6$). Los gráficos muestran el tiempo de latencia para ingresar en el compartimiento oscuro el primer día (Figura 34A) y el segundo día (Figura 34B) del procedimiento conductual. Los valores representan la media \pm ET. *** $P < 0,001$ en comparación con la condición natural no tratada y # $P < 0,01$ en comparación con la condición con CDKL5 inactivada no tratada según se evaluaron con Fisher LSD después de ANOVA.

- 20 Las Figuras 35A-35B muestran un gráfico que demuestra la cuantificación de la motricidad según se determina a través de una prueba de agarre en la que se mide la cantidad de tiempo total de agarre de extremidades durante un intervalo de 2 minutos en ratones macho naturales (+/Y; $n=8$), ratones macho con CDKL5 inactivada (-/Y; $n=8$) y ratones macho con CDKL5 inactivada tratados con una proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 (-/Y + TATk-GFP-CDKL5; $n=8$) según la pauta de inyección en la Figura 32. Los valores representan la media \pm ET. *** $p < 0,001$ en comparación con la +/Y; # $p < 0,001$ en comparación con las muestras -/Y (prueba de Bonferroni después de ANOVA).

- 25 La Figura 36 demuestra el peso corporal (en gramos) de ratones naturales (+/Y) e inactivados (-/Y) tratados con una proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 según la pauta de tratamiento de la Figura 20 (+/Y; $n=8$) o la Figura 32 (-/Y; $n=6$). Se dejó que los ratones se recuperaran durante 7 días después del implante de la cánula.

Descripción detallada

- 30 En la presente memoria se proporcionan composiciones y formulaciones de proteína de fusión TATk-CDKL5 y métodos para su uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por CDKL5, particularmente trastornos y enfermedades debido a mutaciones y/o deficiencias de CDKL5. Se proporcionan, además, en la presente memoria métodos para producir composiciones y formulaciones de proteína de fusión TATk-CDKL5. Estos métodos proporcionan herramientas experimentales mejoradas para la investigación de trastornos neurológicos mediados por CDKL5, así como opciones de tratamiento mejoradas para pacientes que padecen trastornos relacionados con la disfunción de CDKL5.

Definiciones

- 40 El término "biocompatible", según se usa en la presente memoria, se refiere a un material que junto con cualesquiera metabolitos o productos de degradación de este generalmente no son tóxicos para el receptor y no provocan ningún efecto adverso significativo al receptor. En términos generales, los materiales biocompatibles son materiales que no desencadenan una respuesta inflamatoria ni inmunitaria significativa cuando se administran a un paciente.

- 45 El término "peso molecular", según se usa en la presente memoria, generalmente hace referencia a la masa o masa promedio de un material. Si es un polímero u oligómero, el peso molecular puede hacer referencia a la longitud de cadena promedio relativa o la masa de cadena relativa del polímero a granel. En la práctica, el peso molecular de los polímeros y oligómeros se puede estimar o caracterizar de varias maneras que incluyen cromatografía de permeación en gel (GPC, por sus siglas en inglés) o viscosimetría capilar. Los pesos moleculares por GPC se indican como el peso molecular promedio en peso (M_w) en oposición al peso molecular promedio en número (M_n). La viscosimetría capilar proporciona estimaciones del peso molecular como la viscosidad inherente determinada a partir de una disolución de polímero diluida usando un conjunto específico de condiciones de concentración, temperatura y disolvente.

- 50 Según se usa en la presente memoria, "biodegradable" generalmente hace referencia a un material que se degradará o erosionará en condiciones fisiológicas hasta unidades más pequeñas o especies químicas que el sujeto puede metabolizar, eliminar o excretar. El tiempo de degradación es una función de la composición y morfología. Los tiempos de degradación pueden durar horas a semanas.

- 55 El término "hidrófilo/a", según se usa en la presente memoria, se refiere a sustancias que tienen grupos fuertemente polares que interactúan sin inconvenientes con el agua.

El término "hidrófobo/a", según se usa en la presente memoria, se refiere a sustancias que carecen de afinidad por el agua; y tienden a repeler y no absorber el agua, así como no disolverse ni mezclarse con el agua.

El término "lipófilo/a", según se usa en la presente memoria, se refiere a compuestos que tienen afinidad por lípidos.

5 El término "anfífilo", según se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula que combina propiedades hidrófilas y lipófilas (hidrófobas).

Según se usa en la presente memoria, "aproximadamente" y similares, cuando se usan en conexión con una variable numérica, generalmente se refieren al valor de la variable y a todos los valores de la variable que están dentro del error experimental (p. ej., dentro del intervalo de confianza de 95 % para la media) o dentro de +/-10 % del valor indicado, cualquiera que sea mayor.

10 Según se usa en la presente memoria, "célula," "línea celular" y "cultivo celular" incluyen progenie. También se entiende que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en el contenido de ADN, debido a las mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluyen las progenies variantes que tienen la misma función o propiedad biológica, según se verifica en la célula transformada originalmente.

15 Según se usa en la presente memoria, "composición" se refiere a una combinación de agente activo y al menos un otro compuesto o molécula, inerte (por ejemplo, un agente o etiqueta detectable) o activo, tal como un adyuvante.

Según se usa en la presente memoria, "testigo" es un sujeto o muestra alternativo usado en un experimento con fines de comparación e incluido para minimizar o distinguir el efecto de variables distintas de una variable independiente.

20 Según se usa en la presente memoria, "testigo positivo" se refiere a un "testigo" que se diseña para producir el resultado deseado, siempre que todos los reactivos funcionan adecuadamente y que el experimento se lleve a cabo adecuadamente.

25 Según se usa en la presente memoria, "testigo negativo" se refiere a un "testigo" que se diseña para producir ningún efecto o resultado, siempre que todos los reactivos funcionan adecuadamente y que el experimento se lleve a cabo adecuadamente. Otros términos que se usan de manera intercambiable con "testigo negativo" incluyen "simulado", "placebo" e "imitado".

Según se usa en la presente memoria, "cultivar" se refiere a mantener células en condiciones en las que pueden proliferar y evitar el envejecimiento como un grupo de células. "Cultivar" también puede incluir condiciones en las que las células también o alternativamente se diferencian.

30 Según se usa en la presente memoria, "expresado/a diferencialmente", se refiere a la producción diferencial de ARN, que incluye, pero no se limita a ARNm, ARNt, miARN, ARNip, ARNnp y ARNpi transcrito a partir de un gen o región reguladora de un genoma o el producto proteico codificado por un gen en comparación con el nivel de producción del ARN por el mismo gen o región reguladora en una célula normal o testigo. En otro contexto, "expresado/a diferencialmente" también se refiere a secuencias de nucleótidos o proteínas en una célula o tejido que tienen perfiles de expresión temporales y/o espaciales diferentes en comparación con una célula normal o testigo.

35 Según se usa en la presente memoria, "sobrexpresado/a" o "sobrexpresión" se refiere a un nivel de expresión mayor de un ARN o producto proteico codificado por un gen en comparación con el nivel de expresión del ARN o producto proteico en una célula normal o testigo.

40 Según se usa en la presente memoria, "subexpresado/a" o "subexpresión" se refiere a un nivel de expresión menor de un ARN o producto proteico codificado por un gen en comparación con el nivel de expresión del ARN o producto proteico en una célula normal o testigo.

Según se usa en la presente memoria, "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para producir una respuesta biológica, emocional, médica o clínica beneficiosa o deseada de una célula, tejido, sistema, animal o humano. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones. El término también incluye dentro de su alcance cantidades eficaces para potenciar la función fisiológica normal.

45 Los términos "suficiente" y "eficaz", según se usan de manera intercambiable en la presente memoria, se refieren a una cantidad (p. ej. masa, volumen, dosificación, concentración y/o período de tiempo) necesaria para lograr uno o más resultados deseados. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad necesaria para lograr uno o más efectos terapéuticos.

50 Según se usa en la presente memoria, "expansión" o "expandido/a" en el contexto de celular se refiere a un aumento en la cantidad de un tipo celular o tipos celulares característicos, a partir una población inicial de células, que pueden o no ser idénticas. Las células iniciales usadas para la expansión no necesitan ser las mismas que las células generadas a partir de la expansión. Por ejemplo, las células expandidas se pueden producir mediante crecimiento y diferenciación *ex vivo* o *in vitro* de la población de células inicial.

Según se usa en la presente memoria, "expresión" se refiere al proceso por el cual los polinucleótidos se transcriben en transcritos de ARN. En el contexto del ARNm y otras especies de ARN traducidas, "expresión" también se refiere al proceso o procesos por los cuales el ARN transcrito posteriormente se traduce en péptidos, polipéptidos o proteínas.

- 5 Según se usa en la presente memoria, "aislado/a" significa separado de constituyentes celulares y de cualquier otro tipo, con los que el polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmentos de estos, están normalmente asociados en la naturaleza. Un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmentos de estos de origen no natural no requiere "aislamiento" para distinguirse de su contraparte de origen natural.

- 10 Según se usa en la presente memoria, "concentrado/a" se refiere a una molécula que incluye, pero no se limita a, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmentos de estos, que se puede distinguir de su contraparte de origen natural en que la concentración o número de moléculas por volumen es mayor que la de su contraparte de origen natural.

- 15 Según se usa en la presente memoria, "diluido/a" se refiere a una molécula que incluye, pero no se limita a, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmentos de estos, que se puede distinguir de su contraparte de origen natural en que la concentración o número de moléculas por volumen es menor que la de su contraparte de origen natural.

Según se usa en la presente memoria, "separado/a" se refiere al estado de estar físicamente dividido de la fuente o población original, de manera que el compuesto, agente, partícula o molécula separado puede ya no considerarse parte de la fuente o población original.

- 20 Según se usa en la presente memoria, "mamífero" a los efectos de los tratamientos se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluidos humanos, animales domésticos y de granja, primates no humanos y animales de zoológico, para deportes o mascotas, tales como, pero sin limitarse a, perros, caballos, gatos y vacas.

Según se usan de manera intercambiable en la presente memoria, "sujeto", "individuo" o "paciente" se refieren a un organismo vertebrado.

- 25 Según se usa en la presente memoria, "población celular sustancialmente pura" se refiere a una población de células que tiene una característica de marcador celular especificada y potencial de diferenciación que es aproximadamente 50 %, preferiblemente, aproximadamente 75-80 %, más preferiblemente, aproximadamente 85-90 %, y lo más preferiblemente, aproximadamente 95 % de células que componen la población celular total. Por lo tanto, una "población celular sustancialmente pura" se refiere a una población de células que contiene menos de
30 aproximadamente 50 %, preferiblemente, menos de aproximadamente 20-25 %, más preferiblemente, menos de aproximadamente 10-15 %, y lo más preferiblemente, menos de aproximadamente 5 % de células que no exhiben una característica marcadora especificada y potencial de diferenciación en condiciones de ensayo designadas.

- 35 Según se usa en la presente memoria, "terapéutico/a" se refiere a tratar, curar y/o mejorar una enfermedad, trastorno, afección o efecto secundario, o a reducir la velocidad del avance de una enfermedad, trastorno, afección o efecto secundario. El término también incluye dentro de su alcance potenciar la función fisiológica normal, tratamiento paliativo y remediar parcialmente una enfermedad, trastorno, afección, efecto secundario o síntoma de este. La enfermedad o trastorno puede ser deficiencia de CDKL5 y/o síndrome de Rett.

- 40 Los términos "tratar" y "tratamiento", según se usan en la presente memoria, se refieren generalmente a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en relación con la prevención o prevención parcial de una enfermedad, síntoma o afección de esta, tal como una enfermedad o trastorno resultante de mutaciones y/o deficiencias de CDKL5, la variante por CDKL5 del síndrome de Rett u otro trastorno neurológico mediado por CDKL5, y/o puede ser terapéutico en relación con una cura parcial o completa de una enfermedad, afección, síntoma o efecto adverso atribuido a la enfermedad, trastorno o afección. El término "tratamiento", según se usa en la presente memoria, abarca cualquier tratamiento de un trastorno neurológico mediado por CDKL5 en un
45 mamífero, particularmente un humano, e incluye: (a) evitar que la enfermedad se presente en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero que todavía no se le ha diagnosticado que la padece; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar la enfermedad, es decir, mitigar o mejorar la enfermedad y/o sus síntomas o afecciones. El término "tratamiento", según se usa en la presente memoria, se refiere al tratamiento terapéutico y a las medidas profilácticas o preventivas. Los que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya
50 padecen el trastorno, así como aquellos en los que se debe prevenir el trastorno.

Según se usa en la presente memoria, "formulación farmacéutica" se refiere a la combinación de un agente activo, compuesto o ingrediente con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, que convierta a la composición en adecuada para diagnóstico, terapia o uso preventivo in vitro, in vivo o ex vivo.

- 55 Según se usa en la presente memoria, "portador o excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador o excipiente que es útil para preparar una formulación farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y no es ni biológicamente ni de cualquier otra manera indeseable, e incluye a portador o excipiente que es aceptable para

uso veterinario, así como uso farmacéutico humano. Un "portador o excipiente farmacéuticamente aceptable" según se usa en la memoria descriptiva y reivindicaciones incluye uno y más de uno de dicho portador o excipiente.

Según se usa en la presente memoria, "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier sal de adición de ácido o base cuyos contraiones no son tóxicos para el sujeto al que se administran en dosis farmacéuticas de las sales.

Según se usa en la presente memoria, "preventivo/a" y "prevenir" se refiere a impedir o detener una enfermedad o afección antes de que se presente, incluso si no está diagnosticada, o mientras la enfermedad o afección está todavía en fase subclínica.

Según se usa en la presente memoria, "agente activo" o "ingrediente activo" se refiere a una sustancia, compuesto o molécula que es biológicamente activo o de cualquier otra manera, induce un efecto biológico o fisiológico sobre un sujeto al cual se administra. En otras palabras, "agente activo" o "ingrediente activo" se refiere a un componente o componentes de una composición a los cuales se atribuye todo o parte del efecto de la composición.

Según se usa en la presente memoria, "medio de expresión tangible" se refiere a un medio que es físicamente tangible y no es un mero pensamiento abstracto o una palabra oral no registrada. El medio de expresión tangible incluye, pero no se limita a, palabras en un material celulósico o plástico o datos almacenados en un dispositivo adecuado tal como una memoria flash o CD-ROM.

Según se usa en la presente memoria, "agente quimioterapéutico" o "sustancia quimioterapéutica" se refiere a un agente terapéutico usado para prevenir o tratar el cáncer.

Según se usa en la presente memoria, "matriz" se refiere a un material, en el que se incorporan una o más estructuras especializadas, moléculas o composiciones.

Según se usa en la presente memoria, "aptámero" se refiere a moléculas de ADN o ARN monocatenarias que se pueden unir a dianas preseleccionadas que incluyen proteínas con alta afinidad y especificidad. Su especificidad y características no se determinan directamente por su secuencia primaria, sino que por sus estructuras terciarias.

Según se usa en la presente memoria, "inmunomodulador", se refiere a un agente, tal como un agente terapéutico, que es capaz de modular o regular una o más funciones o respuestas inmunitarias.

Según se usa en la presente memoria, "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectados por enlaces disulfuro, o una porción de unión a antígeno de estas. Cada cadena pesada está comprendida por una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente memoria como VH) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera está comprendida por una región variable de cadena ligera y una región constante de cadena ligera. Las regiones VH y VL conservan la especificidad de unión con el antígeno y se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones de determinación de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés). Las CDR están intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de marco (FR, por sus siglas en inglés). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro regiones de marco, dispuestas desde el extremo aminico hasta el extremo carboxílico en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno.

Según se usan en la presente memoria, "organismo", "hospedante" y "sujeto" se refieren a cualquier entidad vida comprendida por al menos una célula. Un organismo vivo puede ser tan simple como, por ejemplo, una célula eucariota aislada simple o una célula o línea celular cultivada, o tan complejo como un mamífero, incluido un ser humano, y animales (p. ej., vertebrados, anfibios, peces, mamíferos, p. ej., gatos, perros, caballos, cerdos, ovejas, roedores, conejos, ardillas, osos, primates (p. ej., chimpancés, gorilas y humanos). "Sujeto" también puede ser una célula, una población de células, un tejido, un órgano o un organismo, preferiblemente, un humano y constituyentes de este.

Según se usa en la presente memoria, "paciente" se refiere a un organismo, hospedante o sujeto que necesita tratamiento.

Según se usa en la presente memoria, "proteína" según se usa en la presente memoria se refiere a una molécula grande compuesta por una o más cadenas de aminoácidos en un orden específico. El término proteína se usa de manera intercambiable con "polipéptido". El orden se determina por la secuencia base de nucleótidos en el gen que codifica la proteína. Las proteínas son necesarias para la estructura, función y regulación de las células, tejidos y órganos del cuerpo. Cada proteína tiene una función única.

Según se usa en la presente memoria, "sustancialmente puro/a" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferiblemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en donde la especie objeto comprende aproximadamente 50 por ciento de todas las especies presentes. Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente 80 por ciento de todas las especies presentes en la

composición, más preferiblemente, más de aproximadamente 85 %, 90 %, 95 % y 99 %. Lo más preferiblemente, la especie objeto se purifica hasta la homogeneidad esencial (no se pueden detectar especies contaminantes en la composición mediante métodos de detección convencionales), en donde la composición consiste esencialmente en una especie simple.

- 5 Según se usan en la presente memoria, "ácido nucleico" y "polinucleótido" generalmente se refieren a una sucesión de al menos dos combinaciones de base-azúcar-fosfato y se refiere, entre otros, a ADN mono y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario y ARN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, más típicamente, bicatenarias o una mezcla de regiones mono y bicatenarias. Además, polinucleótido, según se usa en la
10 presente memoria, se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN, o ambos, ARN y ADN. Las hebras en dichas regiones pueden ser de la misma molécula o de moléculas diferentes. Las regiones pueden incluir la totalidad de una o más de las moléculas, pero más típicamente implican solo una región de algunas de las moléculas. Una de las moléculas de una región triplehelicoidal con frecuencia es un oligonucleótido. "Polinucleótido" y "ácidos nucleicos" también abarcan formas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente modificadas de polinucleótidos, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluidas células
15 simples y complejas, entre otras. Por ejemplo, el término polinucleótido incluye ADN o ARN, según se describieron anteriormente, que contienen una o más bases modificadas. Por lo tanto, los ADN o ARN que comprenden bases inusuales, tales como inosina, o bases modificadas, tales como bases tritiladas, para nombrar apenas dos ejemplos, son polinucleótidos como se usa el término en la presente memoria. "Polinucleótido" y "ácidos nucleicos" también
20 incluyen PNA (ácidos nucleicos peptídicos), fosforotioatos y otras variantes de la cadena principal de fosfato de los ácidos nucleicos naturales. Los ácidos nucleicos naturales tienen una cadena principal de fosfato, los ácidos nucleicos artificiales pueden contener otros tipos de cadenas principales, pero contienen las mismas bases. Por lo tanto, los ADN o ARN con cadenas principales modificadas para la estabilidad o por otros motivos son "ácidos nucleicos" o "polinucleótido" según está previsto el término en la presente memoria.

- 25 Según se usa en la presente memoria, "ácido desoxirribonucleico (ADN)" y "ácido ribonucleico (ARN)" generalmente se refieren a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser un ARN o ADN no modificado o un ARN o ADN modificado. El ARN puede estar en forma de un ARNt (ARN de transferencia), ARNnp (ARN nuclear pequeño), ARNr (ARN ribosómico), ARNm (ARN mensajero), ARN antisentido, iARN (construcción de interferencia por ARN), ARNip (ARN interferente pequeño) o ribozimas.

- 30 Según se usan en la presente memoria, "secuencia de ácido nucleico" y "oligonucleótido" también abarcan un ácido nucleico y polinucleótido, según se definieron anteriormente.

Según se usa en la presente memoria, "molécula de ADN" incluye ácidos nucleicos/polinucleótidos que están compuestos por ADN.

- 35 Según se usa en la presente memoria, "gen" se refiere a una unidad hereditaria correspondiente a una secuencia de ADN que ocupa una ubicación específica en un cromosoma y que contiene la instrucción genética para una característica(s) o rasgo(s) en un organismo.

- Según se usa en la presente memoria, el término "recombinante" generalmente se refiere a un ácido nucleico, construcción de ácido nucleico o polipéptido de origen no natural. Dichos ácidos nucleicos de origen no natural pueden incluir ácidos nucleicos naturales que se han modificado, por ejemplo, que tienen eliminaciones, sustituciones, inversiones, inserciones, etc., y/o combinaciones de secuencias de ácido nucleico de origen diferente
40 que se unen usando tecnologías de biología molecular (p. ej., unas secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de fusión (p. ej., una proteína o polipéptido formado a partir de la combinación de dos proteínas o fragmentos de proteína diferentes), la combinación de un ácido nucleico que codifica un polipéptido con una secuencia promotora, donde la secuencia codificante y la secuencia promotora son de diferentes fuentes o de cualquier otra manera no aparecen típicamente juntas naturalmente (p. ej., un ácido nucleico y un promotor constitutivo), etc.). Recombinante también se refiere al polipéptido codificado por el ácido nucleico recombinante. Los ácidos nucleicos o polipéptidos de origen no natural incluyen ácidos nucleicos y polipéptidos modificados por el hombre.

- Según se usa en la presente memoria, "proteína de fusión" se refiere a una proteína formada a partir de la combinación de al menos dos proteínas o fragmentos de proteína diferentes. Una molécula de ADN recombinante codifica una proteína de fusión. De este modo, una "proteína de fusión de CDKL5" se refiere a una proteína recombinante que tiene un polipéptido de CDKL5 humano o variante de este enlazado funcionalmente con otras secuencias polipeptídicas.
50

- Según se usa en la presente memoria, "deficiencia de CDKL5" se refiere a cualquier deficiencia en la función biológica de la proteína. La deficiencia puede resultar de cualquier mutación de ADN en el ADN que codifica la proteína o una región reguladora relacionada con el ADN o cualquier cambio en la función de la proteína debido a cualesquiera cambios en la modificación del ADN epigenético, incluidas, pero sin limitarse a, metilación de ADN o modificación de histona, cualquier cambio en las estructuras secundarias, terciarias o cuaternarias de la proteína
55

CDKL5, o cualquier cambio en la capacidad de la proteína CDKL5 para llevar a cabo su función biológica en comparación con un sujeto natural o normal.

Según se usa en la presente memoria, "variante del síndrome de Rett", "variante de síndrome de Rett" y similares se refieren a una forma atípica del síndrome de Rett con signos clínicos similares al síndrome de Rett, pero una etiología desconocida.

Según se usa en la presente memoria, "mutación de CDKL5" se refiere a cualquier cambio en la secuencia de nucleótidos de la región codificante de la proteína CDKL5.

Según se usa en la presente memoria, el término "transfección" se refiere a la introducción de una secuencia de ácido nucleico exógena y/o recombinante en el interior de un espacio cerrado por una membrana de una célula viva, incluida la introducción de la secuencia de ácido nucleico en el citosol de una célula, así como el espacio interior de una mitocondria, núcleo o cloroplasto. El ácido nucleico puede estar en forma de un ADN o ARN no marcado, y se puede asociar con diversas proteínas o elementos reguladores (p. ej., un promotor y/o elemento señal), o el ácido nucleico se puede incorporar en un vector o un cromosoma.

Según se usa en la presente memoria, "transformación" o "transformado/a" se refiere a la introducción de un ácido nucleico (p. ej., ADN o ARN) en células de tal manera que se posibilite la expresión de las porciones codificantes del ácido nucleico introducido.

Según se usa en la presente memoria, "transducido/a" se refiere a la introducción directa de una proteína en una célula.

Según se usa en la presente memoria "péptido" se refiere a cadenas de al menos 2 aminoácidos que son cortas, con respecto a una proteína o polipéptido.

Según se usa en la presente memoria, "variante" se refiere a un polipéptido que difiere de un polipéptido de referencia, pero conserva propiedades esenciales. Una variante típica de un polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos con respecto a otro polipéptido de referencia. Generalmente, las diferencias son limitadas para que las secuencias del polipéptido de referencia y la variante sean estrechamente similares en general y, en muchas regiones, idénticas. Una variante y el polipéptido de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos por una o más modificaciones (p. ej., sustituciones, adiciones y/o eliminaciones). Un residuo aminoacídico sustituido o insertado puede o no ser uno codificado por el código genético. Una variante de un polipéptido puede ser de origen natural tal como una variante alélica, o puede ser una variante que no se conoce por producirse naturalmente. "Variante" incluye variantes funcionales y estructurales.

Según se usa en la presente memoria, "identidad" es una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas, según se determina al comparar las secuencias. En la técnica, "identidad" también se refiere al grado de relación secuencial entre los polipéptidos, según se determina mediante el apareamiento entre hebras de dichas secuencias. La "identidad" se puede calcular sin inconvenientes mediante métodos conocidos que incluyen, pero no se limitan a, los descritos en (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., Ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., Ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., Eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., Eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. Applied Math. 1988, 48: 1073. Los métodos preferidos para determinar la identidad están diseñados para proporcionar el mayor apareamiento entre las secuencias evaluadas. Los métodos para determinar la identidad están codificados en programas informáticos públicamente disponibles. El porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede determinar mediante el uso de un programa informático de análisis (p. ej., Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, Madison Wis.) que incorpora el algoritmo de Needleman y Wunsch, (J. Mol. Biol., 1970, 48: 443-453), (p. ej., NBLAST y XBLAST). Los parámetros predeterminados se usan para determinar la identidad de los polipéptidos de la presente descripción.

Según se usa en la presente memoria, "plásmido" según se usa en la presente memoria se refiere a una secuencia de ADN bicatenaria no cromosómica que incluye un "replicón" intacto para que el plásmido se replique en la célula hospedante.

Según se usa en la presente memoria, el término "vector" o se usa en referencia a un vehículo usado para introducir una secuencia de ácido nucleico exógena en una célula. Un vector puede incluir una molécula de ADN, lineal o circular (p. ej., plásmidos), que incluye un segmento que codifica un polipéptido de interés enlazado funcionalmente con un segmento adicional que permite su transcripción y traducción después de la introducción en una célula hospedante u organelos de la célula hospedante. Dichos segmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y terminadoras, y también puede incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación, etc. Los vectores de expresión derivan generalmente de ADN genómico o plasmídico de levadura o bacterias, o ADN vírico, o pueden contener elementos de ambos.

Según se usa en la presente memoria, "enlazado/a funcionalmente" indica que las secuencias reguladoras útiles para la expresión de las secuencias codificantes de un ácido nucleico se colocan en la molécula de ácido nucleico en las posiciones adecuadas con respecto a la secuencia codificante para provocar la expresión de la secuencia codificante. La misma definición a veces se aplica a la disposición de las secuencias codificantes y los elementos de control de la transcripción (p. ej., promotores, potenciadores y elementos de terminación), y/o marcadores seleccionables en un vector de expresión.

Según se usa en la presente memoria, "natural" es la forma típica de un organismo, variedad, cepa, gen, proteína o característica según se produce en la naturaleza, que se distingue de formas mutantes que pueden resultar de la reproducción o transformación selectiva con un transgén.

Según se usa en la presente memoria, "ADNc" se refiere a una secuencia de ADN que es complementaria a un transcrito de ARN en una célula. Es una molécula hecha por el hombre. Típicamente, el ADNc se hace in vitro mediante una enzima denominada transcriptasa inversa usando transcritos de ARN como plantillas.

Según se usa en la presente memoria, "purificado/a" o "purificar" se usa en referencia a una secuencia de ácido nucleico, péptido o polipéptido que tiene mayor pureza con respecto al entorno natural.

Según se usa en la presente memoria, "diferenciar" o "diferenciación" se refiere al proceso por el cual las células precursoras o progenitoras (p. ej., células progenitoras neuronales) se diferencian en tipos celulares específicos (p. ej., neuronas).

Según se usa en la presente memoria, "dosis", "dosificación unitaria" o "dosificación" se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas para su uso en un sujeto, cada unidad contiene una cantidad predeterminada de la proteína de fusión de CDKL5, una composición que contiene la proteína de fusión de CDKL5 y/o una formulación farmacéutica de esta calculada para producir la respuesta o respuestas deseadas en asociación con su administración.

Según se usa en la presente memoria, "pareja de unión específica" o "pareja de unión" es un compuesto o molécula al cual un segundo compuesto o molécula se une con mayor afinidad que todas las otras moléculas o compuestos.

Según se usa en la presente memoria, "unir específicamente" o "unión específica" se refiere a la unión que se produce entre dichas especies apareadas tales como enzima/sustrato, receptor/agonista o antagonista, anticuerpo/antígeno, lectina/carbohidrato, cebadores de oligo ADN/ADN, enzima o proteína/ADN y/o molécula de ADN con otro ácido nucleico (ADN o ARN) o aminoácido, que puede mediar por interacciones covalentes o no covalentes o una combinación de interacciones covalentes y no covalentes. Cuando la interacción de las dos especies produce un complejo unido no covalentemente, la unión que se produce es típicamente electrostática, unión por hidrógeno o el resultado de interacciones lipófilas. Por consiguiente, la "unión específica" se produce entre una especie apareada donde hay una interacción entre las dos que produce un complejo unido que tiene las características de una interacción anticuerpo/antígeno, enzima/sustrato, ADN/ADN, ADN/ARN, ADN/proteína, ARN/proteína, ARN/aminoácido, receptor/sustrato. En particular, la unión específica se caracteriza por la unión de un miembro de un par a una especie particular y a ninguna otra especie dentro de la familia de compuestos a la cual pertenece el miembro correspondiente del miembro de unión. Por lo tanto, por ejemplo, un anticuerpo se une preferiblemente a un epítipo simple y no a otro epítipo dentro de la familia de proteínas.

Según se usa en la presente memoria, "antiinfeccioso/a" se refiere a compuestos o moléculas que pueden destruir un agente infeccioso o inhibir su propagación. Los antiinfecciosos incluyen, pero no se limitan a, antibióticos, antibacterianos, antifúngicos, antivíricos y antiprotozoicos.

Según se usa en la presente memoria, "natural" es la forma típica de un organismo, variedad, cepa, gen, proteína o característica según se produce en la naturaleza, que se distingue de formas mutantes que pueden resultar de la reproducción o transformación selectiva con un transgén.

Según se usa en la presente memoria "induce", "inducir" o "inducido/a" se refiere a activar o estimular un proceso o vía dentro de una célula, tal como endocitosis, secreción y exocitosis.

Según se usa en la presente memoria, "derivado" se refiere a cualquier compuesto que tiene la misma o una estructura central similar al compuesto, pero que tiene al menos una diferencia estructural que incluye sustituir, eliminar y/o agregar uno o más átomos o grupos funcionales. El término "derivado" no significa que el derivado se sintetiza a partir del compuesto genitor ya sea como material de partida o intermediario, aunque esto puede suceder. El término "derivado" puede incluir profármacos, o metabolitos del compuesto genitor. Los derivados incluyen compuestos en los que grupos amino libres en el compuesto genitor se han derivado para formar clorhidratos de amina, sulfoamidas de p-tolueno, benzoxicarboamidas, t-butiloxicarboamidas, derivados de tipo tiouretano, trifluoroacetilamidas, cloroacetilamidas o formamidas. Los derivados incluyen compuestos en los que grupos carboxilo en el compuesto genitor se han derivado para formar ésteres de metilo y etilo, u otros tipos de ésteres o hidrazidas. Los derivados incluyen compuestos en los que grupos hidroxilo en el compuesto genitor se han derivado para formar derivados de O-acilo u O-alquilo. Los derivados incluyen compuestos en los que un grupo donante de unión hidrógeno en el compuesto genitor se reemplaza con otro grupo donante de unión hidrógeno tal como OH, NH

o SH. Los derivados incluyen reemplazar un grupo aceptor de unión hidrógeno en el compuesto genitor con otro grupo aceptor de unión hidrógeno tal como ésteres, éteres, cetonas, carbonatos, aminas terciarias, iminas, tionas, sulfonas, amidas terciarias y sulfuros. "Derivados" también incluye extensiones del reemplazo del anillo de ciclopentano con ciclohexano saturado o insaturado u otro más complejo, p. ej., anillos que contienen nitrógeno y extensiones de estos anillos con diversos grupos laterales.

Según se usa en la presente memoria, "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de una proteína de fusión de CDKL5, una composición que contiene una proteína de fusión de CDKL5, una formulación farmacéutica de esta, agente auxiliar o agente secundario descritos en la presente memoria que desencadenará una respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o humano que busca el investigador, veterinario, médico u otro profesional sanitario. "Cantidad terapéuticamente eficaz" incluye dicha cantidad de una proteína de fusión de CDKL5, una composición que contiene una proteína de fusión de CDKL5, una formulación farmacéutica de esta que, cuando se administra sola o se coadministra con un agente secundario, es suficiente para evitar el desarrollo de, reducir o aliviar en alguna medida, uno o más de los síntomas de la deficiencia de CDKL5 y/o síndrome de Rett. "Cantidad de efecto terapéuticamente" incluye dicha cantidad de una proteína de fusión de CDKL5, una composición que contiene una proteína de fusión de CDKL5, una formulación farmacéutica de esta que, cuando se administra sola o se coadministra con un agente secundario, es suficiente para aumentar la supervivencia neuronal, la cantidad de neuronas, el crecimiento, alargamiento y/o densidad de ramificaciones axónico en una región del cerebro de un sujeto en comparación con un testigo. "Cantidad de efecto terapéuticamente" incluye dicha cantidad de una proteína de fusión de CDKL5, una composición que contiene una proteína de fusión de CDKL5, una formulación farmacéutica de esta que, cuando se administra sola o se coadministra con un agente secundario, es suficiente para aumentar la capacidad de aprendizaje en un sujeto en comparación con un testigo. "Cantidad de efecto terapéuticamente" incluye dicha cantidad de una proteína de fusión de CDKL5, una composición que contiene una proteína de fusión de CDKL5, una formulación farmacéutica de esta que, cuando se administra sola o se coadministra con un agente secundario, es suficiente para aumentar la capacidad de memoria en un sujeto en comparación con un testigo. "Cantidad de efecto terapéuticamente" incluye dicha cantidad de una proteína de fusión de CDKL5, una composición que contiene una proteína de fusión de CDKL5, una formulación farmacéutica de esta que, cuando se administra sola o se coadministra con un agente secundario, es suficiente para mejorar la motricidad en un sujeto en comparación con un testigo. "Cantidad de efecto terapéuticamente" incluye dicha cantidad de una proteína de fusión de CDKL5, una composición que contiene una proteína de fusión de CDKL5, una formulación farmacéutica de esta que, cuando se administra sola o se coadministra con un agente secundario, es suficiente para restablecer la capacidad de aprendizaje, la capacidad de memoria y/o la motricidad hasta niveles que son sustancialmente similares a los niveles naturales o normales. "Cantidad de efecto terapéuticamente" incluye dicha cantidad de una proteína de fusión de CDKL5, una composición que contiene una proteína de fusión de CDKL5, una formulación farmacéutica de esta que, cuando se administra sola o se coadministra con un agente secundario, es suficiente para restablecer la cantidad de neuronas, la supervivencia neuronal, el crecimiento axónico, el alargamiento axónico, la cantidad de ramificaciones axónicas y/o la densidad de ramificaciones axónicas en una región del cerebro hasta niveles que son sustancialmente similares a los niveles naturales o normales. La cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo de la estructura química exacta de la proteína de fusión de CDKL5, una composición que contiene una proteína de fusión de CDKL5, una formulación farmacéutica de esta, la deficiencia de CDKL5, el síndrome de Rett o síntoma de este que se va a tratar, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación con fármacos, la opinión del médico tratante, la forma de dosificación y la edad, peso, salud general, sexo y/o dieta del sujeto que se va a tratar.

Según se usa en la presente memoria, "efecto sinérgico" o "sinergia" se refiere a un efecto que surge entre dos o más moléculas, compuestos, sustancias, factores o composiciones que es mayor o diferente que la suma de sus efectos individuales.

Según se usa en la presente memoria, "efecto aditivo" se refiere a un efecto que surge entre dos o más moléculas, compuestos, sustancias, factores o composiciones que es igual o el mismo que la suma de sus efectos individuales.

A menos que se definan de cualquier otra manera en la presente memoria, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica.

Discusión

Genes y proteínas de fusión TATk-CDKL5

Genes y proteínas de fusión

En la presente memoria se describen secuencias de ADNc recombinantes que codifican diversas proteínas de fusión de CDKL5 que contienen una secuencia de TAT modificada (TATk). En una realización, la proteína de fusión contiene un polipéptido de CDKL5 humano acoplado funcionalmente a un polipéptido de TATk. La secuencia de ADNc, que codifica la proteína de fusión de CDKL5, puede tener una secuencia según una cualquiera de las SEQ ID NOs: 2, 7, 9, 11, 13, o una variante de estas descrita en la presente memoria. La proteína de fusión de CDKL5

puede tener una secuencia polipeptídica según una cualquiera de las SEQ ID NOs: 8, 10, 12, 14, o una variante de estas descrita en la presente memoria.

En algunas realizaciones, la secuencia de ADNc de CDKL5 humana puede ser según la SEQ ID NO: 1 o 15. En realizaciones adicionales, el ADNc de CDKL5 humano puede ser aproximadamente 90 % a aproximadamente 100 %, 80 % a aproximadamente 90 %, o aproximadamente 50 % a aproximadamente 80 % idéntico a la SEQ ID NO: 1 o 15. En algunas realizaciones, la secuencia de ADNc de CDKL5 humana puede codificar una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2 o 16. En realizaciones adicionales, la secuencia de ADNc de CDKL5 humana puede codificar una secuencia de aminoácidos que es aproximadamente 90 % a aproximadamente 100 %, 80 % a aproximadamente 90 %, o aproximadamente 50 % a aproximadamente 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 o 16.

En algunas realizaciones, la secuencia de ADNc de CDKL5 humana puede ser un fragmento de al menos 12 nucleótidos consecutivos que son aproximadamente 90 % a 100 % idénticos a 12 nucleótidos consecutivos en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de ADNc de CDKL5 humana puede ser un fragmento de al menos 12 nucleótidos consecutivos que son aproximadamente 80 % a 90 % idénticos a 12 nucleótidos consecutivos en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de ADNc puede ser un fragmento de al menos 12 nucleótidos consecutivos que son aproximadamente 50 % a 80 % idénticos a 12 nucleótidos consecutivos en la SEQ ID NO: 1.

La proteína de fusión de CDKL5 contiene un dominio de transducción de proteína (PTD, por sus siglas en inglés) de activación de transcripción por acción trans (TAT, por sus siglas en inglés) modificado (de aquí en adelante en la presente memoria TATk) acoplado funcionalmente con el polipéptido de CDKL5 humano. El TATk puede tener una secuencia de ADNc según la SEQ ID NO: 3 y una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 4. TATk es un TAT-PTD modificado. El TAT-PTD no modificado media las transducciones de péptidos y proteínas en células. Sin embargo, el TAT-PTD no modificado no permite que las proteínas de fusión de TAT-PTD sean secretadas por la célula. El TAT-PTD no modificado se escinde de la proteína de fusión mediante la endoproteasa furina en secuencias de reconocimiento de furina ubicadas dentro del TAT-PTD no modificado. En cambio, el TATk se modifica de manera que no contiene las secuencias de reconocimiento de furina. De este modo, las proteínas de fusión de CDKL5 descritas en la presente memoria contienen TATk que puede secretarse en su forma completa a partir de células eucariotas.

En algunas realizaciones, la secuencia de ADNc de TATk puede ser aproximadamente 90 % a 100 % o aproximadamente 80 % a aproximadamente 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el ADNc de TATk puede codificar una secuencia polipeptídica que es aproximadamente 90 % a 100 % o aproximadamente 80 % a aproximadamente 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 4.

La proteína de fusión de CDKL5 puede contener opcionalmente una secuencia líder de cadena de Igk para dirigir al polipéptido por la vía de secreción durante la producción por una célula. En algunas realizaciones, la secuencia líder de cadena de Igk puede estar funcionalmente acoplada en el extremo N del polipéptido de CDKL5 humano. La secuencia líder de cadena de Igk puede tener una secuencia de ADNc según la SEQ ID NO: 5 o una variante de esta descrita en la presente memoria y puede tener una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 6 o variante de esta descrita en la presente memoria.

En otras realizaciones, el ADNc de la secuencia líder de cadena de Igk puede ser aproximadamente 90 % a 100 %, aproximadamente 80 % a aproximadamente 90 %, o aproximadamente 80 % a 90 % idéntico a la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la secuencia líder de cadena de Igk puede tener una secuencia de aminoácidos que es aproximadamente 90 % a aproximadamente 100 %, aproximadamente 80 % a aproximadamente 90 %, o aproximadamente 50 % a aproximadamente 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 6.

La proteína de fusión de CDKL5 puede contener opcionalmente una o más etiquetas proteicas acopladas funcionalmente a la proteína de fusión de CDKL5. Estos tipos de etiquetas son secuencias de aminoácidos que posibilitan la purificación por afinidad, solubilización, separación cromatográfica e/o inmunodetección de la proteína de fusión. Las etiquetas proteicas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, proteína de unión a quitina (CBP, por sus siglas en inglés), proteína de unión a maltosa (MBP, por sus siglas en inglés), glutatión-S-transferasa (GST, por sus siglas en inglés), poli(His), tiorredoxina (TRX, por sus siglas en inglés), poli(NANP), etiqueta FLAG (incluida cualquier variante de la etiqueta FLAG, p. ej., 3x FLAG), etiqueta V5, etiqueta Myc, etiqueta HA, etiqueta S, etiqueta SBP, Sftag 1, Softag 3, etiqueta Tc, etiqueta Xpress, etiqueta Strep, etiqueta Isopep, etiqueta Spy, etiqueta Ty, proteína portadora de biotina carboxilo (BCCP, por sus siglas en inglés) y etiqueta Nus. Un ADNc de proteína de fusión de CDKL5 según la SEQ ID NO: 7, 9 u 11 que tiene una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 8, 10 o 12, respectivamente, demuestra realizaciones no limitantes de una proteína de fusión de CDKL5 que contiene un TATk, y una etiqueta Myc y una etiqueta poli(HIS). Un ADNc de proteína de fusión de CDKL5 según la SEQ ID NO: 13, que tiene una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 14 demuestra una realización no limitante de una proteína de fusión de CDKL5 que tiene una etiqueta FLAG.

La proteína de fusión de CDKL5 puede contener opcionalmente una o más proteínas indicadoras acopladas funcionalmente con el polipéptido de CDKL5. Los genes indicadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, proteínas fluorescentes (p. ej., proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés), proteína roja fluorescente

(RFP, por sus siglas en inglés), proteína amarilla fluorescente (YFP, por sus siglas en inglés), proteína azul fluorescente (BFP, por sus siglas en inglés) y proteína cian fluorescente (CFP, por sus siglas en inglés)), beta-galactosidasa, luciferasa (bacteriana, de luciérnaga y renilla luciferasa), genes de resistencia a antibióticos (p. ej., cloranfenicol acetiltransferasa, neomicina fosfotransferasa y NPT-II), p-glucuronidasa y fosfatasa alcalina. La inclusión de una proteína indicadora posibilita, *inter alia*, la caracterización directa e/o indirecta de la proteína de fusión y la función de la proteína de fusión, así como la purificación por afinidad de la proteína. La proteína indicadora puede estar funcionalmente enlazada al extremo N y/o el extremo C del polipéptido de CDKL5 humano. En otras realizaciones, la proteína indicadora puede estar funcionalmente enlazada al extremo y/o el extremo C de la proteína de fusión de CDKL5. Un ADNc de proteína de fusión de CDKL5 según la SEQ ID NO: 9, u 11 y que tiene una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 8 o 10, respectivamente, demuestra realizaciones no limitantes de una proteína de fusión de CDKL5 que contiene una proteína indicadora fluorescente.

Vectores recombinantes

La secuencia de ADNc de fusión de CDKL5 se puede incorporar en un vector de expresión adecuado. El vector de expresión puede contener una o más secuencias reguladoras o una o más secuencias distintas usadas para facilitar la expresión del ADNc de fusión de CDKL5. El vector de expresión puede contener una o más secuencias reguladoras o una o más secuencias distintas usadas para facilitar la replicación del vector de expresión de la fusión de CDKL5. El vector de expresión puede ser adecuado para expresar la proteína de fusión de CDKL5 en una célula bacteriana. En otras realizaciones, el vector de expresión puede ser adecuado para expresar la proteína de fusión de CDKL5 en una célula de levadura. En realizaciones adicionales, el vector de expresión puede ser adecuado para expresar la proteína de fusión de CDKL5 en una célula vegetal. En otras realizaciones, el vector de expresión puede ser adecuado para expresar la proteína de fusión de CDKL5 en una célula de mamífero. En otra realización, el vector puede ser adecuado para expresar la proteína de fusión de CDKL5 en una célula fúngica. Los vectores de expresión adecuados se conocen generalmente en la técnica.

Producción de la proteína TATk-CDKL5

En algunas realizaciones, la proteína de fusión de CDKL5 se produce *in vitro* en un sistema de cultivo celular. El sistema de cultivo celular puede contener una o más células bacterianas, de levadura, fúngicas, vegetales o de mamífero. En algunas realizaciones, la(s) célula(s) cultivada(s) secreta la proteína de fusión de CDKL5 en los medios de cultivo celular. En otras realizaciones, la proteína de fusión de CDKL5 está contenida dentro del citoplasma o una membrana de la(s) célula(s) cultivada(s).

Tras decir esto, dirigimos la atención hacia la Figura 1, que muestra una realización de un método para producir una proteína de fusión de CDKL5, en donde la proteína de fusión de CDKL5 se produce a partir de las células cultivadas y se secreta en los medios de cultivo circundantes. El método comienza al transfectar o suministrar de cualquier otra manera un vector adecuado que contiene una secuencia de ADNc de proteína de fusión de CDKL5 en una célula o células en cultivo (6000). A continuación, las células se cultivan (6010) usando métodos generalmente conocidos para posibilitar que las células transfectadas produzcan la proteína de fusión de CDKL5 a partir del vector y secreten la proteína de fusión de CDKL5 en los medios de cultivo celular circundantes. Después de una cantidad de tiempo adecuada, se recogen los medios de cultivo que contienen la proteína de fusión de CDKL5 (6020). En algunas realizaciones, las células se cultivan de aproximadamente 12 h a aproximadamente 96 h. En este punto, se determina si la proteína de fusión de CDKL5 necesita o no purificarse adicionalmente de los medios de cultivo (6030). En algunas realizaciones, los medios que contienen la proteína de fusión de CDKL5 no se purifican adicionalmente y se usan directamente para transducir una o más células (6050). En otras realizaciones, la proteína de fusión de CDKL5 se purifica adicionalmente y/o concentra en los medios de cultivo. En algunas realizaciones, la proteína de fusión de CDKL5 se purifica y/o concentra usando un método adecuado. Los métodos adecuados incluyen, pero no se limitan a, purificación por afinidad, separación por exclusión por tamaño y métodos de separación cromatográfica.

Con una comprensión de un método de producción por secreción en mente, dirigimos la atención hacia la Figura 2, que muestra una realización de un método para producir una proteína de fusión de CDKL5, en donde la proteína de fusión de CDKL5 no se secreta en los medios de cultivo celular circundantes. El método comienza al transfectar o suministrar de cualquier otra manera un vector adecuado que contiene una secuencia de ADNc de proteína de fusión de CDKL5 en una célula o células en cultivo (6000). A continuación, las células se cultivan (6010) usando métodos generalmente conocidos para posibilitar que las células transfectadas produzcan la proteína de fusión de CDKL5 a partir del vector. Después de una cantidad de tiempo adecuado, las células se lisan usando métodos estándares (7000). En algunas realizaciones, las células se cultivan de 12 h a 96 h antes de lissarlas.

A continuación, se determina si la proteína de fusión de CDKL5 está integrada dentro de la membrana celular o el citoplasma (7010). Si la proteína de fusión de CDKL5 está en la fracción de membrana, a continuación, se recoge la fracción de membrana (7020). Después de que se recoge la fracción de membrana (7020), la proteína de fusión de CDKL5 se separa de la fracción de membrana usando un método adecuado (6040) para purificar y/o concentrar la proteína de fusión de CDKL5.

En realizaciones donde la proteína de fusión de CDKL5 está presente en el citoplasma, se recoge el sobrenadante que contiene la proteína de fusión de CDKL5 (7030). Después de que se recoge el sobrenadante (7030), se determina si la proteína de fusión de CDKL5 debe purificarse y/o concentrarse adicionalmente. Si se determina que la proteína de fusión de CDKL5 debe purificarse y/o concentrarse adicionalmente, a continuación, la proteína de fusión de CDKL5 se purifica y/o concentra usando un método adecuado (6040). Los métodos adecuados incluyen, pero no se limitan a, purificación por afinidad, separación por exclusión por tamaño y métodos de separación cromatográfica. En otras realizaciones donde se determina que la CDKL5 no debe purificarse ni concentrarse adicionalmente del sobrenadante, el sobrenadante que contiene la proteína de fusión de CDKL5 se usa directamente para transducir células (6050).

10 Composiciones y formulaciones que contienen la proteína de fusión TATk-CDKL5

También dentro del alcance de la presente descripción están composiciones y formulaciones que contienen la proteína de fusión de CDKL5 según se describe en la presente memoria. La composición puede ser los medios o el sobrenadante que contiene la proteína de fusión de CDKL5 que se puede producir según un método descrito en la presente memoria.

- 15 Las proteínas de fusión de CDKL5 descritas en la presente memoria se pueden proporcionar a un sujeto que lo necesita solas o como un ingrediente activo, en una formulación farmacéutica. De este modo, también se describen en la presente memoria formulaciones farmacéuticas que contienen una cantidad de una proteína de fusión de CDKL5. En algunas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de CDKL5. Las formulaciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se pueden
- 20 administrar a un sujeto que lo necesita. El sujeto que lo necesita puede padecer una deficiencia de CDKL5, síndrome de Rett y/o un síntoma de estos. En otras realizaciones, la proteína de fusión de CDKL5 se puede usar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una deficiencia de CDKL5, síndrome de Rett y/o un síntoma de estos.

Portadores farmacéuticamente aceptables e ingredientes auxiliares y agentes

- 25 Las formulaciones farmacéuticas que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de CDKL5 descrita en la presente memoria pueden incluir, además, un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, disoluciones de sal, alcoholes, goma arábiga, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, polietilenglicoles, gelatina, carbohidratos tales como lactosa, amilosa o almidón, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, ésteres de ácido graso, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona, que no hacen reacción de manera nociva con la composición activa.
- 30

Las formulaciones farmacéuticas se pueden esterilizar, y si de desea, mezclar con agentes auxiliares, tales como lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir sobre la presión osmótica, tampones, sustancias colorantes, saborizantes y/o aromáticas y similares, que no hacen reacción de manera nociva con la composición activa.

- 35 Además de la cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de CDKL5 descrita en la presente memoria, la formulación farmacéutica también puede incluir una cantidad eficaz de un agente activo auxiliar que incluye, pero no se limita a, ADN, ARN, aminoácidos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos, aptámeros, ribozimas, secuencias guía para ribozimas que inhiben la traducción o transcripción de proteínas y genes tumorales esenciales, hormonas, inmunomoduladores, antipiréticos, ansiolíticos, antipsicóticos, analgésicos, antiespasmódicos, antiinflamatorios, antihistamínicos, antiinfecciosos y quimioterapéuticos.
- 40

Las hormonas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, hormonas derivadas de aminoácidos (p. ej., melatonina y tiroxina), hormonas peptídicas pequeñas y hormonas proteicas (p. ej., hormona liberadora de tirotropina, vasopresina, insulina, hormona de crecimiento, hormona luteinizante, hormona estimulante de foliculo y hormona estimulante de la tiroides), eiconsanoides (p. ej., ácido araquidónico, lipoxinas y prostaglandinas), y hormonas esteroides (p. ej., estradiol, testosterona, tetrahidro testosterona cortisol).

- 45 Los inmunomoduladores adecuados incluyen, pero no se limitan a, prednisona, azatioprina, 6-MP, ciclosporina, tacrolimus, metotrexato, interleucinas (p. ej., IL-2, IL-7 y IL-12), citocinas (p. ej., interferones (p. ej., IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω y IFN- γ), factor estimulante de colonias de granulocitos e imiquimod), quimiocinas (p. ej., CCL3, CCL26 y CXCL7), citosina fosfato-guanosina, oligodesoxinucleótidos, glucanos, anticuerpos y aptámeros).
- 50

Los antipiréticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, antiinflamatorios no esteroides (p. ej., ibuprofeno, naproxeno, cetoprofeno y nimesulida), aspirina y salicilatos relacionados (p. ej., salicilato de colina, salicilato de magnesio y salicilato de sodio), paracetamol/acetaminofeno, metamizol, nabumetona, fenazona y quinina.

- 55 Los ansiolíticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, benzodiazepinas (p. ej., alprazolam, bromazepam, clordiazepóxido, clonazepam, clorazepato, diazepam, flurazepam, lorazepam, oxazepam, temazepam, triazolam y tofisopam), antidepresivos serotoninérgicos (p. ej., inhibidores de la recaptación de serotonina selectivos,

antidepresivos tricíclicos e inhibidores de monoamina oxidasa), mebicar, afobazol, selank, bromantano, emoxipina, azapironas, barbitúricos, hidroxizina, pregabalina, validol y bloqueantes beta.

Los antipsicóticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, benperidol, bromoperidol, droperidol, haloperidol, moperona, pipaperona, timiperona, fluspirileno, penfluridol, pimozida, acepromazina, clorpromazina, ciamemazina, dicirazina, flufenazina, levomepromazina, mesoridazina, perazina, periciazina, perfenazina, pipotiazina, proclorperazina, promazina, prometazina, protipendilo, tioproperazina, tioridazina, trifluoperazina, trifluopromazina, clorprotixeno, clopentixol, flupentixol, tiotixeno, zuclopentixol, clotiapina, loxapina, protipendilo, carpipramina, clocapramina, molindona, mosapramina, sulpirida, veraliprida, amisulprida, amoxapina, aripiprazol, asenapina, clozapina, blonanserina, iloperidona, lurasidona, melperona, nemonaprida, olanzapina, paliperidona, perospirona, quetiapina, remoxiprida, risperidona, sertindol, trimipramina, ziprasidona, zotepina, alstonia, befeprunox, bitopertina, brexpiprazol, cannabidiol, cariprazina, pimavanserina, pomaglumetad metionil, vabicaserina, xanomelina y zicronapina.

Los analgésicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, paracetamol/acetaminofeno, antiinflamatorios no esteroides (p. ej., ibuprofeno, naproxeno, cetoprofeno y nimesulida), inhibidores de COX-2 (p. ej., rofecoxib, celecoxib y etoricoxib), opiáceos (p. ej., morfina, codeína, oxicodona, hidrocodona, dihidromorfina, petidina, buprenorfina), tramadol, norepinefrina, flupiretina, nefopam, orfenadrina, pregabalina, gabapentina, ciclobenzaprina, escopolamina, metadona, cetobemidona, piritramida y aspirina y salicilatos relacionados (p. ej., salicilato de colina, salicilato de magnesio y salicilato de sodio).

Los antiespasmódicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, mebeverina, papverina, ciclobenzaprina, carisoprodol, orfenadrina, tizanidina, metaxalona, metodcarbamol, cloroxazona, baclofeno, dantroleno, baclofeno, tizanidina y dantroleno.

Los antiinflamatorios adecuados incluyen, pero no se limitan a, prednisona, antiinflamatorios no esteroides (p. ej., ibuprofeno, naproxeno, cetoprofeno y nimesulida), inhibidores de COX-2 (p. ej., rofecoxib, celecoxib y etoricoxib) y derivados antiinflamatorios selectivos inmunitarios (p. ej., péptido T de la glándula submandibular y sus derivados).

Las antihistamínicos adecuadas incluyen, pero no se limitan a, antagonistas del receptor de H₁ (p. ej., acrivastina, azelastina, bilastina, bromfeniramina, buclizina, bromodifenhidramina, carbinoxamina, cetirizina, clorpromazina, ciclizina, clorfeniramina, clemastina, ciproheptadina, desloratadina, dexbromafeniramina, dexclorfeniramina, dimenhidrinato, dimetindeno, difenhidramina, doxilamina, ebasina, embramina, fexofenadina, hidroxizina, levocetirizina, loratadina, meclozina, mirtazapina, olopatadina, orfenadrina, fenindamina, feniramina, feniltoloxamina, prometazina, pirilamina, quetiapina, rupatadina, tripeleminamina y triprolidina), antagonistas del receptor de H₂ (p. ej., cimetidina, famotidina, lafutidina, nizatidina, ranitidina y roxatidina), tritocualina, catequina, cromoglicato, nedocromil y agonistas β₂-adrenérgicos.

Los antiinfecciosos adecuados incluyen, pero no se limitan a, amebicidas (p. ej., nitazoxanida, paromomicina, metronidazol, tinidazol, cloroquina, miltefosina, anfotericina b y yodoquinol), aminoglicósidos (p. ej., paromomicina, tobramicina, gentamicina, amicacina, canamicina y neomicina), antihelmínticos (p. ej., pirantel, mebendazol, ivermectina, praziquantel, abendazol, tiabendazol, oxamniquina), antifúngicos (p. ej., antifúngicos de azol (p. ej., itraconazol, fluconazol, posaconazol, cetoconazol, clotrimazol, miconazol y voriconazol), equinocandinas (p. ej., caspofungina, anidulafungina y micafungina), griseofulvina, terbinafina, flucitosa y polienos (p. ej., nistatina y anfotericina b), agentes antimaláricos (p. ej., pirimetamina/sulfadoxina, artemeter/lumefantrina, atovuacuna/procuaniol, quinina, hidroxicloroquina, mefloquina, cloroquina, doxiciclina, pirimetamina y halofantrina), agentes antituberculosis (p. ej., aminosalicilatos (p. ej., ácido aminosalicílico), isoniazid/rifampina, isoniazid/pirazinamida/rifampin, bedaquilina, isoniazid, etambutol, rifampina, rifabutina, rifapentina, capreomicina y cicloserina), antivíricos (p. ej., amantadina, rimantadina, abacavir/lamivudina, emtricitabina/tenofovir, cobicistat/elvitegravir/emtricitabina/tenofovir, efavirenz/emtricitabina/tenofovir, avacavir/lamivudina/zidovudina, lamivudina/zidovudina, emtricitabina/tenofovir, emtricitabina/opinavir/ritonavir/tenofovir, interferón alfa-2v/ribavirina, peginterferón alfa-2b, maraviroc, raltegravir, dolutegravir, enfuvirtida, foscarnet, fomivirsén, oseltamivir, zanamivir, nevirapina, efavirenz, etravirina, rilpivirina, delaviridina, nevirapina, entecavir, lamivudina, adefovir, sofosbuvir, didanosina, tenofovir, avacavir, zidovudina, estavudina, emtricitabina, xalcitabina, telbivudina, simeprevir, boceprevir, telaprevir, lopinavir/ritonavir, fosamprenvir, dranuavir, ritonavir, tipranavir, atazanavir, nelfinavir, amprenavir, indinavir, sawuina, ribavirin, valciclovir, aciclovir, famciclovir, ganciclovir y valganciclovir), carbapenémicos (p. ej., doripenem, meropenem, ertapenem y cilastatina/imipenem), cefalosporinas (p. ej., cefadroxil, cefradina, cefazolina, cefalexina, cefepima, ceflarolina, loracarbef, cefotaxima, cefuroxime, cefprozil, loracarbef, cefoxitina, cefaclor, ceftibuten, ceftriaxona, cefotaxima, cefpodoxima, cefdinir, cefixima, cefditoren, cefizoxima, y ceftazidima), antibióticos glicopeptídicos (p. ej., vancomicina, dalbavancina, oritavancina y telvancina), gliciliclinas (p. ej., tigeciclina), leprostáticos (p. ej., clofazimina y talidomida), lincomicina y derivados de esta (p. ej., clindamicina y lincomicina), macrólidos y derivados de estos (p. ej., telitromicina, fidaxomicina, ertromicina, azitromicina, claritromicina, diritromicina y troleandomicina), linezolid, sulfametoxazol/trimetoprim, rifaximin, cloranfenicol, fosfomicina, metronidazol, aztreonam, bacitracina, penicilinas (amoxicilina, ampicilina, bacampicilina, carbenicilina, piperacilina, ticarcilina, amoxicilina/clavulanato, ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam, clavulanato/ticarcilina, penicilina, procaína penicilina, oxaxilina, dicloxacilina y nafcilina), quinolonas (p. ej., lomefloxacin, norfloxacin, ofloxacin, cuatifloxacin, moxifloxacin, ciprofloxacina, levofloxacin, gemifloxacin, moxifloxacin, cinoxacin, ácido nalidíxico,

enoxacina, grepafloxacina, gatifloxacina, trovafloxacina y esparfloxacina), sulfonamidas (p. ej., sulfametoxazol/trimetoprima, sulfasalazina y sulfasoxazol), tetraciclinas (p. ej., doxiciclina, demeclociclina, minociclina, doxiciclina/ácido salicílico, doxiciclina/ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y tetraciclina) y antiinfecciosos urinarios (p. ej., nitrofurantoína, metenamina, fosfomicina, cinoxacina, ácido nalidíxico, trimetoprima y azul de metileno).

Los quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, apaclitaxel, brentuximab vedotin, doxorubicina, 5-FU (fluorouracilo), everolimus, pemetrexed, melfalán, pamidronato, anastrozol, exemestano, nelarabina, ofatumumab, bevacizumab, belinostat, tositumomab, carmustina, bleomicina, bosutinib, busulfán, alemtuzumab, irinotecan, vandetanib, bicalutamida, lomustina, daunorubicina, clofarabina, cabozantinib, dactinomicina, ramucirumab, citarabina, citoxán, ciclofosfamida, decitabina, dexametasona, docetaxel, hidroxiurea, decarbazina, leuprolida, epirubicina, oxaliplatino, asparaginasa, estramustina, cetuximab, vismodegib, asparaginasa Erwinia chrysanthemi, amifostina, etopósido, flutamida, toremifeno, fulvestrant, letrozol, degarelix, pralatrexato, metotrexato, floxuridina, obinutuzumab, gemcitabina, afatinib, imatinib mesilato, carmustina, eribulin, trastuzumab, altretamina, topotecan, ponatinib, idarubicina, ifosfamida, ibrutinib, axitinib, interferón alfa-2a, gefitinib, romidepsina, ixabepilona, ruxolitinib, cabazitaxel, ado-trastuzumab emtansina, carfilzomib, clorambucil, sargramostim, cladribina, mitotano, vincristina, procarbazona, megestrol, trametinib, mesna, cloruro de estroncio-89, mecloretamina, mitomicina, busulfán, gemtuzumab ozogamicina, vinorelbina, filgrastim, pegfilgrastim, sorafenib, nilutamida, pentostatina, tamoxifeno, mitoxantrona, pegaspargasa, denileucina diftotox, alitretinoína, carboplatino, pertuzumab, cisplatino, pomalidomida, prednisona, aldesleucina, mercaptopurina, ácido zoledrónico, lenalidomida, rituximab, octretida, dasatinib, regorafenib, histrelina, sunitinib, siltuximab, omacetaxina, tioguanina (tioguanina), dabrafenib, erlotinib, bexaroteno, temozolomida, tiotepa, talidomida, BCG, temsirolimus, clorhidrato de bendamustina, triptorelina, trióxido de arsénio, lapatinib, valrubicina, panitumumab, vinblastina, bortezomib, tretinoína, azacitidina, pazopanib, teniposida, leucovorina, crizotinib, capecitabina, enzalutamida, ipilimumab, goserelina, vorinostat, idelalisib, ceritinib, abiraterona, epotilona, tafluposida, azatioprina, doxifluridina, vindesina y ácido todo trans retinoico.

25 Cantidades eficaces de la proteína de fusión de CDKL5 y agentes auxiliares

Las formulaciones farmacéuticas pueden contener una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de CDKL5 y, opcionalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente auxiliar. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de CDKL5 puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. En realizaciones adicionales, la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión de CDKL5 puede variar de 1 ng/g de peso corporal a aproximadamente 0,1 mg/g de peso corporal. La cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión de CDKL5 puede variar de aproximadamente 1 pg a aproximadamente 10 g. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión de CDKL5 o composición farmacéutica que contiene la proteína de fusión de CDKL5 puede variar de aproximadamente 10 nL a aproximadamente 10 mL.

Para algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz puede ser de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 ng por inyección, tal como para una inyección intraventricular. En otras realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz puede ser de aproximadamente 10 microlitros por inyección, tal como para inyección intraventricular. En realizaciones adicionales, la cantidad terapéuticamente eficaz puede ser de aproximadamente 5 ng/µL, tal como para inyección intraventricular. En otras realizaciones adicionales, la cantidad terapéuticamente eficaz puede ser de aproximadamente 1,9 µg/kg de peso corporal para inyección intraventricular.

En otras realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 microgramos por inyección, tal como para una inyección administrada sistémicamente. En realizaciones adicionales, la cantidad terapéuticamente eficaz puede ser de aproximadamente 200 a aproximadamente 300 µL por inyección, tal como para una inyección administrada sistémicamente. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz puede ser de aproximadamente 5 ng/µL, tal como para inyecciones sistémicas. Para algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5 µg por 5 g de peso corporal. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz puede ser de aproximadamente 200 µg a aproximadamente 300 µg por kg de peso corporal.

En realizaciones donde hay un agente activo auxiliar contenido en la formulación farmacéutica además de la proteína de fusión de CDKL5, la cantidad terapéuticamente eficaz del agente activo auxiliar variará dependiendo del agente activo auxiliar. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz del agente activo auxiliar varía de aproximadamente 0,001 microgramos a aproximadamente 1 miligramo. En otras realizaciones, la cantidad eficaz del agente activo auxiliar varía de aproximadamente 0,01 UI a aproximadamente 1000 UI. En realizaciones adicionales, la cantidad eficaz del agente activo auxiliar varía de 0,001 mL a aproximadamente 1 mL. En todavía otras realizaciones, la cantidad eficaz del agente activo auxiliar varía de aproximadamente 1 % p/p a aproximadamente 50 % p/p de la formulación farmacéutica total. En realizaciones adicionales, la cantidad eficaz del agente activo auxiliar varía de aproximadamente 1 % v/v a aproximadamente 50 % v/v de la formulación farmacéutica total. En todavía otras realizaciones, la cantidad eficaz del agente activo auxiliar varía de aproximadamente 1 % p/v a aproximadamente 50 % p/v de la formulación farmacéutica total.

Formas de dosificación

En algunas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden estar en una forma de dosificación. Las formas de dosificación se pueden adaptar para administración a través de cualquier vía adecuada. Las vías adecuadas incluyen, pero no se limitan a, oral (incluida bucal o sublingual), rectal, epidural, intracraneal, intraocular, inhalada, intranasal, tópica (incluida bucal, sublingual o transdérmica), vaginal, intrauretral, parenteral, intracraneal, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, intraósea, intracárdica, intraarticular, intracavernosa, intratecal, intavireal, intracerebral e intracerebroventricular e intradérmica. Dichas formulaciones se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica.

Las formas de dosificación adaptadas para administración oral pueden ser unidades de dosificación diferenciadas tales como cápsulas, miniesferas o comprimidos, polvo o gránulos, disoluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; espumas comestibles o batidos, o en emulsiones líquidas de aceite en agua o emulsiones líquidas de agua en aceite. En algunas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración oral también incluyen uno o más agentes que saborizan, conservan, colorean o ayudan a dispersar la formulación farmacéutica. Las formas de dosificación preparadas para administración oral también pueden estar en forma de una disolución líquida que se puede suministrar como una espuma, pulverización o disolución líquida. En algunas realizaciones, la forma de dosificación oral puede contener aproximadamente 1 ng a 1000 g de una formulación farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz o una fracción adecuada de esta de la proteína de fusión de CDKL5 o composición que contiene la proteína de fusión de CDKL5. La forma de dosificación oral se puede administrar a un sujeto que lo necesita.

Cuando sea adecuado, las formas de dosificación descritas en la presente memoria se pueden microencapsular. La forma de dosificación también se puede preparar para prolongar o mantener la liberación de cualquier ingrediente. En algunas realizaciones, la proteína de fusión de CDKL5 es el ingrediente cuya liberación se retarda. En otras realizaciones, se retarda la liberación de un ingrediente auxiliar incluido opcionalmente. Los métodos adecuados para retardar la liberación de un ingrediente incluyen, pero no se limitan a, recubrir o incrustar los ingredientes en material en polímeros, cera, geles y similares. Las formulaciones de dosificación de liberación retardada se pueden preparar según se describe en las referencias estándares tales como "Pharmaceutical dosage form tablets", eds. Liberman et. al. (Nueva York, Marcel Dekker, Inc., 1989), "Remington - The science and practice of pharmacy", 20a ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000, y "Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems", 6a edición, Ansel et al., (Media, PA: Williams and Wilkins, 1995). Estas referencias proporcionan información sobre excipientes, materiales, equipo y procesos para preparar comprimidos y cápsulas y formas de dosificación de liberación retardada de comprimidos y microesferas, cápsulas y gránulos. La liberación retardada puede ser de aproximadamente una hora a aproximadamente 3 meses o más.

Los ejemplos de materiales de recubrimiento adecuados incluyen, pero no se limitan a, polímeros de celulosa tales como acetato ftalato de celulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa y acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa; acetato ftalato de polivinilo, polímeros y copolímeros de ácido acrílico y resinas metacrílicas que están disponibles comercialmente con el nombre comercial EUDRAGIT® (Roth Pharma, Westerstadt, Alemania), zeína, goma laca y polisacáridos.

Los recubrimientos se pueden formar con una relación diferente de polímero soluble en agua, polímeros insolubles en agua y/o polímeros dependientes del pH, con o sin excipiente no polimérico insoluble en agua/soluble en agua, para producir el perfil de liberación deseado. El recubrimiento se lleva a cabo sobre la forma de dosificación (matriz o simple) que incluye, pero no se limita a, comprimidos (comprimidos con o sin perlas recubiertas), cápsulas (con o sin perlas recubiertas), perlas, composiciones particuladas, "ingrediente como está" formulado como, pero sin limitarse a, forma de suspensión o como una forma de dosificación por aspersión.

Las formas de dosificación adaptadas para administración tópica se pueden formular como ungüentos, cremas, suspensiones, lociones, polvos, disoluciones, pastas, geles, pulverizaciones, aerosoles o aceites. En algunas realizaciones para tratamientos del ojo u otros tejidos externos, por ejemplo, la boca o la piel, las formulaciones farmacéuticas se aplican como un ungüento tópico o crema. Cuando se formula en un ungüento, la proteína de fusión de CDKL5, el ingrediente activo auxiliar y/o la sal farmacéuticamente aceptable de estos se puede formular con una base parafínica o de ungüento miscible con agua. En otras realizaciones, el ingrediente activo se puede formular en una crema con una base de crema de aceite en agua o una base de agua en aceite. Las formas de dosificación adaptadas para administración tópica en la boca incluyen grageas, pastillas y enjuagues bucales.

Las formas de dosificación para administración nasal o por inhalación incluyen aerosoles, disoluciones, gotas de suspensión, geles o polvos secos. En algunas realizaciones, la proteína de fusión de CDKL5, la composición que contiene una proteína de fusión de CDKL5, el ingrediente activo auxiliar y/o sal farmacéuticamente aceptable de estos en una forma de dosificación adaptada para inhalación está en una forma de tamaño de partícula reducido que se obtiene o se puede obtener por micronización. En algunas realizaciones, el tamaño de partícula del compuesto o sal o solvato de este de tamaño reducido (p. ej., micronizado) se define por un valor D50 de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 micrones, según se mide mediante un método adecuado conocido en la técnica. Las formas de dosificación adaptadas para administración por inhalación también incluyen polvos o rocíos con partículas. Las formas de dosificación adecuadas en donde el portador o excipiente es un líquido para administración como una pulverización nasal o gotas incluyen disoluciones/suspensiones en aceite o agua de un ingrediente activo, que se pueden generar mediante varios tipos de aerosoles presurizados dosificadores, nebulizadores o insufladores.

En algunas realizaciones, las formas de dosificación son formulaciones en aerosol adecuadas para administración por inhalación. En algunas de estas realizaciones, la formulación en aerosol contiene una disolución o suspensión fina de la proteína de fusión de CDKL5, la composición que contiene una proteína de fusión de CDKL5 y/o sal farmacéuticamente aceptable de estas, y un disolvente acuoso o no acuoso farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones en aerosol pueden presentarse en cantidades monodosis o multidosis en forma estéril en un contenedor sellado. Para algunas de estas realizaciones, el contenedor sellado es un dispensador nasal o de aerosol monodosis o multidosis que incluye una válvula dosificadora (p. ej., inhalador dosificador), que está previsto que se deseché después de que se haya agotado el contenido del contenedor.

Cuando la forma de dosificación en aerosol está contenida en un dispensador en aerosol, el dispensador contiene un propulsor adecuado a presión, tal como aire comprimido, dióxido de carbono o un propulsor orgánico que incluye, pero no se limita a, un hidrofluorocarburo. Las formas de dosificación de formulación en aerosol en otras realizaciones están contenidas en un atomizador con bomba. La formulación en aerosol presurizada también puede contener una disolución o una suspensión de una proteína de fusión de CDKL5, composición que contiene una proteína de fusión de CDKL5 o una formulación farmacéutica de esta. En realizaciones adicionales, la formulación en aerosol también contiene codisolventes y/o modificadores incorporados para mejorar, por ejemplo, la estabilidad y/o sabor y/o características de masa de partículas finas (cantidad y/o perfil) de la formulación. La administración de la formulación en aerosol puede ser una vez al día o varias veces al día, por ejemplo, 2, 3, 4 u 8 veces al día, en las que se suministran 1, 2 o 3 dosis a la vez.

Para algunas formas de dosificación adecuadas y/o adaptadas para administración inhalada, la formulación farmacéutica es una formulación inhalable en polvo seco. Además de la la proteína de fusión de CDKL5, la composición que contiene una proteína de fusión de CDKL5, un ingrediente activo auxiliar y/o sal farmacéuticamente aceptable de estos, dicha forma de dosificación puede contener una base de polvo tal como lactosa, glucosa, trehalosa, manitol y/o almidón. En algunas de estas realizaciones, la proteína de fusión de CDKL5, la composición que contiene una proteína de fusión de CDKL5, el ingrediente activo auxiliar y/o sal farmacéuticamente aceptable de estos en una forma de dosificación adaptada para inhalación está en una forma de tamaño de partícula reducido. En realizaciones adicionales, un modificador de rendimiento, tal como L-leucina u otro aminoácido, octaacetato de celobiosa y/o sales metálicas de ácido esteárico, estearato de magnesio o calcio.

En algunas realizaciones, las formulaciones en aerosol se disponen de manera que cada dosis medida de aerosol contenga una cantidad predeterminada de un ingrediente activo, tal como la una o más proteínas de fusión de CDKL5 o composiciones que contienen la proteína de fusión de CDKL5 descritas en la presente memoria.

Las formas de dosificación adaptadas para administración vaginal se pueden presentar como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones pulverizadas. Las formas de dosificación adaptadas para administración rectal incluyen supositorios o enemas.

Las formas de dosificación adaptadas para administración parenteral y/o adaptadas para cualquier tipo de inyección (p. ej., intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraósea, epidural, intracardiaca, intraarticular, intracavernosa, intratecal, intravireal, intracerebral e intracerebroventricular) pueden incluir disoluciones para inyección estériles acuosas y/o no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que pueden convertir a la composición en isotónica con la sangre del sujeto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que puede incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formas de dosificación adaptadas para administración parenteral se pueden presentar en contenedores monodosis o multidosis que incluyen, pero no se limitan a, ampollas o viales sellados. Las dosis se pueden liofilizar y resuspender en un portador estéril para reconstituir la dosis antes de la administración. Las disoluciones o suspensiones para inyección magistrales se pueden preparar en algunas realizaciones a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

Las formas de dosificación adaptadas para administración ocular pueden incluir disoluciones estériles acuosas y/o no acuosas que opcionalmente se pueden adaptar para inyección, y que opcionalmente pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que convierten a la composición en isotónica con el ojo o fluido contenido en él o alrededor del ojo del sujeto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que puede incluir agentes de suspensión y agentes espesantes.

Para algunas realizaciones, la forma de dosificación contiene una cantidad predeterminada de la proteína de fusión de CDKL5 o composición que contiene una proteína de fusión de CDKL5 por dosificación unitaria. En una realización, la cantidad predeterminada de la proteína de fusión de CDKL5 o composición que contiene una proteína de fusión de CDKL5 es una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión de CDKL5 o composición que contiene una proteína de fusión de CDKL5 para tratar o prevenir una deficiencia de CDKL5, síndrome de Rett y/o un síntoma de estos. En otras realizaciones, la cantidad predeterminada de la proteína de fusión de CDKL5 o composición que contiene una proteína de fusión de CDKL5 puede ser una fracción adecuada de la cantidad terapéuticamente eficaz del ingrediente activo. Por lo tanto, dichas dosificaciones unitarias se pueden administrar una o más veces al día. Dichas formulaciones farmacéuticas se pueden preparar mediante cualesquiera de los métodos conocidos en la técnica.

Tratamiento de trastornos neurológicos con composiciones y formulaciones de TATk-CDKL5

La proteína de fusión de CDKL5 y formulaciones farmacéuticas de esta descritas en la presente memoria se pueden usar para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, trastorno, síndrome, o un síntoma de estos en un sujeto. En algunas realizaciones, la proteína de fusión de CDKL5 y formulaciones farmacéuticas de esta se puede usar para tratar y/o prevenir una deficiencia de CDKL5, síndrome de Rett, variantes del síndrome de Rett y/o un síntoma de estos. En algunas realizaciones, el sujeto padece una deficiencia de CDKL5, síndrome de Rett, variantes del síndrome de Rett y/o un síntoma de estos.

Una cantidad de la proteína de fusión de CDKL5, composiciones y formulaciones farmacéuticas de esta descritas en la presente memoria se puede administrar a un sujeto que lo necesita una o más veces al día, semana, mes o año. En algunas realizaciones, la cantidad administrada puede ser la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión de CDKL5, composiciones y formulaciones farmacéuticas de esta. Por ejemplo, la proteína de fusión de CDKL5, composiciones y formulaciones farmacéuticas de esta puede administrarse en una dosis diaria. Esta cantidad puede suministrarse en una dosis única por día. En otras realizaciones, la dosis diaria puede administrarse en múltiples dosis por día, en las que cada una contiene una fracción de la dosis diaria total que se va a administrar (subdosis). En algunas realizaciones, la cantidad de dosis suministradas por día es 2, 3, 4, 5 o 6. En realizaciones adicionales, los compuestos, formulaciones o sales de estos se administran una o más veces por semana, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 veces por semana. En otras realizaciones, la proteína de fusión de CDKL5, composiciones y formulaciones farmacéuticas de esta pueden administrarse una o más veces por mes, tal como 1 a 5 veces por mes. En todavía otras realizaciones, la proteína de fusión de CDKL5, composiciones y formulaciones farmacéuticas de esta pueden administrarse una o más veces por año, tal como 1 a 11 veces por año.

Las proteínas de fusión de CDKL5, composiciones y formulaciones farmacéuticas de estas pueden coadministrarse con un agente secundario a través de cualquier vía conveniente. El agente secundario es un compuesto y/o formulación separado de las proteínas de fusión de CDKL5, composiciones y formulaciones farmacéuticas de estas. El agente secundario se puede administrar simultáneamente con las proteínas de fusión de CDKL5, composiciones y formulaciones farmacéuticas de estas. El agente secundario se puede administrar secuencialmente con las proteínas de fusión de CDKL5, composiciones y formulaciones farmacéuticas de estas. El agente secundario puede tener un efecto aditivo o sinérgico con las proteínas de fusión de CDKL5, composiciones y formulaciones farmacéuticas de estas. Los agentes secundarios adecuados incluyen, pero no se limitan a, ADN, ARN, aminoácidos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos, aptámeros, ribozimas, secuencias guía para ribozimas que inhiben la traducción o transcripción de proteínas y genes tumorales esenciales, hormonas, inmunomoduladores, antipiréticos, ansiolíticos, antipsicóticos, analgésicos, antiespasmódicos, antiinflamatorios, antihistamínicos, antiinfecciosos y quimioterapéuticos. En algunas realizaciones, el agente secundario es DCA.

Las hormonas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, hormonas derivadas de aminoácidos (p. ej., melatonina y tiroxina), hormonas peptídicas pequeñas y hormonas proteicas (p. ej., hormona liberadora de tirotropina, vasopresina, insulina, hormona de crecimiento, hormona luteinizante, hormona estimulante de foliculo y hormona estimulante de la tiroides), eiconsanoides (p. ej., ácido araquidónico, lipoxinas y prostaglandinas), y hormonas esteroides (p. ej., estradiol, testosterona, tetrahydro testosterona cortisol).

Los inmunomoduladores adecuados incluyen, pero no se limitan a, prednisona, azatioprina, 6-MP, ciclosporina, tacrolimus, metotrexato, interleucinas (p. ej., IL-2, IL-7 y IL-12), citocinas (p. ej., interferones (p. ej., IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω y IFN- γ), factor estimulante de colonias de granulocitos e imiquimod), quimiocinas (p. ej., CCL3, CCL26 y CXCL7), citosina fosfato-guanosina, oligodesoxinucleótidos, glucanos, anticuerpos y aptámeros).

Los antipiréticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, antiinflamatorios no esteroides (p. ej., ibuprofeno, naproxeno, cetoprofeno y nimesulida), aspirina y salicilatos relacionados (p. ej., salicilato de colina, salicilae de magnesio y salicailato de sodio), paracetamol/acetaminofeno, metamizol, nabumetona, fenazona y quinina.

Los ansiolíticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, benzodiacepinas (p. ej., alprazolam, bromazepam, clordiacépoído, clonazepam, clorazepato, diazepam, flurazepam, lorazepam, oxazepam, temazepam, triazolam y tofisopam), antidepresivos serotoninérgicos (p. ej., inhibidores de la recaptación de serotonina selectivos, antidepresivos tricíclicos e inhibidores de monoamina oxidasa), mebicar, afobazol, selank, bromantano, emoxipina, azapironas, barbitúricos, hidroxizina, pregabalina, validol y bloqueantes beta.

Los antipsicóticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, benperidol, bromoperidol, droperidol, haloperidol, moperona, pipaperona, timiperona, fluspirileno, penfluridol, pimozida, acepromazina, clorpromazina, ciamemazina, dicirazina, flufenazina, levomepromazina, mesoridazina, perazina, periciazina, perfenazina, pipotiazina, proclorperazina, promazina, prometazina, protipendilo, tioproperazina, tioridazina, trifluoperaziae, triflupromazina, clorprotixeno, clopexitol, flupentixol, tiotixeno, zuclopentixol, clotiapina, loxapina, protipendilo, carpipramina, clocapramina, molindona, mosapramina, sulpirida, veraliprida, amisulprida, amoxapina, aripiprazol, asenapina, clozapina, blonanserina, iloperidona, lurasidona, melperona, nemonaprida, olanzaprina, paliperidona, perospirona, quetiapina, remoxiprida, risperidona, sertindol, trimipramina, ziprasidona, zotepina, alstonia, befeprunox, bitopertina, brexpiprazol, cannabidiol, cariprazina, pimavanserina, pomaglumetad metionil, vabicaserina, xanomelina y zicronapina.

- Los analgésicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, paracetamol/acetaminofeno, antiinflamatorios no esteroides (p. ej., ibuprofeno, naproxeno, cetoprofeno y nimesulida), inhibidores de COX-2 (p. ej., rofecoxib, celecoxib y etoricoxib), opiáceos (p. ej., morfina, codeína, oxicodona, hidrocodona, dihidromorfina, petidina, buprenorfina), tramadol, norepinefrina, flupiretina, nefopam, orfenadrina, pregabalina, gabapentina, ciclobenzaprina, escopolamina, metadona, cetobemidona, piritramida y aspirina y salicilatos relacionados (p. ej., salicilato de colina, salicilato de magnesio y salicilato de sodio).
- Los antiespasmódicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, mebeverina, papaverina, ciclobenzaprina, carisoprodol, orfenadrina, tizanidina, metaxalona, metocarbamol, cloroxazona, baclofeno, dantroleno, baclofeno, tizanidina y dantroleno.
- Los antiinflamatorios adecuados incluyen, pero no se limitan a, prednisona, antiinflamatorios no esteroides (p. ej., ibuprofeno, naproxeno, cetoprofeno y nimesulida), inhibidores de COX-2 (p. ej., rofecoxib, celecoxib y etoricoxib) y derivados antiinflamatorios selectivos inmunitarios (p. ej., péptido T de la glándula submandibular y sus derivados).
- Las antihistamínicos adecuadas incluyen, pero no se limitan a, antagonistas del receptor de H₁ (p. ej., acrivastina, azelastina, bilastina, bromfeniramina, buclizina, bromodifenhidramina, carbinoxamina, cetirizina, clorpromazina, ciclizina, clorfeniramina, clemastina, ciproheptadina, desloratadina, dexbromafeniramina, dexclorfeniramina, dimenhidrinato, dimetindeno, difenhidramina, doxilamina, ebasina, embramina, fexofenadina, hidroxizina, levocetirizina, loratadina, meclozina, mirtazapina, olopatadina, orfenadrina, fenindamina, feniramina, feniltoloxamina, prometazina, pirilamina, quetiapina, rupatadina, tripeleminamina y triprolidina), antagonistas del receptor de H₂ (p. ej., cimetidina, famotidina, lafutidina, nizatidina, ranitidina y roxatidina), tritocualina, catequina, cromoglicato, nedocromil y agonistas β₂-adrenérgicos.
- Los antiinfecciosos adecuados incluyen, pero no se limitan a, amebicidas (p. ej., nitazoxanida, paromomicina, metronidazol, tinidazol, cloroquina, miltefosina, anfotericina b y yodoquinol), aminoglicósidos (p. ej., paromomicina, tobramicina, gentamicina, ampicilina, canamicina y neomicina), antihelmínticos (p. ej., pirantel, mebendazol, ivermectina, praziquantel, abendazol, tiabendazol, oxamniquina), antifúngicos (p. ej., antifúngicos de azol (p. ej., itraconazol, fluconazol, posaconazol, cetoconazol, clotrimazol, miconazol y voriconazol), equinocandinas (p. ej., caspofungina, anidulafungina y micafungina), griseofulvina, terbinafina, flucitosina y polienos (p. ej., nistatina y anfotericina b), agentes antimaláricos (p. ej., pirimetamina/sulfadoxina, artemeter/lumefantrina, atovacuona/proguanil, quinina, hidroxicloroquina, mefloquina, cloroquina, doxiciclina, pirimetamina y halofantrina), agentes antituberculosis (p. ej., aminosalicilatos (p. ej., ácido aminosalicílico), isoniazid/rifampina, isoniazid/pirazinamida/rifampin, bedaquilina, isoniazid, etambutol, rifampina, rifabutina, rifapentina, capreomicina y cicloserina), antivíricos (p. ej., amantadina, rimantadina, abacavir/lamivudina, emtricitabina/tenofovir, cobicistat/elvitegravir/emtricitabina/tenofovir, efavirenz/emtricitabina/tenofovir, avacavir/lamivudina/zidovudina, lamivudina/zidovudina, emtricitabina/tenofovir, emtricitabina/opinavir/ritonavir/tenofovir, interferón alfa-2v/ribavirina, peginterferón alfa-2b, maraviroc, raltegravir, dolutegravir, enfuvirtida, foscarnet, fomivirsén, oseltamivir, zanamivir, nevirapina, efavirenz, etravirina, rilpivirina, delaviridina, nevirapina, entecavir, lamivudina, adefovir, sofosbuvir, didanosina, tenofovir, avacavir, zidovudina, estavudina, emtricitabina, xalcitabina, telbivudina, simeprevir, boceprevir, telaprevir, lopinavir/ritonavir, fosamprenvir, drinuavir, ritonavir, tipranavir, atazanavir, nelfinavir, amprenavir, indinavir, sawunavir, ribavirin, valciclovir, aciclovir, famciclovir, ganciclovir y valganciclovir), carbapenémicos (p. ej., doripenem, meropenem, ertapenem y cilastatina/imipenem), cefalosporinas (p. ej., cefadroxil, cefradina, cefazolina, cefalexina, cefepima, ceflarolina, loracarbef, cefotetan, cefuroxima, cefprozil, loracarbef, cefoxitina, cefaclor, ceftibuten, ceftriaxona, cefotaxima, cefpodoxima, cefdinir, cefixima, cefditoren, cefizoxima, y ceftazidima), antibióticos glicopeptídicos (p. ej., vancomicina, dalbavancina, oritavancina y telvancina), gliciliclinas (p. ej., tigeciclina), leprostáticos (p. ej., clofazimina y talidomida), lincomicina y derivados de esta (p. ej., clindamicina y lincomicina), macrólidos y derivados de estos (p. ej., telitromicina, fidaxomicina, ertromicina, azitromicina, claritromicina, diritromicina y troleandomicina), linezolid, sulfametoxazol/trimetoprim, rifaximin, cloranfenicol, fosfomicina, metronidazol, aztreonam, bacitracina, penicilinas (amoxicilina, ampicilina, bacampicilina, carbenicilina, piperacilina, ticarcilina, amoxicilina/clavulanato, ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam, clavulanato/ticarcilina, penicilina, procaina penicilina, oxacilina, dicloxacilina y nafcilina), quinolonas (p. ej., lomefloxacin, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacina, moxifloxacina, ciprofloxacina, levofloxacina, gemifloxacina, moxifloxacina, cinoxacin, ácido nalidixico, enoxacin, grepafloxacina, gatifloxacina, trovafloxacina y esparfloxacina), sulfonamidas (p. ej., sulfametoxazol/trimetoprima, sulfasalazina y sulfasoxazol), tetraciclinas (p. ej., doxiciclina, demeclociclina, minociclina, doxiciclina/ácido salicílico, doxiciclina/ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y tetraciclina) y antiinfecciosos urinarios (p. ej., nitrofurantoina, metenamina, fosfomicina, cinoxacin, ácido nalidixico, trimetoprima y azul de metileno).
- Los quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, apaclitaxel, brentuximab vedotin, doxorubicina, 5-FU (fluorouracilo), everolimus, pemetrexed, melfalán, pamidronato, anastrozol, exemestano, nelarabina, ofatumumab, bevacizumab, belinostat, tositumomab, carmustina, bleomicina, bosutinib, busulfán, alemtuzumab, irinotecan, vandetanib, bicalutamida, lomustina, daunorubicina, clofarabina, cabozantinib, dactinomicina, ramucirumab, citarabina, citoxán, ciclofosfamida, decitabina, dexametasona, docetaxel, hidroxiurea, decarbazina, leuprolida, epirubicina, oxaliplatino, asparaginasa, estramustina, cetuximab, vismodegib, asparaginasa Erwinia chrysanthemi, amifostina, etopósido, flutamida, toremifeno, fulvestrant, letrozol, degarelix, pralatrexato, metotrexato, floxuridina, obinutuzumab, gemcitabina, afatinib, imatinib mesilato, carmustina, eribulin, trastuzumab, altretamina,

topotecan, ponatinib, idarrubicina, ifosfamida, ibrutinib, axitinib, interferón alfa-2a, gefitinib, romidepsina, ixabepilona, ruxolitinib, cabazitaxel, ado-trastuzumab emtansina, carfilzomib, clorambucil, sargramostim, cladribina, mitotano, vincristina, procarbazona, megestrol, trametinib, mesna, cloruro de estroncio-89, mecloretamina, mitomicina, busulfán, gemtuzumab ozogamicina, vinorelbina, filgrastim, pegfilgrastim, sorafenib, nilutamida, pentostatina, tamoxifeno, mitoxantrona, pegaspargasa, denileucina diftotox, alitretinoína, carboplatino, pertuzumab, cisplatino, pomalidomida, prednisona, aldesleucina, mercaptopurina, ácido zoledrónico, lenalidomida, rituximab, octretida, dasatinib, regorafenib, histrelin, sunitinib, siltuximab, omacetaxina, tioguanina (tioguanina), dabrafenib, erlotinib, bexaroteno, temozolomida, tiotepa, talidomida, BCG, temsirolimus, clorhidrato de bendamustina, triptorelina, trióxido de arsénio, lapatinib, valrubicina, panitumumab, vinblastina, bortezomib, tretinoína, azacitidina, pazopanib, teniposida, leucovorina, crizotinib, capecitabina, enzalutamida, ipilimumab, goserelina, vorinostat, idelalisib, ceritinib, abiraterona, epotilona, tafluposida, azatioprina, doxifluridina, vindesina y ácido todo trans retinoico.

En realizaciones donde las proteínas de fusión de CDKL5, composiciones y formulaciones farmacéuticas de estas se coadministran simultáneamente con un agente secundario, las proteínas de fusión de CDKL5, composiciones y formulaciones farmacéuticas de estas se pueden administrar al sujeto sustancialmente al mismo tiempo que el agente secundario. Según se usa en este contexto, "sustancialmente al mismo tiempo" se refiere a la administración de las proteínas de fusión de CDKL5, composiciones y formulaciones farmacéuticas de estas y un agente secundario donde el período de tiempo entre la administración de la proteína de fusión de CDKL5, composición o formulación farmacéutica de esta y el agente secundario es entre 0 y 10 minutos.

En realizaciones donde la proteína de fusión de CDKL5, composición o formulaciones farmacéuticas de esta se coadministran secuencialmente con un agente secundario, la proteína de fusión de CDKL5, composición o formulaciones farmacéuticas de esta se pueden administrar primero y posteriormente se procede a la administración del agente secundario después de un período de tiempo. En otras realizaciones donde la proteína de fusión de CDKL5, composición o formulaciones farmacéuticas de esta se coadministran secuencialmente con un agente secundario, el agente secundario se puede administrar primero y posteriormente se administra la proteína de fusión de CDKL5, composición o formulaciones farmacéuticas de esta después de un período de tiempo. En cualquier realización, el período de tiempo entre la administración de la proteína de fusión de CDKL5, composición o formulaciones farmacéuticas de esta y el agente secundario puede variar de 10 minutos a aproximadamente 96 horas. En algunas realizaciones, el período de tiempo puede ser aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 10 horas, o aproximadamente 12 horas. La administración secuencial se puede repetir según sea necesario en el transcurso del período de tratamiento.

La cantidad de las proteínas de fusión de CDKL5, composiciones, formulaciones farmacéuticas de estas que se puede administrar se describe en otra parte en la presente memoria. La cantidad del agente secundario variará dependiendo del agente secundario. La cantidad del agente secundario puede ser una cantidad terapéuticamente eficaz. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz del agente secundario varía de aproximadamente 0,001 microgramos a aproximadamente 1 miligramo. En otras realizaciones, la cantidad del agente secundario varía de aproximadamente 0,01 UI a aproximadamente 1000 UI. En realizaciones adicionales, la cantidad del agente secundario varía de 0,001 mL a aproximadamente 1 mL. En todavía otras realizaciones, la cantidad del agente secundario varía de aproximadamente 1 % p/p a aproximadamente 50 % p/p de la formulación farmacéutica total. En realizaciones adicionales, la cantidad de agente secundario varía de aproximadamente 1 % v/v a aproximadamente 50 % v/v de la formulación farmacéutica total. En todavía otras realizaciones, la cantidad del agente secundario varía de aproximadamente 1 % p/v a aproximadamente 50 % p/v de la composición de agente secundario o formulación farmacéutica total.

En algunas realizaciones, la composición o formulación que contiene la proteína de fusión de CDKL5 se administra a un paciente a través de una inyección. Los métodos de inyección adecuados incluyen, pero no se limitan a intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraósea, epidural, intracardíaca, intraarticular, intracavernosa, intratecal, intravireal, intracerebral e intracerebroventricular. Otros métodos adecuados de administración de la composición o formulación que contiene la proteína de fusión de CDKL5 incluyen, pero no se limitan a, suministro tópico, transdérmico, nasal u oral. En algunas realizaciones, la dosificación de la proteína de fusión de CDKL5 varía de aproximadamente 0,01 µg/g de peso corporal a aproximadamente 10 mg/g de peso corporal.

En otras realizaciones, la proteína de fusión de CDKL5 se puede suministrar a un paciente que necesita tratamiento a través de terapia celular. Con esto en mente, se dirige la atención hacia la Figura 3, que muestra una realización del método para suministrar una proteína de fusión de CDKL5 a través de una célula autóloga. El método comienza con cultivar células *in vitro* (8000). Preferiblemente, las células son células autólogas. En una realización, las células autólogas son neuronas o células precursoras neuronales, tales como células madre neurales. En algunas realizaciones, las células autólogas son neuronas que se derivan de células madre pluripotentes inducidas. En otras realizaciones, las células autólogas son neuronas que se derivan de células madre de sangre de cordón umbilical.

A continuación, las células cultivadas se transducen con una proteína de fusión de CDKL5 purificada (8010). En otras realizaciones, las células cultivadas se transducen al exponer las células cultivadas a medios que contienen una proteína de fusión de CDKL5 según se describió anteriormente. En realizaciones adicionales, las células cultivadas

se transfectan con un vector adecuado que contiene un ADNc de proteína de fusión de CDKL5. Las células después se cultivan durante una cantidad de tiempo adecuada para permitir la expresión de la proteína de fusión de CDKL5 (8020). En algunas realizaciones, las células se cultivan durante aproximadamente 6 h a aproximadamente 96 h. Después de que se cultivan las células, una o más células transducidas se administran a un paciente.

- 5 En una realización, las neuronas autólogas transducidas se suministran al cerebro usando técnicas quirúrgicas. En algunas realizaciones, una o más células transducidas se administran a un paciente a través de inyección. En algunas realizaciones, una o más células transducidas se incluyen en una formulación. En una realización, la formulación que contiene una o más células transducidas incluye, además, un portador farmacéuticamente aceptable y/o un agente activo. En algunas realizaciones, la formulación que contiene la una o más células transducidas se administra a un paciente a través de inyección o usando una técnica quirúrgica.

Kits que contienen la proteína de fusión de CDKL5 y formulaciones de esta

- 15 La proteína de fusión de CDKL5, composiciones que contienen la proteína de fusión de CDKL5 y formulaciones farmacéuticas de esta descritas en la presente memoria se pueden presentar como un kit de combinación. Según se usa en la presente memoria, los términos "kit de combinación" o "kit de partes" se refieren a la proteína de fusión de CDKL5, composiciones que contienen la proteína de fusión de CDKL5 y formulaciones farmacéuticas de esta descritas en la presente memoria y componentes adicionales que se usan para envasar, vender, comercializar, suministrar y/o administrar la combinación de elementos o un único elemento, tal como el ingrediente activo, contenidos en él. Dichos componentes adicionales incluyen, pero no se limitan a, envases, jeringas, envases en ampolla, frascos y similares. Cuando uno o más de los componentes (p. ej., agentes activos) contenidos en el kit se administran simultáneamente, el kit de combinación puede contener los agentes activos en una única formulación farmacéutica (p. ej., un comprimido) o en formulaciones farmacéuticas separadas.

- 20 El kit de combinación puede contener cada agente, compuesto, formulación farmacéutica o componente de esta en composiciones o formulaciones farmacéuticas separadas. Las composiciones o formulaciones farmacéuticas separadas pueden estar contenidas en un único envase o en envases separados dentro del kit. También se proporcionan, en algunas realizaciones, tampones, diluyentes, reactivos de solubilización, medios de cultivo celular y otros reactivos. Estos componentes adicionales pueden estar contenidas en un único envase o en envases separados dentro del kit.

- 30 En algunas realizaciones, el kit de combinación también incluye instrucciones impresas o de cualquier otra manera contenidas en un medio de expresión tangible. Las instrucciones pueden proporcionar información en relación con el contenido de la proteína de fusión de CDKL5, composiciones que contienen la proteína de fusión de CDKL5 y formulaciones farmacéuticas de esta y/u otro agente auxiliar y/o secundario contenido en esta, información de seguridad sobre el contenido de la proteína de fusión de CDKL5, composiciones que contienen la proteína de fusión de CDKL5 y formulaciones farmacéuticas de esta y/u otros agentes auxiliares y/o secundarios contenidos en esta, información sobre las dosificaciones, indicaciones de uso, y/o régimen(es) de tratamiento recomendado(s) para la proteína de fusión de CDKL5, composiciones que contienen la proteína de fusión de CDKL5 y formulaciones farmacéuticas de esta y/u otro agente auxiliar y/o secundario contenido en esta. En algunas realizaciones, las instrucciones pueden proporcionar pautas para la administración de la proteína de fusión de CDKL5, composiciones que contienen la proteína de fusión de CDKL5 y formulaciones farmacéuticas de esta y/u otro agente auxiliar y/o secundario a un sujeto que padece una deficiencia de CDKL5, síndrome de Rett, variantes del síndrome de Rett y/o un síntoma de estos.

- 45 Sin elaboración adicional, se cree que un experto en la técnica, sobre la base de la descripción en la presente memoria, puede usar la presente descripción en su máxima extensión. Se hace hincapié en que las realizaciones de la presente descripción, particularmente cualesquiera realizaciones "preferidas", son meramente posibles ejemplos de las implementaciones, meramente establecidas para una comprensión clara de los principios de la descripción. Se pueden realizar muchas variaciones y modificaciones a la(s) realización (realizaciones) descrita(s) sin alejarse sustancialmente del espíritu y principio de la descripción. Todas las modificaciones y variaciones de este tipo están comprendidas en el alcance de esta descripción.

- 50 Todas las publicaciones y patentes citadas en esta memoria descriptiva se incorporan a la presente memoria por referencia como si se indicara específica e individualmente que cada publicación o patente individual se incorpora por referencia y se incorporan a la presente memoria por referencia para divulgar y describir los métodos y/o materiales en relación con los que se citan las publicaciones. La cita de cualquier publicación es por su descripción anterior a la fecha de presentación y no se debe considerar una admisión de que la presente descripción no tiene el derecho de antedatar dicha publicación en virtud de una descripción anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas podrían ser diferente de las fechas de publicación reales que puede que sea necesario confirmar de manera independiente.

Como será evidente para los expertos en la técnica tras leer esta descripción, cada una de las realizaciones individuales discretas ilustradas en la presente memoria tienen componentes y características discretos que se pueden separar fácilmente de o combinar con las características de cualquiera de varias realizaciones diferentes sin

alejarse del alcance o espíritu de la presente divulgación. Cualquier método mencionado puede llevarse a cabo en el orden de eventos indicado o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

Las realizaciones de la presente descripción emplearán, a menos que se indique de cualquier otra manera, técnicas de biología molecular, microbiología, nanotecnología, química orgánica, bioquímica, botánica y similares, que están dentro de la experiencia en la técnica. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la literatura.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una descripción y divulgación completa de cómo llevar a cabo los métodos y el uso de las composiciones y compuestos descritos y reivindicados en la presente memoria. Los ejemplos específicos a continuación se deben interpretar como meramente ilustrativos y no limitantes del resto de la descripción de ningún modo. Se han hecho esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números (p. ej., cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones. A menos que se indique de cualquier otra manera, las partes son partes en peso, la temperatura está en °C y la presión está en atmosférica o cerca. La temperatura y presión estándares se definen como 20 °C y 1 atmósfera.

Ejemplo 1: Producción y purificación de la proteína TATk-CDKL5.

Para producir una proteína de fusión TAT-CDKL5 suministrable se usó un TATk-PTD sintético en el que la mutación de las secuencias de reconocimiento de furina en el dominio TAT permite la secreción de proteínas recombinantes. Se observó que las células diana captaron la proteína secretada satisfactoriamente. El gen de fusión TATk-CDKL5 que contenía una CDKL5 humana se clonó en el plásmido de expresión pSecTag2 (Life Technologies). Este plásmido está diseñado para permitir la expresión de genes en hospedantes mamíferos y altos niveles de expresión de proteínas diana. Las proteínas expresadas a partir de pSecTag2 se fusionan en el extremo N con la secuencia líder de cadena de Igk murina para la secreción proteica en el medio de cultivo. La proteína de fusión TATk-CDKL5 se etiquetó con una proteína GFP para posibilitar el análisis de transferencia western mediante el uso de un anticuerpo anti-GFP. Para facilitar la purificación de la proteína, la proteína de fusión TATk-CDKL5 se configuró para incluir una etiqueta myc y una etiqueta 6xHis en la región del extremo C del gen TATk-GFP-CDKL5. Las células HEK 293T se transfectaron con el plásmido de expresión de TATk-GFP-CDKL5 usando métodos de suministro de plásmido estándares. Después de la transfección, se dejó que las células crecieran en medio sin suero (Medio Eagle modificado de Dulbecco con alto contenido de glucosa). Después de 48 horas, se recogió el medio, se diafiltró y se concentró con filtros ultracentrífugos Amicon (corte de 50 kDa). Este método permite el intercambio del tampón y el enriquecimiento de la proteína secretada.

Las Figuras 4A y 4B demuestran resultados del análisis de transferencia western de la expresión proteica de TATk-GFP-CDKL5 en células HEK293T transfectadas. La Figura 4A demuestra la expresión de la proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 en homogeneizados celulares de células HEK293T transfectadas. La Figura 4B demuestra la acumulación de la proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 en medio de cultivo celular concentrado (20 veces) de células HEK293T transfectadas.

Ejemplo 2: Validación de la actividad de cinasa de TATk-CDKL5.

Para purificar la proteína TATk-GFP-CDKL5, se agregaron una etiqueta myc y una etiqueta 6xHis a la región del extremo C del gen TATk-GFP-CDKL5. La proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 se purificó a partir del medio de cultivo sobre una resina Ni-NTA. Se ha expuesto que la cinasa CDKL5 tiene alta actividad de autofosforilación. Como se muestra en las Figuras 5A y 5B, que muestran los resultados de un ensayo de actividad de cinasa *in vitro*, la proteína TATk-GFP-CDKL5 purificada conserva su actividad de autofosforilación. Esto demuestra que la proteína de fusión purificada conserva su actividad de cinasa.

Ejemplo 3: Internalización de TATk-CDKL5 por células HEK293T.

Para evaluar la eficacia de la transducción de la proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5, se incubaron células HEK 293T con la proteína de fusión purificada/concentrada. Brevemente, la proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 se produjo y purificó según se describe en el Ejemplo 1. Las células HEK 293 se incubaron en medios concentrados que contenían la proteína de fusión. Después de diferentes tiempos de incubación, las células se lisaron y los extractos proteicos totales se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para inmunotransferencia para la cuantificación de la proteína TATk-GFP-CDKL5. Como se muestra en la Figura 6, las células internalizan TATk-GFP-CDKL5 después de apenas aproximadamente 30 minutos de incubación. Otros cultivos se trataron en paralelo y se fijaron e inmunotñeron con un anticuerpo específico anti-GFP para visualizar la proteína TATk-GFP-CDKL5 transducida. Como se demostró en las Figuras 7A-7B, la proteína TATk-GFP-CDKL5 se translocalizó de manera eficaz en las células. La internalización en células diana se confirmó mediante microscopía confocal (Figura 8). Se incubaron células de neuroblastoma SH-SY5Y en medios concentrados que contenían la proteína de fusión durante 30 minutos. La Figura 8 muestra una imagen de una serie de imágenes confocales (1-12) de células SH-SY5Y transducidas con TATk-GFP-CDKL5, lo que demuestra que las células diana internalizan la proteína TATk-GFP-CDKL5 y se localiza en el núcleo y el citoplasma de las células SH-SY5Y (Figura 8).

Ejemplo 4: TATk-CDKL5 induce la diferenciación e inhibe la proliferación de la línea celular de neuroblastoma SHSY5Y

A pesar de la clara importancia de CDKL5 para el sistema nervioso central, las funciones biológicas de esta cinasa permanecen en gran medida desconocidas. El gen CDKL5 afecta la proliferación y diferenciación de las células neurales (Ver, p. ej. Valli et al., 2012. *Biochim Biophys Acta*. 1819:1173-1185 y Rizzi et al., 2011. *Brain Res*. 1415:23-33). Las células de neuroblastoma comparten varios rasgos con neuronas normales y, por lo tanto, se consideran un buen modelo *in vitro* para estudiar las propiedades bioquímicas y funcionales de las células neuronales, particularmente cuando se induce su diferenciación después del tratamiento con agentes tales como el ácido retinoico (RA) (Ver, p. ej., Singh, 2007 *Brain Res*. 1154 p 8-21; Melino, 1997 *J. Neurooncol*. 31 págs. 65-83). Por estos motivos, se emplearon células de neuroblastoma para estudiar la función de CDKL5 *in vitro*.

Las células SH-SY5Y se trataron con TATk-GFP-CDKL5 purificada de manera similar al tratamiento descrito en el Ejemplo 3. Aquí, las células SH-SY5Y se incubaron con los medios concentrados que contenían la proteína TATk-GFP-CDKL5 purificada durante aproximadamente 24 horas. La proliferación celular se evaluó como el índice mitótico (la relación entre la cantidad de células en una población que experimenta mitosis y la cantidad de células que no experimenta mitosis) usando tinción nuclear Hoechst. La diferenciación se evaluó al examinar el crecimiento axónico, que es un signo de diferenciación neuronal. Para el análisis del crecimiento axónico, las células se cultivaron durante 1-2 días adicionales en presencia o ausencia del agente prodiferenciación, RA. El crecimiento axónico se midió usando un sistema de análisis de imágenes.

La inducción de la expresión de CDKL5 (por la proteína TATk-GFP-CDKL5) causó una fuerte inhibición de la proliferación celular (p. ej., Figuras 9A-9B y 10) sin aumento en la muerte celular apoptótica (no se muestran los datos) en comparación con testigos. Además, como se muestra en las Figuras 11A-11B y 12, TATk-GFP-CDKL5 promueve la diferenciación de células de neuroblastoma como se indica por el crecimiento axónico en las células SH-SY5Y. Estos resultados demuestran que TATk-CDKL5 es funcional en un modelo neuronal *in vitro*.

Ejemplo 5: Caracterización del modelo de ratón con CDKL5 inactivada

Se creó recientemente un modelo de ratón con CDKL5 inactivada en el EMBL en Monterotondo, Italia, por el grupo liderado por el Dr. Cornelius Gross (Amendola, 2014 *PLoS One*. 9(5):e91613). Para establecer el efecto de la pérdida de función de CDKL5 sobre el desarrollo dendrítico de neuronas recién nacidas, se examinó la morfología dendrítica de células granulares del hipocampo recién nacidas derivadas del ratón CDKL5 KO. La morfología dendrítica de las neuronas recién nacidas se analizó con inmunohistoquímica para doblecortina (DCX), aprovechando la expresión de esta proteína en el citoplasma de neuronas inmaduras durante el período de alargamiento axónico. Como se muestra en las Figuras 13A-13B, las células positivas para DCX de ratones con CDKL5 inactivada (-/-) exhibieron un árbol dendrítico con un patrón muy inmaduro (Figura 13B) en comparación con las contrapartes naturales (+/+) (Figura 13A). Un patrón muy inmaduro puede evidenciar poca ramificación y alargamiento. La ausencia de CDKL5 resultó en una disminución en el número de células positivas para DCX (Figura 13B) debido a un aumento en la muerte celular apoptótica (no se muestran los datos) que se observó que afectó a neuronas granulares inmaduras posmitóticas (células positivas para DCX) (Fuchs, 2014 *Neurobiol Dis*. 70 p53-68). Estos datos sugieren que CDKL5 tiene un papel fundamental en la neurogénesis posnatal, al afectar la supervivencia y maduración del precursor neural de neuronas recién nacidas. Se observó que los cultivos de células precursoras neuronales (NPC) a partir de la zona subventricular (SVZ, por sus siglas en inglés) de ratones con Cdkl5 inactivada exhibían los mismos defectos observados en precursores de células granulares cerebelares *in vivo*. A saber, en cultivos de células precursoras neuronales derivadas de ratones naturales (+/+) había más neuronas (células positivas para β -tubulina III, células rojas) que en cultivos de células precursoras neuronales derivadas de ratones CDKL5 KO (-/-) (Figuras 14A y 14B). Esto sugiere que la pérdida de CDKL5 reduce la supervivencia de neuronas posmitóticas. La evaluación del crecimiento axónico en células positivas para β -tubulina III demostró que las neuronas generadas a partir de NPC con Cdkl5 inactivada estaban menos diferenciadas en comparación con las neuronas naturales (Figuras 14A y 14B). Estos resultados sugieren que las NPC posmitóticas de ratones con CDKL5 inactivada tienen un defecto intrínseco, no solo en la supervivencia de la célula, sino también en la maduración neuronal.

Ejemplo 6: La proteína TATk-CDKL5 restaura el desarrollo axónico de precursores de células neurales derivadas de un ratón CDKL5 KO.

Los cultivos de células precursoras neuronales de ratón CDKL5 KO (-/-) y ratón natural (+/+) se trataron con TATk-GFP-CDKL5 o TATk-GFP. La maduración neuronal se evaluó al medir la longitud axónica total de neuronas diferenciadas (positivas para β -tubulina III). La evaluación de la longitud axónica se llevó a cabo mediante el uso del sistema de análisis de imágenes Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD 20910, EE. UU.). Se calculó la longitud axónica promedio por célula al dividir la longitud axónica total entre la cantidad de células contadas en las áreas. Como se muestra en las Figuras 15A-15C y 16, la ausencia de CDKL5 causa una reducción en la maduración de nuevas neuronas y el tratamiento con TATk-CDKL5 restaura el desarrollo axónico.

Ejemplo 7: Suministro de TATk-CDKL5 en el cerebro de ratón.

Crías de ratón con siete días recibieron inyecciones subcutáneas con una dosis simple de medio de cultivo de células HEK293T transfectadas con TATk-GFP-CDKL5, TATk-GFP o medio de células no transfectadas (vehículo) (la dosis simple corresponde a aproximadamente 200 µl de medio concentrado 200 veces; que contenía aproximadamente 1-1,5 µg de la proteína de fusión). Después de 48 horas de la transfección, se recogió el medio de cultivo, se diafiltró y se concentró con filtros ultracentrífugos Amicon (corte de 50 kDa). Los ratones se sacrificaron 4 horas después de la administración del tratamiento. Se almacenaron los cerebros en el fijador durante 24 horas, se cortaron a lo largo de la línea media se mantuvieron en tampón de sacarosa en fosfato al 20 % durante 24 horas adicionales. Los hemisferios se congelaron y almacenaron a -80 °C. El hemisferio derecho se cortó con un micrótopo congelado en secciones coronales de 30 µm de espesor. Se llevó a cabo la inmunohistoquímica en secciones flotantes libres. La localización de TATk-GFP-CDKL5 y TATk-GFP en el cerebro se evaluó mediante inmunohistoquímica con el uso de un anticuerpo anti-GFP y un kit de amplificación de TSA. Las imágenes se tomaron al nivel de la corteza sensorial y motora y el cerebelo. Las células se contratiñeron usando 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Se muestran imágenes representativas que demuestran la presencia de la proteína TATk-GFP-CDKL5 en la corteza sensorial y motora y el cerebelo de ratones en las Figuras 17A-17F y las Figuras 18A-18D, respectivamente. Dado que la proteína TATk-GFP-CDKL5 se administró por vía subcutánea, estos datos demuestran que la proteína TATk-GFP-CDKL5 se transporta de manera eficaz a través de la barrera hematoencefálica e ingresa en las células cerebrales.

Ejemplo 8: Efecto de la proteína de fusión TATk-CDKL5 in vivo sobre la maduración, supervivencia y conectividad neuronal

Ratones adultos (4-6 meses) recibieron inyecciones intraventriculares (Figura 19) durante 5 días consecutivos (*ver, p. ej.*, la Figura 20 para obtener una pauta experimental) con TATk-GFP-CDKL5 o TATk-GFP. Brevemente, los ratones se anestesiaron con quetamina (100-125 mg/kg) y xilazina (10-12,5 mg/kg). Se implantaron cánulas (diámetro de 0,31 mm, Brain Infusion Kit III; Alzet Cupertino, CA) estereotáxicamente en los ventrículos laterales (caudal A/P de -0,4 mm, M/L 1,0 mm, D/V -2,0 mm; Figura 19). Siete días después de la implantación, los ratones recibieron infusión durante 5 días consecutivos de 10 µl (aproximadamente 50 ng) de TATk-GFP-CDKL5 o TATk-GFP en PBS mediante el uso de una jeringa Hamilton conectada a un nanoinyector motorizado (a una velocidad de 0,5 µl/min). Los animales se sacrificaron cuatro horas después de la última inyección, y se analizó la morfología dendrítica de las células granulares del hipocampo recién nacidas con inmunohistoquímica para DCX. Las Figuras 21 y 22 demuestran que las neuronas positivas para DCX de ratones *Cdkl5* KO tenían procesos más cortos que los de sus contrapartes naturales (Figuras 21A-21B y 22A-22B). Se observó que la proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 administrada intraventricularmente en cinco días consecutivos aumenta la longitud axónica y la cantidad de ramificaciones en ratones con CDKL5 inactivada (Figura 22C) hasta niveles similares a los naturales (Figura 22A). Las Figuras 23A-23B muestran ejemplos del árbol dendrítico reconstruido de células granulares recién nacidas de ratones macho naturales (+/Y) (Figura 23A), con CDKL5 inactivada hemicigóticos (-/Y) (Figura 23B) y con CDKL5 inactivada hemicigóticos tratados con una proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5.

La cuantificación del tamaño dendrítico de células positivas para DCX demostró que los ratones con CDKL5 inactivada (-/Y) tenían una longitud dendrítica más corta (Figura 24A) y un número reducido de segmento (Figura 24B) en comparación con ratones naturales (Figuras 24A y 24B). En ratones con CDKL5 inactivada tratados con TATk-GFP-CDKL5 (-/Y) hubo un aumento en ambos parámetros que se volvió todavía mayor en comparación con los ratones +/Y (Figuras 24A-24B). Los efectos del tratamiento con TATk-GFP-CDKL5 sobre los detalles de la arquitectura dendrítica se examinaron al evaluar cada orden dendrítico por separado. Un rasgo llamativo de los ratones CDKL5 KO fue la ausencia de ramificaciones de orden superior (Figuras 25A-25B; flechas rojas). Mientras que los ratones naturales (+/Y) tenían hasta 10 órdenes de ramificaciones, los ratones con CDKL5 inactivada (-/Y) carecían de ramificaciones de los órdenes 8-10 (Figura 25A, flechas). Además, los ratones con CDKL5 inactivada (-/Y) exhibieron una longitud de ramificación reducida en los órdenes 5-8 (Figura 25A) y una cantidad reducida de ramificaciones de los órdenes 6-8 (Figura 25B). Tomados en conjunto, estos datos indican que en los ratones *Cdkl5* KO el árbol dendrítico de las células granulares recién nacidas es hipotrófico y que este defecto se debe a una reducción en la cantidad y longitud de las ramificaciones de orden intermedio y una carencia de ramificaciones de orden superior. Se observó que todos estos defectos se resolvían completamente mediante el tratamiento con TATk-GFP-CDKL5 (Figuras 25A a 25B).

Para evaluar el efecto del tratamiento con TATk-GFP-CDKL5 sobre la muerte celular apoptótica, contamos la cantidad de células apoptóticas que expresaban caspasa-3 escindida en la circunvolución dentada del hipocampo (Figura 26). La cuantificación de las células con caspasa-3 escindida muestra que el tratamiento con TATk-GFP-CDKL5 normalizó completamente la muerte celular apoptótica en ratones con CDKL5 inactivada (-/Y) (Figura 26). Se observó que los ratones con CDKL5 inactivada (-/Y) tenían menos neuronas posmitóticas (células positivas para DCX) que los ratones naturales (+/Y) en la circunvolución dentada del hipocampo (Figura 27). Los ratones con CDKL5 inactivada tratados con TATk-GFP-CDKL5 experimentaron un aumento de la cantidad de neuronas posmitóticas que se volvió similar a la de los ratones naturales (+/Y) (Figura 27). Esto indica que la muerte aumentada de células granulares inmaduras posmitóticas que caracteriza a ratones con CDKL5 inactivada se resuelve mediante el tratamiento con TATk-GFP-CDKL5. Tomados en conjunto, estos datos demuestran que el tratamiento con TATk-GFP-CDKL5 en ratones con CDKL5 inactivada aumentó la longitud axónica y la supervivencia

de células recién nacidas en el hipocampo lo cual indica que la TATk-CDKL5 inyectada se propagó desde el ventrículo lateral hacia el hipocampo y restauró la maduración y supervivencia de células granulares posmitóticas.

Sin ceñirse a ninguna teoría, una reducción en la conectividad puede ser la contraparte de la hipotrofia dendrítica que caracteriza a las células granulares recién nacidas de ratones CDKL5 KO. La sinaptofisina (SYN; también conocida como p38) es una glicoproteína de la vesícula sináptica que es un marcador específico de terminales presinápticos. Aquí, se observó en los ratones con CDKL5 inactivada (-/Y) que la densidad óptica de SYN era significativamente menor que en los ratones naturales (+/Y) en la capa molecular del hipocampo (Figuras 28 y 30A), lo que sugiere que los ratones CDKL5 KO tenían menos contactos sinápticos en la circunvolución dentada. Las Figuras 28A-28C muestran imágenes representativas que demuestran secciones de cerebro procesadas para inmunofluorescencia con sinaptofisina (SYN) de la capa molecular (Mol) de la circunvolución dentada (DG) de un ratón macho natural (+/Y) (Figura 28A), un ratón macho con CDKL5 inactivada hemigigótico (-/Y) (Figura 28B) y un ratón macho con CDKL5 inactivada hemigigótico tratado con una proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 a través de inyecciones intraventriculares suministradas una vez al día durante 5 días consecutivos (-/Y + TATk-GFP-CDKL5) (Figura 28C). Una de seis secciones coronales de 30 µm de espesor del DG de animales se procesó para inmunohistoquímica. La inmunohistoquímica se llevó a cabo en secciones flotantes libres para los cerebros congelados. Para la inmunohistoquímica de sinaptofisina, las secciones se incubaron durante 48 horas a 4 °C con anticuerpo anti-SYN (SY38) monoclonal de ratón (1:1000, MAB 5258, Millipore Bioscience Research Reagents) y durante 2 horas con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Cy3 (1:200; Jackson ImmunoResearch). La intensidad de la inmunorreactividad (IR) se determinó mediante densitometría óptica de las secciones teñidas inmunohistoquímicamente. Las imágenes de fluorescencia se capturaron usando un microscopio Nikon Eclipse E600 equipado con una cámara Nikon Digital DXM1200 (sistema ATi). El análisis densitométrico en la capa molecular y la corteza se llevó a cabo usando el Nis-Elements Software 3.21.03 (Nikon). Para cada imagen, se estimó el umbral de intensidad al analizar la distribución de las intensidades de píxeles en las áreas de la imagen que no contenían IR. A continuación, este valor se restó a la IR calculada para cada área de la que se obtuvo muestras. Los valores se proporcionan como un porcentaje de la densidad óptica de los ratones CDKL5 +/Y testigos (media + error típico).

La arborización dendrítica se reduce significativamente en las neuronas piramidales corticales de ratones con CDKL5 inactivada en comparación con sus contrapartes naturales (Amendola, 2014 PLoS One. 9(5):e91613). Se observó un nivel similar más bajo de inmunorreactividad de SYN en las capas III de la neocorteza (Figura 30B). En los ratones con CDKL5 inactivada (-/Y) tratados con TATk-GFP-CDKL5 estos defectos se resolvieron completamente (Figura 28 y Figuras 30A y 30B), lo que sugiere que el impacto positivo del tratamiento con TATk-GFP-CDKL5 sobre la estructura dendrítica se produjo en paralelo a la restauración del aporte a las neuronas.

Ejemplo 9: Efecto de la proteína de fusión TATk-CDKL5 in vivo sobre P-AKT

La AKT es una cinasa de señalización central con múltiples vías celulares. La AKT fosforilada (P-AKT) se reduce significativamente en animales con CDKL5 inactivada, deficiencia de CDKL5 y síndrome de Rett. Las Figuras 29A-29C muestran imágenes representativas que demuestran secciones de cerebro procesadas para inmunofluorescencia con P-AKT de la capa molecular (Mol) de la circunvolución dentada (DG) de un ratón macho natural (+/Y) (Figura 29A), un ratón macho con CDKL5 inactivada (-/Y) (Figura 29B) y un ratón macho con CDKL5 inactivada tratado con una proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 a través de inyecciones intraventriculares suministradas una vez al día durante 5 días consecutivos (-/Y + TATk-GFP-CDKL5) (Figura 29C). Para la inmunohistoquímica de fosfo-AKT, las secciones se incubaron durante 24 horas a 4 °C con anticuerpo anti-fosfo-AKT-Ser473 monoclonal de ratón (1:1000, Cell Signaling Technology) y durante 2 horas con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Cy3 (1:200; Jackson ImmunoResearch). La intensidad de la inmunorreactividad (IR) se determinó mediante densitometría óptica de las secciones teñidas inmunohistoquímicamente. Las imágenes de fluorescencia se capturaron usando un microscopio Nikon Eclipse E600 equipado con una cámara Nikon Digital DXM1200 (sistema ATi).

En ratones macho con CDKL5 inactivada (-/Y), se observó que la densidad óptica de P-AKT en la capa molecular de la DG (Figura 31A) y la capa V de la corteza (Figura 31B) era significativamente menor que en ratones +/Y. En ratones macho con CDKL5 inactivada (-/Y) que recibieron inyecciones intraventriculares de TATk-GFP-CDKL5 durante cinco días consecutivos este defecto se resolvió completamente (Figuras 31A y 31B), lo que demuestra que el tratamiento con TATk-GFP-CDKL5 en ratones con CDKL5 inactivada restaura la actividad de AKT.

Ejemplo 10: Efecto de la proteína de fusión TATk-CDKL5 sobre la capacidad de aprendizaje y memoria

Los ratones con CDKL5 inactivada exhiben deficiencias de aprendizaje y memoria en comparación con los ratones naturales (*ver, p. ej.*, las Figuras 33 y 34A-34B).

Para examinar la capacidad de memoria y aprendizaje, se administraron a ratones con CDKL5 inactivada inyecciones intraventriculares diarias de una proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 durante 10 días consecutivos (*ver, p. ej.*, la Figura 32 para obtener la pauta experimental). Después de un período de descanso de dos días al finalizar los 10 días de inyecciones, los ratones en todos los grupos recibieron la prueba de laberinto de agua de Morris (MWM, por sus siglas en inglés) (Figura 33). La MWM mide la capacidad para encontrar y recordar la posición

de una plataforma sumergida en agua. Se entrenó a los ratones en la tarea de MWM para localizar una plataforma de escape escondida en una piscina circular. El aparato consistía en un tanque de agua circular grande (1,00 m de diámetro, 50 cm de altura) con una plataforma de escape redonda transparente (10 cm²). La piscina se dividió virtualmente en cuatro cuadrantes iguales identificados como noreste, noroeste, sudeste y sudoeste. El tanque se llenó con agua del grifo a una temperatura de 22 °C hasta 0,5 cm por encima de la parte superior de la plataforma y el agua se puso opaca con leche. La plataforma se colocó en el tanque en una posición fija (en el medio del cuadrante noroeste). La piscina se colocó en una habitación grande con varias señales visuales dentro (cuadrados, triángulos, círculos y estrellas) y fuera del laberinto. Después del entrenamiento, se evaluó a cada ratón durante dos sesiones de 4 pruebas cada uno por día, durante 5 días consecutivos con un intervalo entre sesiones de 40 minutos (fase de adquisición). Se colocó una cámara de video sobre el centro de la piscina y se conectó a un sistema de videoseguimiento (Ethovision 3.1; Noldus Information Technology B.V., Wageningen, Países Bajos). Los ratones se liberaron orientados hacia la pared de la piscina desde uno de los siguientes puntos de partida: Norte, Este, Sur u Oeste y se dejó que buscaran la plataforma durante hasta 60 segundos. Si un ratón no encontraba la plataforma, se lo guiaba suavemente hacia ella y se permitía que permaneciera allí durante 15 segundos. Durante el tiempo entre pruebas (15 segundos) los ratones se colocaban en una jaula vacía. La latencia para encontrar la plataforma escondida se usó como una medida del aprendizaje. Todas las sesiones experimentales se llevaron a cabo entre 9:00 am y 15:00 pm.

Los resultados de esta prueba se demuestran en la Figura 33. La Figura 33 muestra un gráfico que demuestra la cuantificación de la fase de aprendizaje según se determina a través de la prueba de laberinto de agua de Morris en ratones macho naturales (+/Y), ratones macho con CDKL5 inactivada (-/Y) y ratones macho con CDKL5 inactivada tratados con una proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 (-/Y + TATk-GFP-CDKL5). Los ratones naturales aprendieron a encontrar la plataforma el segundo día, pero no se detectó ningún aprendizaje significativo en los ratones con CDKL5 inactivada. Los ratones con CDKL5 inactivada tratados con una proteína de fusión TATk-CDKL5 comenzaron a recuperar la capacidad de aprendizaje el día 4 con una mejora continua el día 5.

La capacidad de memoria y aprendizaje se examinaron adicionalmente en respuesta al tratamiento con la proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 usando una prueba de evitación pasiva. Después de 10 días consecutivos de tratamiento y un período de descanso de dos días, ratones de los diversos grupos recibieron la prueba de evitación pasiva (Figura 34). El experimento usaba una jaula de prueba con dos cámaras (iluminada y oscura). El día uno (período de acondicionamiento), los animales se colocaron en la cámara iluminada e instintivamente se pasaron a la cámara oscura donde se acondicionaron con un único evento adverso (choque en la pata). Para la prueba de evitación pasiva, usamos una caja con piso inclinado (47x18x26 cm) dividida en dos compartimientos mediante una puerta corrediza y una unidad de control que incorporaba un electrocutador (Ugo Basile, Italia). Este instrumento clásico para el acondicionamiento pavloviano explota la tendencia en ratones a escapar de un área iluminada hacia una oscura (método de paso a paso). El primer día los ratones se colocaron individualmente en el compartimiento iluminado. Después de 60 segundos de un período de habituación, la puerta de conexión entre las cámaras se abre. En general, los ratones pasan rápidamente a través de la compuerta e ingresan en el compartimiento oscuro porque los ratones prefieren estar en la oscuridad. Después de ingresar en el compartimiento oscuro, los ratones recibieron un breve choque en la pata (0,7 mA durante 3 segundos) y se retiraron de la cámara después de 15 segundos de latencia. Si el ratón permanecía en el compartimiento iluminado durante toda la prueba (358 s), la puerta se cerraba y el ratón se retiraba del compartimiento iluminado. Las cámaras se limpiaron con etanol al 70 % entre las pruebas de los ratones individuales. Después de un período de retención de 24 horas, los ratones se colocaron nuevamente en el compartimiento iluminado y se midió el tiempo que les llevó volver a ingresar al compartimiento oscuro (latencia) hasta 358 segundos.

Las Figuras 34A-34B demuestran los resultados para la prueba de evitación pasiva. La Figura 34A indica que el tiempo de latencia para ingresar a la cámara oscura fue similar para todos los grupos. El día dos (período de prueba) (Figura 34B) los animales se colocaron nuevamente en la cámara iluminada. Se midió la memoria del evento adverso mediante el tiempo de latencia para ingresar en la cámara oscura. Los ratones con CDKL5 inactivada (-/Y) estaban gravemente incapacitados para llevar a cabo esta tarea, como se demuestra mediante una latencia reducida para ingresar en el compartimiento oscuro en comparación con los ratones naturales (+/Y). Los ratones con inactivación tratados con TATk-GFP-CDKL5 exhibieron un tiempo de latencia similar en comparación con los ratones naturales.

En suma, los datos demuestran que TATk-CDKL5 puede aumentar y restaurar la capacidad de aprendizaje y memoria en ratones con CDKL5 inactivada hasta niveles similares observados en ratones naturales no tratados.

Ejemplo 11: Efecto de la proteína de fusión TATk-CDKL5 en la motricidad

Los ratones con CDKL5 inactivada exhibieron agarre de extremidades prolongado cuando se suspendían (*ver, p. ej.*, las Figuras 35A-35B).

Para examinar el efecto de la proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 sobre la motricidad, se administraron inyecciones intraventriculares de TATk-GFP-CDKL5 a los ratones diariamente durante 10 días consecutivos (Figura 35). 10 días después de la finalización del protocolo de dosificación, los animales se suspendieron en el aire por la cola (Figura 35A y Figura 35B). Todos los animales se suspendieron durante aproximadamente 2 minutos y se midió

el tiempo total de agarre de las extremidades. Los resultados de este experimento se demuestran en las Figuras 35A-35B.

5 Las Figuras 35A muestran un gráfico que demuestra la cuantificación de capacidad motora según se determina a través de una prueba de agarre en la que se mide la cantidad de tiempo total de agarre de las extremidades durante un intervalo de 2 minutos en ratones macho naturales (+/Y), ratones macho con CDKL5 inactivada (-/Y) y ratones macho con CDKL5 inactivada tratados con una proteína de fusión TATk-GFP-CDKL5 (-/Y + TATk-GFP-CDKL5) según la pauta de inyección en la Figura 32.

10 Se midió el peso corporal de ratones naturales (+/Y) y Cdkl5 KO (-/Y) que recibieron inyecciones durante 5 (+/Y) o 10 (-/Y) días con la proteína TAT-GFP-CDKL5 y los resultados se demuestran en la Figura 36. No se observaron cambios significativos en el peso corporal durante el período de inyección, lo que sugiere que no hubo efectos secundarios causados por la administración de la proteína TAT-GFP-CDKL5.

En suma, los datos demuestran que el tratamiento con TATk-CDKL5 mejoró la motricidad en ratones con CDKL5 inactivada.

Listado de secuencias

15 <110> Universidad de Bolonia
 <120> PROTEÍNAS DE FUSIÓN TATk-CDKL5, COMPOSICIONES, FORMULACIONES Y USO
 <130> 221006-1020
 <150> US 61/946,280
 <151> 2014-02-28

20 <160> 16
 <170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1
 <211> 727
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDKL5

<400> 1

gtgagcaagg gcgaggagct gttcaccggg gtggtgccca tcctggtcga gctggacggc	60
gacgtaaacg gccacaagtt cagcgtgtcc ggcgagggcg agggcgatgc cacctacggc	120
aagctgaccc tgaagttcat ctgcaccacc ggcaagctgc ccgtgccctg gccaccctc	180
gtgaccaccc tgacctacgg cgtgcagtgc ttcagccgct accccgacca catgaagcag	240
cacgacttct tcaagtccgc catgcccga ggctacgtcc aggagcgac catcttcttc	300
aaggacgacg gcaactacaa gaccgcgcc gagtgaagt tcgagggcga caccctgggtg	360
aaccgcatcg agctgaagg catcgacttc aaggaggacg gcaacatcct ggggcacaag	420
ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc tatatcatgg ccgacaagca gaagaacggc	480
atcaaggtga acttcaagat ccgccacaac atcgaggacg gcagcgtgca gctcgccgac	540
cactaccagc agaacacccc catcggcgac ggccccgtgc tgctgcccga caaccactac	600
ctgagcacc agtccgccct gagcaaagac cccaacgaga agcgcgatca catggtcctg	660
ctggagtctg tgaccgccgc cgggatcact ctcgcatgg acgagctgta caagtccgga	720
ctcagat	727

ES 2 885 245 T3

<210> 2
<211> 1029
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDKL5

<400> 2

Lys	Ile	Pro	Asn	Ile	Gly	Asn	Val	Met	Asn	Lys	Phe	Glu	Ile	Leu	Gly
1				5					10					15	

ES 2 885 245 T3

Val	Val	Gly	Glu	Gly	Ala	Tyr	Gly	Val	Val	Leu	Lys	Cys	Arg	His	Lys
			20					25					30		
Glu	Thr	His	Glu	Ile	Val	Ala	Ile	Lys	Lys	Phe	Lys	Asp	Ser	Glu	Glu
		35					40					45			
Asn	Glu	Glu	Val	Lys	Glu	Thr	Thr	Leu	Arg	Glu	Leu	Lys	Met	Leu	Arg
	50					55					60				
Thr	Leu	Lys	Gln	Glu	Asn	Ile	Val	Glu	Leu	Lys	Glu	Ala	Phe	Arg	Arg
65					70					75					80
Arg	Gly	Lys	Leu	Tyr	Leu	Val	Phe	Glu	Tyr	Val	Glu	Lys	Asn	Met	Leu
				85					90					95	
Glu	Leu	Leu	Glu	Glu	Met	Pro	Asn	Gly	Val	Pro	Pro	Glu	Lys	Val	Lys
			100					105					110		
Ser	Tyr	Ile	Tyr	Gln	Leu	Ile	Lys	Ala	Ile	His	Trp	Cys	His	Lys	Asn
		115					120					125			
Asp	Ile	Val	His	Arg	Asp	Ile	Lys	Pro	Glu	Asn	Leu	Leu	Ile	Ser	His
	130					135					140				
Asn	Asp	Val	Leu	Lys	Leu	Cys	Asp	Phe	Gly	Phe	Ala	Arg	Asn	Leu	Ser
145					150					155					160
Glu	Gly	Asn	Asn	Ala	Asn	Tyr	Thr	Glu	Tyr	Val	Ala	Thr	Arg	Trp	Tyr
				165					170					175	
Arg	Ser	Pro	Glu	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Pro	Tyr	Gly	Lys	Ser	Val	Asp
			180					185					190		
Met	Trp	Ser	Val	Gly	Cys	Ile	Leu	Gly	Glu	Leu	Ser	Asp	Gly	Gln	Pro
		195					200					205			
Leu	Phe	Pro	Gly	Glu	Ser	Glu	Ile	Asp	Gln	Leu	Phe	Thr	Ile	Gln	Lys
	210					215					220				
Val	Leu	Gly	Pro	Leu	Pro	Ser	Glu	Gln	Met	Lys	Leu	Phe	Tyr	Ser	Asn
225					230					235					240
Pro	Arg	Phe	His	Gly	Leu	Arg	Phe	Pro	Ala	Val	Asn	His	Pro	Gln	Ser
				245					250					255	
Leu	Glu	Arg	Arg	Tyr	Leu	Gly	Ile	Leu	Asn	Ser	Val	Leu	Leu	Asp	Leu

ES 2 885 245 T3

[illegible]

ES 2 885 245 T3

Ser Arg Tyr Phe Pro Ser Ser Cys Leu Asp Leu Asn Ser Pro Thr Ser
 515 520 525
 Pro Thr Pro Thr Arg His Ser Asp Thr Arg Thr Leu Leu Ser Pro Ser
 530 535 540
 Gly Arg Asn Asn Arg Asn Glu Gly Thr Leu Asp Ser Arg Arg Thr Thr
 545 550 555 560
 Thr Arg His Ser Lys Thr Met Glu Glu Leu Lys Leu Pro Glu His Met
 565 570 575
 Asp Ser Ser His Ser His Ser Leu Ser Ala Pro His Glu Ser Phe Ser
 580 585 590
 Tyr Gly Leu Gly Tyr Thr Ser Pro Phe Ser Ser Gln Gln Arg Pro His
 595 600 605
 Arg His Ser Met Tyr Val Thr Arg Asp Lys Val Arg Ala Lys Gly Leu
 610 615 620
 Asp Gly Ser Leu Ser Ile Gly Gln Gly Met Ala Ala Arg Ala Asn Ser
 625 630 635 640
 Leu Gln Leu Leu Ser Pro Gln Pro Gly Glu Gln Leu Pro Pro Glu Met
 645 650 655
 Thr Val Ala Arg Ser Ser Val Lys Glu Thr Ser Arg Glu Gly Thr Ser
 660 665 670
 Ser Phe His Thr Arg Gln Lys Ser Glu Gly Gly Val Tyr His Asp Pro
 675 680 685
 His Ser Asp Asp Gly Thr Ala Pro Lys Glu Asn Arg His Leu Tyr Asn
 690 695 700
 Asp Pro Val Pro Arg Arg Val Gly Ser Phe Tyr Arg Val Pro Ser Pro
 705 710 715 720
 Arg Pro Asp Asn Ser Phe His Glu Asn Asn Val Ser Thr Arg Val Ser
 725 730 735
 Ser Leu Pro Ser Glu Ser Ser Ser Gly Thr Asn His Ser Lys Arg Gln
 740 745 750
 Pro Ala Phe Asp Pro Trp Lys Ser Pro Glu Asn Ile Ser His Ser Glu
 755 760 765

ES 2 885 245 T3

Gln Leu Lys Glu Lys Glu Lys Gln Gly Phe Phe Arg Ser Met Lys Lys
 770 775 780
 Lys Lys Lys Lys Ser Gln Thr Val Pro Asn Ser Asp Ser Pro Asp Leu
 785 790 795 800
 Leu Thr Leu Gln Lys Ser Ile His Ser Ala Ser Thr Pro Ser Ser Arg
 805 810 815
 Pro Lys Glu Trp Arg Pro Glu Lys Ile Ser Asp Leu Gln Thr Gln Ser
 820 825 830
 Gln Pro Leu Lys Ser Leu Arg Lys Leu Leu His Leu Ser Ser Ala Ser
 835 840 845
 Asn His Pro Ala Ser Ser Asp Pro Arg Phe Gln Pro Leu Thr Ala Gln
 850 855 860
 Gln Thr Lys Asn Ser Phe Ser Glu Ile Arg Ile His Pro Leu Ser Gln
 865 870 875 880
 Ala Ser Gly Gly Ser Ser Asn Ile Arg Gln Glu Pro Ala Pro Lys Gly
 885 890 895
 Arg Pro Ala Leu Gln Leu Pro Asp Gly Gly Cys Asp Gly Arg Arg Gln
 900 905 910
 Arg His His Ser Gly Pro Gln Asp Arg Arg Phe Met Leu Arg Thr Thr
 915 920 925
 Glu Gln Gln Gly Glu Tyr Phe Cys Cys Gly Asp Pro Lys Lys Pro His
 930 935 940
 Thr Pro Cys Val Pro Asn Arg Ala Leu His Arg Pro Ile Ser Ser Pro
 945 950 955 960
 Ala Pro Tyr Pro Val Leu Gln Val Arg Gly Thr Ser Met Cys Pro Thr
 965 970 975
 Leu Gln Val Arg Gly Thr Asp Ala Phe Ser Cys Pro Thr Gln Gln Ser
 980 985 990
 Gly Phe Ser Phe Phe Val Arg His Val Met Arg Glu Ala Leu Ile His
 995 1000 1005
 Arg Ala Gln Val Asn Gln Ala Ala Leu Leu Thr Tyr His Glu Asn
 1010 1015 1020
 Ala Ala Leu Thr Gly Lys
 1025

<210> 3
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TATk

5 <400> 3
 tacgccagaa aggccgccag gcaggccagg gca 33
 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> TATk

 10 <400> 4
 Tyr Ala Arg Lys Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala
 1 5 10

 <210> 5
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Secuencia líder de cadena de Igk

 <400> 5
 atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60

 20 <210> 6
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia líder de cadena de Igk

 25 <400> 6
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

 Gly Ser Thr Gly
 20
 <210> 7
 <211> 3318
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ADNc de proteína de fusión TATk-CDKL5

 <400> 7

ES 2 885 245 T3

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt	60
gacgcggccc agccggccag gcgcgcgcgc cgtacgaagc ttgcggccta cgccagaaa	120
gccgccaggc aggccagggc accggtgaag attcctaaca ttggtaatgt gatgaataaa	180
tttgagatcc ttgggggtgt aggtgaagga gcctatggag ttgtacttaa atgcagacac	240
aaggaaacac atgaaattgt ggcgatcaag aaattcaagg acagtgaaga aaatgaagaa	300
gtcaaagaaa cgactttacg agagcttaaa atgcttcgga ctctcaagca ggaaaacatt	360
gtggagtga aggaagcatt tcgtcggagg ggaaagtgt acttgggtgt tgagtatgtt	420
gaaaaaata tgctogaatt gctggaagaa atgccaaatg gaggttccacc tgagaaagta	480
aaaagctaca tctatcagct aatcaaggct attcactggg gccataagaa tgatattgtc	540
catcgagata taaaaccaga aaatctctta atcagccaca atgatgtcct aaaactgtgt	600
gactttggtt ttgctcgtaa tctgtcagaa ggcaataatg ctaattacac agagtacgtt	660
gccaccagat ggtatcggtc ccagaaactc ttacttggcg ctccctatgg aaagtccgtg	720
gacatgtggt cggtgggctg tattcttggg gagcttagcg atggacagcc tttatttcct	780
ggagaaaagt aaattgacca actttttact attcagaagg tgctaggacc acttccatct	840
gagcagatga agcttttcta cagtaatcct cgcttccatg ggctccggtt tccagctgtt	900
aaccatcctc agtccttga aagaagatac cttggaatth tgaatagtgt tctacttgac	960
ctaatgaaga atttactgaa gttggacca gctgacagat acttgacaga acagtgtttg	1020
aatcacccta catttcaaac ccagagactt ctggatcgtt ctccctcaag gtcagcaaaa	1080
agaaaacctt accatgtgga aagcagcaca ttgtctaata gaaaccaagc cggcaaaagt	1140
actgctttgc agtctacca cagatctaac agcaaggaca tccagaacct gagtgtaggc	1200
ctgccccggg ctgacgaagg tctccctgcc aatgaaagct tcctaaatgg aaaccttgct	1260
ggagctagtc ttagtccact gcacacaaa acctaccaag caagcagcca gcctgggtct	1320
accagcaaag atctcaccaa caacaacata ccacaccttc ttagccaaa agaagccaag	1380
tcaaaaacag agtttgattt taatattgac ccaaagcctt cagaaggccc agggacaaa	1440
tacctcaagt caaacagcag atctcagcag aaccgccact cattcatgga aagctctcaa	1500
agcaaagctg ggacactgca gcccaatgaa aagcagagtc ggcatagcta tattgacaca	1560
attccccagt cctctaggag tccctcctac aggaccaagg ccaaaagcca tggggcactg	1620
agtgactcca agtctgtgag caacctttct gaagccaggg ccaaattgc ggagcccagt	1680

ES 2 885 245 T3

```

accagtaggt acttcccatc tagctgctta gacttgaatt ctcccaccag cccaaccccc 1740
accagacaca gtgacacgag aactttgctc agcccttctg gaagaaataa ccgaaatgag 1800
ggaacgctgg actcacgtcg aaccacaacc agacattota agacgatgga ggaattgaag 1860
ctgccggagc acatggacag tagccattcc catttactgt ctgcacctca cgaatctttt 1920
tcttatggac tgggctacac cagccccctt tcttcccagc aacgtcctca taggcattct 1980
atgtatgtga cccgtgacaa agtgagagcc aagggttgg atggaagctt gagcataggg 2040
caagggatgg cagctagagc caacagcctg caactcttgt cccccagcc tggagaacag 2100
ctccctccag agatgactgt ggcaagatct tcggtcaaag agacctccag agaaggcacc 2160
tcttctctcc atacacgcca gaagtctgag ggtggagtgt atcatgacct acactctgat 2220
gatggcacag cccccaaaga aaatagacac ctatacaatg atcctgtgcc aaggagagtt 2280
ggtagctttt acagagtgcc atctccacgt ccagacaatt ctttccatga aaataatgtg 2340
tcaactagag tttcttctct accatcagag agcagttctg gaaccaacca ctcaaaaaga 2400
caaccagcat tcgatccatg gaaaagtcct gaaaatatta gtcattcaga gcaactcaag 2460
gaaaaagaga agcaaggatt ttccaggtca atgaaaaaga aaaagaagaa atctcaaaca 2520
gtaccaatc cgcacagccc tgatcttctg acgttgacaga aatccattca ttctgctagc 2580
actccaagca gcagacccaa ggagtggcgc cccgagaaga tctcagatct gcagacccaa 2640
agccagccat taaaatcact gcgcaagttg ttacatctct ctccggcctc aaatcacccg 2700
gcttctctcag atccccgctt ccagccctta acagctcaac aaacccaaaaa ttccttctca 2760
gaaattcggg ttccccctt gagccaggcc tctggcggga gcagcaacat ccggcaggaa 2820
cccgcaccca agggcaggcc agccctccag ctgccagacg gtggatgtga tggcagaaga 2880
cagagacacc attctggacc ccaagataga cgcttcatgt taaggacgac agaacaacaa 2940
ggagaatact tctgctgtgg tgacccaaag aagcctcaca ctccgtgcgt cccaaaccga 3000
gcccttcate gtccaatctc cagtctgctt ccctatccag tactccaggt ccgaggcact 3060
tccatgtgcc cgacactcca ggtccgaggc actgatgctt tcagctgccc aaccagcaa 3120
tccgggttct ctttcttctg gagacacgtt atgagggaag ccctgattca cagggccag 3180
gtaaaccaag ctgcgctcct gacataccat gagaatgcgg cactgacggg caagtccgct 3240
cgaggagggc ccgaacaaaa actcatctca gaagaggatc tgaatagcgc cgtcgaccat 3300
catcatcatc atcattga 3318

```

<210> 8

<211> 1105

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de proteína de fusión TATk-CDKL5

<400> 8

ES 2 885 245 T3

Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro	1	5	10	15
Gly	Ser	Thr	Gly	Asp	Ala	Ala	Gln	Pro	Ala	Arg	Arg	Ala	Arg	Arg	Thr	20	25	30	
Lys	Leu	Ala	Ala	Tyr	Ala	Arg	Lys	Ala	Ala	Arg	Gln	Ala	Arg	Ala	Pro	35	40	45	
Val	Lys	Ile	Pro	Asn	Ile	Gly	Asn	Val	Met	Asn	Lys	Phe	Glu	Ile	Leu	50	55	60	
Gly	Val	Val	Gly	Glu	Gly	Ala	Tyr	Gly	Val	Val	Leu	Lys	Cys	Arg	His	65	70	75	80
Lys	Glu	Thr	His	Glu	Ile	Val	Ala	Ile	Lys	Lys	Phe	Lys	Asp	Ser	Glu	85	90	95	
Glu	Asn	Glu	Glu	Val	Lys	Glu	Thr	Thr	Leu	Arg	Glu	Leu	Lys	Met	Leu	100	105	110	
Arg	Thr	Leu	Lys	Gln	Glu	Asn	Ile	Val	Glu	Leu	Lys	Glu	Ala	Phe	Arg	115	120	125	
Arg	Arg	Gly	Lys	Leu	Tyr	Leu	Val	Phe	Glu	Tyr	Val	Glu	Lys	Asn	Met	130	135	140	
Leu	Glu	Leu	Leu	Glu	Glu	Met	Pro	Asn	Gly	Val	Pro	Pro	Glu	Lys	Val	145	150	155	160
Lys	Ser	Tyr	Ile	Tyr	Gln	Leu	Ile	Lys	Ala	Ile	His	Trp	Cys	His	Lys	165	170	175	
Asn	Asp	Ile	Val	His	Arg	Asp	Ile	Lys	Pro	Glu	Asn	Leu	Leu	Ile	Ser	180	185	190	
His	Asn	Asp	Val	Leu	Lys	Leu	Cys	Asp	Phe	Gly	Phe	Ala	Arg	Asn	Leu	195	200	205	
Ser	Glu	Gly	Asn	Asn	Ala	Asn	Tyr	Thr	Glu	Tyr	Val	Ala	Thr	Arg	Trp	210	215	220	
Tyr	Arg	Ser	Pro	Glu	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Pro	Tyr	Gly	Lys	Ser	Val	225	230	235	240

ES 2 885 245 T3

Asp Met Trp Ser Val Gly Cys Ile Leu Gly Glu Leu Ser Asp Gly Gln
 245 250 255
 Pro Leu Phe Pro Gly Glu Ser Glu Ile Asp Gln Leu Phe Thr Ile Gln
 260 265 270
 Lys Val Leu Gly Pro Leu Pro Ser Glu Gln Met Lys Leu Phe Tyr Ser
 275 280 285
 Asn Pro Arg Phe His Gly Leu Arg Phe Pro Ala Val Asn His Pro Gln
 290 295 300
 Ser Leu Glu Arg Arg Tyr Leu Gly Ile Leu Asn Ser Val Leu Leu Asp
 305 310 315 320
 Leu Met Lys Asn Leu Leu Lys Leu Asp Pro Ala Asp Arg Tyr Leu Thr
 325 330 335
 Glu Gln Cys Leu Asn His Pro Thr Phe Gln Thr Gln Arg Leu Leu Asp
 340 345 350
 Arg Ser Pro Ser Arg Ser Ala Lys Arg Lys Pro Tyr His Val Glu Ser
 355 360 365
 Ser Thr Leu Ser Asn Arg Asn Gln Ala Gly Lys Ser Thr Ala Leu Gln
 370 375 380
 Ser His His Arg Ser Asn Ser Lys Asp Ile Gln Asn Leu Ser Val Gly
 385 390 395 400
 Leu Pro Arg Ala Asp Glu Gly Leu Pro Ala Asn Glu Ser Phe Leu Asn
 405 410 415
 Gly Asn Leu Ala Gly Ala Ser Leu Ser Pro Leu His Thr Lys Thr Tyr
 420 425 430
 Gln Ala Ser Ser Gln Pro Gly Ser Thr Ser Lys Asp Leu Thr Asn Asn
 435 440 445
 Asn Ile Pro His Leu Leu Ser Pro Lys Glu Ala Lys Ser Lys Thr Glu
 450 455 460
 Phe Asp Phe Asn Ile Asp Pro Lys Pro Ser Glu Gly Pro Gly Thr Lys
 465 470 475 480
 Tyr Leu Lys Ser Asn Ser Arg Ser Gln Gln Asn Arg His Ser Phe Met

ES 2 885 245 T3

485					490					495						
Glu	Ser	Ser	Gln	Ser	Lys	Ala	Gly	Thr	Leu	Gln	Pro	Asn	Glu	Lys	Gln	
			500					505					510			
Ser	Arg	His	Ser	Tyr	Ile	Asp	Thr	Ile	Pro	Gln	Ser	Ser	Arg	Ser	Pro	
		515					520					525				
Ser	Tyr	Arg	Thr	Lys	Ala	Lys	Ser	His	Gly	Ala	Leu	Ser	Asp	Ser	Lys	
		530				535					540					
Ser	Val	Ser	Asn	Leu	Ser	Glu	Ala	Arg	Ala	Gln	Ile	Ala	Glu	Pro	Ser	
545					550					555					560	
Thr	Ser	Arg	Tyr	Phe	Pro	Ser	Ser	Cys	Leu	Asp	Leu	Asn	Ser	Pro	Thr	
				565					570					575		
Ser	Pro	Thr	Pro	Thr	Arg	His	Ser	Asp	Thr	Arg	Thr	Leu	Leu	Ser	Pro	
			580					585					590			
Ser	Gly	Arg	Asn	Asn	Arg	Asn	Glu	Gly	Thr	Leu	Asp	Ser	Arg	Arg	Thr	
		595					600					605				
Thr	Thr	Arg	His	Ser	Lys	Thr	Met	Glu	Glu	Leu	Lys	Leu	Pro	Glu	His	
		610				615					620					
Met	Asp	Ser	Ser	His	Ser	His	Ser	Leu	Ser	Ala	Pro	His	Glu	Ser	Phe	
625					630					635					640	
Ser	Tyr	Gly	Leu	Gly	Tyr	Thr	Ser	Pro	Phe	Ser	Ser	Gln	Gln	Arg	Pro	
				645					650					655		
His	Arg	His	Ser	Met	Tyr	Val	Thr	Arg	Asp	Lys	Val	Arg	Ala	Lys	Gly	
			660					665					670			
Leu	Asp	Gly	Ser	Leu	Ser	Ile	Gly	Gln	Gly	Met	Ala	Ala	Arg	Ala	Asn	
		675					680					685				
Ser	Leu	Gln	Leu	Leu	Ser	Pro	Gln	Pro	Gly	Glu	Gln	Leu	Pro	Pro	Glu	
		690				695					700					
Met	Thr	Val	Ala	Arg	Ser	Ser	Val	Lys	Glu	Thr	Ser	Arg	Glu	Gly	Thr	
705					710					715					720	
Ser	Ser	Phe	His	Thr	Arg	Gln	Lys	Ser	Glu	Gly	Gly	Val	Tyr	His	Asp	
				725					730					735		

ES 2 885 245 T3

Pro His Ser Asp Asp Gly Thr Ala Pro Lys Glu Asn Arg His Leu Tyr
 740 745 750
 Asn Asp Pro Val Pro Arg Arg Val Gly Ser Phe Tyr Arg Val Pro Ser
 755 760 765
 Pro Arg Pro Asp Asn Ser Phe His Glu Asn Asn Val Ser Thr Arg Val
 770 775 780
 Ser Ser Leu Pro Ser Glu Ser Ser Ser Gly Thr Asn His Ser Lys Arg
 785 790 795 800
 Gln Pro Ala Phe Asp Pro Trp Lys Ser Pro Glu Asn Ile Ser His Ser
 805 810 815
 Glu Gln Leu Lys Glu Lys Glu Lys Gln Gly Phe Phe Arg Ser Met Lys
 820 825 830
 Lys Lys Lys Lys Lys Ser Gln Thr Val Pro Asn Ser Asp Ser Pro Asp
 835 840 845
 Leu Leu Thr Leu Gln Lys Ser Ile His Ser Ala Ser Thr Pro Ser Ser
 850 855 860
 Arg Pro Lys Glu Trp Arg Pro Glu Lys Ile Ser Asp Leu Gln Thr Gln
 865 870 875 880
 Ser Gln Pro Leu Lys Ser Leu Arg Lys Leu Leu His Leu Ser Ser Ala
 885 890 895
 Ser Asn His Pro Ala Ser Ser Asp Pro Arg Phe Gln Pro Leu Thr Ala
 900 905 910
 Gln Gln Thr Lys Asn Ser Phe Ser Glu Ile Arg Ile His Pro Leu Ser
 915 920 925
 Gln Ala Ser Gly Gly Ser Ser Asn Ile Arg Gln Glu Pro Ala Pro Lys
 930 935 940
 Gly Arg Pro Ala Leu Gln Leu Pro Asp Gly Gly Cys Asp Gly Arg Arg
 945 950 955 960
 Gln Arg His His Ser Gly Pro Gln Asp Arg Arg Phe Met Leu Arg Thr
 965 970 975
 Thr Glu Gln Gln Gly Glu Tyr Phe Cys Cys Gly Asp Pro Lys Lys Pro
 980 985 990

ES 2 885 245 T3

His Thr Pro Cys Val Pro Asn Arg Ala Leu His Arg Pro Ile Ser Ser
995 1000 1005

Pro Ala Pro Tyr Pro Val Leu Gln Val Arg Gly Thr Ser Met Cys
1010 1015 1020

Pro Thr Leu Gln Val Arg Gly Thr Asp Ala Phe Ser Cys Pro Thr
1025 1030 1035

Gln Gln Ser Gly Phe Ser Phe Phe Val Arg His Val Met Arg Glu
1040 1045 1050

Ala Leu Ile His Arg Ala Gln Val Asn Gln Ala Ala Leu Leu Thr
1055 1060 1065

Tyr His Glu Asn Ala Ala Leu Thr Gly Lys Ser Ala Arg Gly Gly
1070 1075 1080

Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val
1085 1090 1095

Asp His His His His His His
1100 1105

<210> 9

<211> 4068

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADNc de proteína de fusión TATk-CDKL5

<400> 9

ES 2 885 245 T3

gctagccacc atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg	60
ttccactggt gacgcggccc agccggccag gcgcgcgcgc cgtacgaagc ttgcggccta	120
cgccagaaag gccgccaggc aggccagggc acggtcgcca ccatggtgag caagggcgag	180
gagctgttca ccgggggtgt gcccatcctg gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac	240
aagttcagcg tgtccggcga gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gaccctgaag	300
ttcatctgca ccaccggcaa gctgcccgtg ccctggccca ccctcgtgac caccctgacc	360
tacggcgtgc agtgcttcag ccgctacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag	420
tccgccatgc ccgaaggcta cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac	480
tacaagaccc gcgccgaggt gaagttcgag ggcgacaccc tggatgaacc catcgagctg	540
aagggcatcg acttcaagga ggacggcaac atcctggggc acaagctgga gtacaactac	600
aacagccaca acgtctatat catggccgac aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc	660

ES 2 885 245 T3

aagatccgcc	acaacatcga	ggacggcagc	gtgcagctcg	ccgaccacta	ccagcagaac	720
acccccatcg	gcgacggccc	cgtgctgctg	cccgacaacc	actacctgag	cacccagtcc	780
gccctgagca	aagaccccaa	cgagaagcgc	gatcacatgg	tccctgctgga	gttcgtgacc	840
gccgcccggga	tcaactctcg	catggacgag	ctgtacaagt	ccggactcag	atctcgagcg	900
aagattccta	acattggtaa	tgtgatgaat	aaatttgaga	tccttggggg	tgtaggtgaa	960
ggagcctatg	gagttgtact	taaatgcaga	cacaaggaaa	cacatgaaat	tgtggcgatc	1020
aagaaattca	aggacagtga	agaaaatgaa	gaagtcaaag	aaacgacttt	acgagagctt	1080
aaaatgcttc	ggactctcaa	gcaggaaaac	attgtggagt	tgaagggaagc	atttcgtcgg	1140
aggggaaagt	tgtacttggg	gtttgagtat	gttgaaaaaa	atatgctcga	attgctggaa	1200
gaaatgccaa	atggagttcc	acctgagaaa	gtaaaaagct	acatctatca	gctaatacaag	1260
gctattcact	ggtgcctaag	aatgatattg	tccatcgaga	tataaaacca	gaaaatctct	1320
taatcagcca	caatgatgtc	ctaaaactgt	gtgactttgg	ttttgctcgt	aatctgtcag	1380
aaggcaataa	tgctaattac	acagagtacg	ttgccaccag	atggtatcgg	tccccagaac	1440
tcttacttgg	cgctccctat	ggaaagtccg	tggacatgtg	gtcgggtggc	tgtattcttg	1500
gggagcttag	cgatggacag	cctttatttc	ctggagaaaag	tgaaattgac	caacttttta	1560
ctattcagaa	ggtgctagga	ccacttccat	ctgagcagat	gaagcttttc	tacagtaatc	1620
ctcgcttcca	tgggctccgg	tttccagctg	ttaaccatcc	tcagtccttg	gaaagaagat	1680
accttggaat	tttgaatagt	gttctacttg	acctaataa	gaatttactg	aagttggacc	1740
cagctgacag	atacttgaca	gaacagtgtt	tgaatcacc	tacatttcaa	accagagac	1800
ttctggatcg	ttctccttca	aggtcagcaa	aaagaaaacc	ttaccatgtg	gaaagcagca	1860
cattgtctaa	tagaaaccaa	gccggcaaaa	gtactgcttt	gcagtctcac	cacagatcta	1920
acagcaagga	catccagaac	ctgagtgtag	gcctgccccg	ggctgacgaa	ggtctccctg	1980
ccaatgaaag	cttctctaat	ggaaaccttg	ctggagctag	tcttagtcca	ctgcacacca	2040
aaacctacca	agcaagcagc	cagcctgggt	ctaccagcaa	agatctcacc	aacaacaaca	2100
taccacacct	tcttagccca	aaagaagcca	agtcaaaaac	agagtttgat	tttaatatgg	2160
acccaaagcc	ttcagaaggc	ccagggacaa	agtacctcaa	gtcaaacagc	agatctcagc	2220
agaaccgcca	ctcattcatg	gaaagctctc	aaagcaaagc	tgggacactg	cagcccaatg	2280
aaaagcagag	tcggcatagc	tatatgaca	caattcccca	gtcctctagg	agtcctctct	2340
acaggaccaa	ggccaaaagc	catggggcac	tgagtgactc	caagtctgtg	agcaaccttt	2400
ctgaagccag	ggcccaaatt	gcggagccca	gtaccagtag	gtacttccca	tctagctgct	2460
tagacttgaa	ttctcccacc	agcccaaccc	ccaccagaca	cagtgcacag	agaactttgc	2520

ES 2 885 245 T3

tcagcccttc tggaagaaat aaccgaaatg agggaaacgct ggactcacgt cgaaccacaa	2580
ccagacattc taagacgatg gaggaattga agctgccgga gcacatggac agtagccatt	2640
ccattcact gtctgcacct cacgaatctt tttcttatgg actgggctac accagccct	2700
tttcttccca gcaacgtcct cataggcatt ctatgtatgt gacccgtgac aaagtgaag	2760
ccaagggctt ggatggaagc ttgagcatag ggcaagggat ggcagctaga gccaacagcc	2820
tgcaactctt gtcacccag cctggagaac agctccctcc agagatgact gtggcaagat	2880
cttcggtcaa agagacctcc agagaaggca cctcttccct ccatacacgc cagaagtctg	2940
aggggtggagt gtatcatgac ccacactctg atgatggcac agccccaaa gaaaatagac	3000
acctatacaa tgatcctgtg ccaaggagag ttggtagctt ttacagagtg ccatctccac	3060
gtccagacaa ttctttccat gaaaataatg tgtcaactag agtttcttct ctaccatcag	3120
agagcagttc tggaaccaac cactcaaaaa gacaaccagc attcgatcca tggaaaagtc	3180
ctgaaaaatat tagtcattca gagcaactca aggaaaaaga gaagcaagga tttttcaggt	3240
caatgaaaaa gaaaaagaag aaatctcaaa cagtacccaa ttccgacagc cctgatcttc	3300
tgacgttgca gaaatccatt cattctgcta gcactccaag cagcagacca aaggagtggc	3360
gccccggaag atctcagatc tgcagaccca aagccagcca ttaaaatcac tgcgcaagtt	3420
gttacatctc tcttoggcct caaatcaccg ggcttcctca gtccccgctt ccagccctta	3480
acagctcaac aaaccaaaaa ttctttctca gaaattcggg ttacccccct gagccaggcc	3540
tctggcggga gcagcaacat ccggcaggaa cccgcaccga agggcaggcc agccctccag	3600
ctgccagaag gtggatgtga tggcagaaga cagagacacc attctggacc ccaagataga	3660
cgcttcatgt taaggacgac agaacaacaa ggagaatact tctgctgtgg tgacccaaag	3720
aagcctcaca ctccgtgcgt cccaaaccga gcccttcata gtccaatctc cagtctgtct	3780
ccctatccag tactccaggt ccgaggcact tccatgtgcc cgacactcca ggtccgaggc	3840
actgatgctt tcagctgccc aaccagcaa tccgggttct ctttcttctg gagacacgtt	3900
atgaggggaag ccctgattca cagggcccag gtaaaccaag ctgcgctcct gacataccat	3960
gagaatgcgg cactgacggg caagtccgct cgaggagggc ccgaacaaaa actcatctca	4020
gaagaggatc tgaatagcgc cgtcgaccat catcatcatc atcattga	4068

<210> 10

<211> 1353

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de proteína de fusión TATk-CDKL5

ES 2 885 245 T3

<400> 10

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr
20 25 30

Lys Leu Ala Ala Tyr Ala Arg Lys Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Pro
35 40 45

Val Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val
50 55 60

Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser
65 70 75 80

Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu
85 90 95

Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu
100 105 110

Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp
115 120 125

His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr
130 135 140

Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr
145 150 155 160

Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu
165 170 175

Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys
180 185 190

Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys
195 200 205

Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu
210 215 220

Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile
225 230 235 240

Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln
245 250 255

ES 2 885 245 T3

Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu
 260 265 270
 Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu
 275 280 285
 Tyr Lys Ser Gly Leu Arg Ser Arg Ala Lys Ile Pro Asn Ile Gly Asn
 290 295 300
 Val Met Asn Lys Phe Glu Ile Leu Gly Val Val Gly Glu Gly Ala Tyr
 305 310 315 320
 Gly Val Val Leu Lys Cys Arg His Lys Glu Thr His Glu Ile Val Ala
 325 330 335
 Ile Lys Lys Phe Lys Asp Ser Glu Glu Asn Glu Glu Val Lys Glu Thr
 340 345 350
 Thr Leu Arg Glu Leu Lys Met Leu Arg Thr Leu Lys Gln Glu Asn Ile
 355 360 365
 Val Glu Leu Lys Glu Ala Phe Arg Arg Arg Gly Lys Leu Tyr Leu Val
 370 375 380
 Phe Glu Tyr Val Glu Lys Asn Met Leu Glu Leu Leu Glu Glu Met Pro
 385 390 395 400
 Asn Gly Val Pro Pro Glu Lys Val Lys Ser Tyr Ile Tyr Gln Leu Ile
 405 410 415
 Lys Ala Ile His Trp Cys His Lys Asn Asp Ile Val His Arg Asp Ile
 420 425 430
 Lys Pro Glu Asn Leu Leu Ile Ser His Asn Asp Val Leu Lys Leu Cys
 435 440 445
 Asp Phe Gly Phe Ala Arg Asn Leu Ser Glu Gly Asn Asn Ala Asn Tyr
 450 455 460
 Thr Glu Tyr Val Ala Thr Arg Trp Tyr Arg Ser Pro Glu Leu Leu Leu
 465 470 475 480
 Gly Ala Pro Tyr Gly Lys Ser Val Asp Met Trp Ser Val Gly Cys Ile
 485 490 495
 Leu Gly Glu Leu Ser Asp Gly Gln Pro Leu Phe Pro Gly Glu Ser Glu
 500 505 510

ES 2 885 245 T3

Ile	Asp	Gln	Leu	Phe	Thr	Ile	Gln	Lys	Val	Leu	Gly	Pro	Leu	Pro	Ser
		515				520					525				
Glu	Gln	Met	Lys	Leu	Phe	Tyr	Ser	Asn	Pro	Arg	Phe	His	Gly	Leu	Arg
		530				535					540				
Phe	Pro	Ala	Val	Asn	His	Pro	Gln	Ser	Leu	Glu	Arg	Arg	Tyr	Leu	Gly
		545			550					555					
Ile	Leu	Asn	Ser	Val	Leu	Leu	Asp	Leu	Met	Lys	Asn	Leu	Leu	Lys	Leu
				565					570					575	
Asp	Pro	Ala	Asp	Arg	Tyr	Leu	Thr	Glu	Gln	Cys	Leu	Asn	His	Pro	Thr
				580			585						590		
Phe	Gln	Thr	Gln	Arg	Leu	Leu	Asp	Arg	Ser	Pro	Ser	Arg	Ser	Ala	Lys
		595				600						605			
Arg	Lys	Pro	Tyr	His	Val	Glu	Ser	Ser	Thr	Leu	Ser	Asn	Arg	Asn	Gln
		610				615						620			
Ala	Gly	Lys	Ser	Thr	Ala	Leu	Gln	Ser	His	His	Arg	Ser	Asn	Ser	Lys
				630						635					
Asp	Ile	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Gly	Leu	Pro	Arg	Ala	Asp	Glu	Gly	Leu
				645				650						655	
Pro	Ala	Asn	Glu	Ser	Phe	Leu	Asn	Gly	Asn	Leu	Ala	Gly	Ala	Ser	Leu
				660				665						670	
Ser	Pro	Leu	His	Thr	Lys	Thr	Tyr	Gln	Ala	Ser	Ser	Gln	Pro	Gly	Ser
		675				680						685			
Thr	Ser	Lys	Asp	Leu	Thr	Asn	Asn	Asn	Ile	Pro	His	Leu	Leu	Ser	Pro
		690				695						700			
Lys	Glu	Ala	Lys	Ser	Lys	Thr	Glu	Phe	Asp	Phe	Asn	Ile	Asp	Pro	Lys
		705				710				715					
Pro	Ser	Glu	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Tyr	Leu	Lys	Ser	Asn	Ser	Arg	Ser
				725				730						735	
Gln	Gln	Asn	Arg	His	Ser	Phe	Met	Glu	Ser	Ser	Gln	Ser	Lys	Ala	Gly
				740				745						750	
Thr	Leu	Gln	Pro	Asn	Glu	Lys	Gln	Ser	Arg	His	Ser	Tyr	Ile	Asp	Thr

ES 2 885 245 T3

755					760					765					
Ile	Pro	Gln	Ser	Ser	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr	Arg	Thr	Lys	Ala	Lys	Ser
	770					775					780				
His	Gly	Ala	Leu	Ser	Asp	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Asn	Leu	Ser	Glu	Ala
785					790					795					800
Arg	Ala	Gln	Ile	Ala	Glu	Pro	Ser	Thr	Ser	Arg	Tyr	Phe	Pro	Ser	Ser
				805					810					815	
Cys	Leu	Asp	Leu	Asn	Ser	Pro	Thr	Ser	Pro	Thr	Pro	Thr	Arg	His	Ser
			820					825					830		
Asp	Thr	Arg	Thr	Leu	Leu	Ser	Pro	Ser	Gly	Arg	Asn	Asn	Arg	Asn	Glu
		835					840					845			
Gly	Thr	Leu	Asp	Ser	Arg	Arg	Thr	Thr	Thr	Arg	His	Ser	Lys	Thr	Met
	850					855						860			
Glu	Glu	Leu	Lys	Leu	Pro	Glu	His	Met	Asp	Ser	Ser	His	Ser	His	Ser
865					870					875					880
Leu	Ser	Ala	Pro	His	Glu	Ser	Phe	Ser	Tyr	Gly	Leu	Gly	Tyr	Thr	Ser
				885					890					895	
Pro	Phe	Ser	Ser	Gln	Gln	Arg	Pro	His	Arg	His	Ser	Met	Tyr	Val	Thr
			900					905					910		
Arg	Asp	Lys	Val	Arg	Ala	Lys	Gly	Leu	Asp	Gly	Ser	Leu	Ser	Ile	Gly
		915					920						925		
Gln	Gly	Met	Ala	Ala	Arg	Ala	Asn	Ser	Leu	Gln	Leu	Leu	Ser	Pro	Gln
	930						935					940			
Pro	Gly	Glu	Gln	Leu	Pro	Pro	Glu	Met	Thr	Val	Ala	Arg	Ser	Ser	Val
945					950					955					960
Lys	Glu	Thr	Ser	Arg	Glu	Gly	Thr	Ser	Ser	Phe	His	Thr	Arg	Gln	Lys
				965					970					975	
Ser	Glu	Gly	Gly	Val	Tyr	His	Asp	Pro	His	Ser	Asp	Asp	Gly	Thr	Ala
			980					985					990		
Pro	Lys	Glu	Asn	Arg	His	Leu	Tyr	Asn	Asp	Pro	Val	Pro	Arg	Arg	Val
		995					1000					1005			

ES 2 885 245 T3

Gly	Ser	Phe	Tyr	Arg	Val	Pro	Ser	Pro	Arg	Pro	Asp	Asn	Ser	Phe
1010						1015					1020			
His	Glu	Asn	Asn	Val	Ser	Thr	Arg	Val	Ser	Ser	Leu	Pro	Ser	Glu
1025						1030					1035			
Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Asn	His	Ser	Lys	Arg	Gln	Pro	Ala	Phe	Asp
1040						1045					1050			
Pro	Trp	Lys	Ser	Pro	Glu	Asn	Ile	Ser	His	Ser	Glu	Gln	Leu	Lys
1055						1060					1065			
Glu	Lys	Glu	Lys	Gln	Gly	Phe	Phe	Arg	Ser	Met	Lys	Lys	Lys	Lys
1070						1075					1080			
Lys	Lys	Ser	Gln	Thr	Val	Pro	Asn	Ser	Asp	Ser	Pro	Asp	Leu	Leu
1085						1090					1095			
Thr	Leu	Gln	Lys	Ser	Ile	His	Ser	Ala	Ser	Thr	Pro	Ser	Ser	Arg
1100						1105					1110			
Pro	Lys	Glu	Trp	Arg	Pro	Glu	Lys	Ile	Ser	Asp	Leu	Gln	Thr	Gln
1115						1120					1125			
Ser	Gln	Pro	Leu	Lys	Ser	Leu	Arg	Lys	Leu	Leu	His	Leu	Ser	Ser
1130						1135					1140			
Ala	Ser	Asn	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Asp	Pro	Arg	Phe	Gln	Pro	Leu
1145						1150					1155			
Thr	Ala	Gln	Gln	Thr	Lys	Asn	Ser	Phe	Ser	Glu	Ile	Arg	Ile	His
1160						1165					1170			
Pro	Leu	Ser	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Ser	Ser	Asn	Ile	Arg	Gln	Glu
1175						1180					1185			
Pro	Ala	Pro	Lys	Gly	Arg	Pro	Ala	Leu	Gln	Leu	Pro	Asp	Gly	Gly
1190						1195					1200			
Cys	Asp	Gly	Arg	Arg	Gln	Arg	His	His	Ser	Gly	Pro	Gln	Asp	Arg
1205						1210					1215			
Arg	Phe	Met	Leu	Arg	Thr	Thr	Glu	Gln	Gln	Gly	Glu	Tyr	Phe	Cys
1220						1225					1230			
Cys	Gly	Asp	Pro	Lys	Lys	Pro	His	Thr	Pro	Cys	Val	Pro	Asn	Arg
1235						1240					1245			

ES 2 885 245 T3

Ala Leu His Arg Pro Ile Ser Ser Pro Ala Pro Tyr Pro Val Leu
1250 1255 1260

Gln Val Arg Gly Thr Ser Met Cys Pro Thr Leu Gln Val Arg Gly
1265 1270 1275

Thr Asp Ala Phe Ser Cys Pro Thr Gln Gln Ser Gly Phe Ser Phe
1280 1285 1290

Phe Val Arg His Val Met Arg Glu Ala Leu Ile His Arg Ala Gln
1295 1300 1305

Val Asn Gln Ala Ala Leu Leu Thr Tyr His Glu Asn Ala Ala Leu
1310 1315 1320

Thr Gly Lys Ser Ala Arg Gly Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser
1325 1330 1335

Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
1340 1345 1350

<210> 11

<211> 3852

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADNc de proteína de fusión TATk-CDKL5

<400> 11

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt	60
gacgcggccc agccggccag gcgcgcgcgc cgtacgaagc ttgcggccta cgccagaaag	120
gccgccaggc aggccagggc accggtcgcc accatggtga gcaagggcga ggagctgttc	180
accgggggtg tgcccatcct ggtcgagctg gacggcgacg taaacggcca caagttcagc	240
gtgtccggcg agggcgaggg cgatgccacc tacggcaagc tgaccctgaa gttcatctgc	300
accaccggca agctgcccgt gccctggccc accctcgtga ccaccctgac ctacggcgtg	360
cagtgtttca gccgtaccc cgaccacatg aagcagcagc acttcttcaa gtccgccatg	420
cccgaaggct acgtccagga gcgcaccatc ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc	480
cgcgccgagg tgaagtctga gggcgacacc ctggtgaacc gcatcgagct gaagggcatc	540
gacttcaagg aggacggcaa catcctgggg cacaagctgg agtacaacta caacagccac	600
aacgtctata tcatggccga caagcagaag aacggcatca aggtgaactt caagatccgc	660
cacaacatcg aggacggcag cgtgcagctc gccgaccact accagcagaa ccccccatc	720
ggcgacggcc ccgtgctgct gcccgacaac cactacctga gcacccagtc cgccctgagc	780

ES 2 885 245 T3

aaagacccca	acgagaagcg	cgatcacatg	gtcctgctgg	agttcgtgac	cgccgcccgg	840
atcactctcg	gcatggacga	gctgtacaag	tccggactca	gatctcgagc	gaagattcct	900
aacattggta	atgtgatgaa	taaatttgag	atccttgggg	ttgtagggtga	aggagcctat	960
ggagttgtac	ttaaatgcag	acacaaggaa	acacatgaaa	ttgtggcgat	caagaaattc	1020
aaggacagtg	aagaaaatga	agaagtcaaa	gaaacgactt	tacgagagct	taaaatgctt	1080
cggactctca	agcaggaaaa	cattgtggag	ttgaaggaa	catttcgtcg	gaggggaaag	1140
ttgtacttgg	tgtttgagta	tggtgaaaaa	aatatgctcg	aattgctgga	agaaatgcc	1200
aatggagttc	cacctgagaa	agtaaaaagc	tacatctatc	agctaataca	ggctattcac	1260
tggtgccata	agaatgatat	tgtccatcga	gatataaaac	cagaaaatct	cttaatcagc	1320
cacaatgatg	tcctaaaact	gtgtgacttt	ggttttgctc	gtaatctgtc	agaaggcaat	1380
aatgctaatt	acacagagta	cgttgccacc	agatggtatc	ggccccaga	actcttactt	1440
ggcgctccct	atggaaagtc	cgtggacatg	tggtcggtgg	gctgtattct	tggggagctt	1500
agcgatggac	agcctttatt	tcctggagaa	agtgaatttg	accaactttt	tactattcag	1560
aagggtgctag	gaccacttcc	atctgagcag	atgaagcttt	tctacagtaa	tcctcgcttc	1620
catgggctcc	ggtttccagc	tgtaaacct	cctcagtcct	tggaagaag	ataccttgga	1680
attttgaata	gtgttctact	tgacctaatg	aagaatttac	tgaagttgga	cccagctgac	1740
agataactga	cagaacagtg	tttgaatcac	cctacatttc	aaaccagag	acttctggat	1800
cgttctcctt	caaggtcagc	aaaaagaaaa	ccttaccatg	tggaagcag	cacattgtct	1860
aatagaaacc	aagccggcaa	aagtactgct	ttgcagtctc	accacagatc	taacagcaag	1920
gacatccaga	acctgagtgt	aggcctgccc	cgggctgacg	aaggctctcc	tgccaatgaa	1980
agcttcctaa	atggaaacct	tgctggagct	agtcttagtc	cactgcacac	caaaacctac	2040
caagcaagca	gccagcctgg	gtctaccagc	aaagatctca	ccaacaacaa	cataccacac	2100
cttcttagcc	caaaagaagc	caagtcaaaa	acagagtttg	attttaatat	tgacccaaag	2160
ccttcagaag	gccaggagac	aaagtacctc	aagtcaaaac	gcagatctca	gcagaaccgc	2220
cactcattca	tggaagctc	tcaaagcaaa	gctgggacac	tgagcccaa	tgaaaagcag	2280
agtcggcata	gctatatattga	cacaattccc	cagtcctcta	ggagtccctc	ctacaggacc	2340
aaggccaaaa	gccatggggc	actgagtgc	tccaagtctg	tgagcaacct	ttctgaagcc	2400
agggcccaaa	ttgcccagcc	cagtaccagt	aggtacttcc	catctagctg	cttagacttg	2460
aattctccca	ccagcccaac	ccccaccaga	cacagtgcac	cgagaacttt	gctcagccct	2520
tctggaagaa	ataaccgaaa	tgagggaacg	ctggactcac	gtcgaaccac	aaccagacat	2580
tctaagacga	tgagggaatt	gaagctgccg	gagcacatgg	acagtagcca	ttccattca	2640

ES 2 885 245 T3

```

ctgtctgcac ctacgaatc tttttcttat ggactgggct acaccagccc cttttcttcc 2700
cagcaacgtc ctcataggca ttctatgtat gtgaccctgt acaaagttag agccaagggc 2760
ttggatggaa gcttgagcat agggcaaggg atggcagcta gagccaacag cctgcaactc 2820
ttgtcacccc agcctggaga acagctccct ccagagatga ctgtggcaag atcttcggtc 2880
aaagagacct ccagagaagg cacctcttcc ttccatacac gccagaagtc tgagggtgga 2940
gtgtatcatg acccacactc tgatgatggc acagcccca aagaaaatag acacctatac 3000
aatgatcctg tgccaaggag agttggtagc ttttacagag tgccatctcc acgtccagac 3060
aattctttcc atgaaaataa tgtgtcaact agagtttctt ctctaccatc agagagcagt 3120
tctggaacca accactcaaa aagacaacca gcattcgatc catggaaaag tctgaaaat 3180
attagtcatt cagagcaact caaggaaaaa gagaagcaag gatttttcag gtcaatgaaa 3240
aagaaaaaga agaaatctca aacagtaccc aattccgaca gccctgatct tctgacgttg 3300
cagaaatcca ttcatctctg tagcactcca agcagcagac caaaggagtg gcgccccgag 3360
aagatctcag atctgcagac ccaaagccag ccattaaaat cactgcgcaa gttgttacat 3420
ctctctctgg cctcaaatca cccggcttcc tcagatcccc gcttccagcc cttaacagct 3480
caacaaacca aaaattcctt ctcagaaatt cggattcacc ccctgagcca ggctctggc 3540
gggagcagca acatccggca ggaacccgca ccgaagggca ggccagccct ccagctgcca 3600
ggtcagatgg atcctgggtg gcatgtgtcc tctgtgacca ggagtgccac agagggccct 3660
tcctactctg aacagctggg tgccaaaagt gggccaaatg ggcacccta taacagaaca 3720
aatcgctcac gaatgcaaaa tctgaatgat ttaaaagaga cagccttgtc cgctcgagga 3780
gggcccgaac aaaaactcat ctcagaagag gatctgaata gcgcgctga ccatcatcat 3840
catcatcatt ga 3852

```

<210> 12

<211> 1283

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de proteína de fusión TATk-CDKL5

<400> 12

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr
20 25 30

Lys Leu Ala Ala Tyr Ala Arg Lys Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Pro
35 40 45

ES 2 885 245 T3

Val	Ala	Thr	Met	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val	50	55	60	
Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	65	70	75	80
Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	85	90	95	
Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	100	105	110	
Val	Thr	Thr	Leu	Thr	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser	Arg	Tyr	Pro	Asp	115	120	125	
His	Met	Lys	Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	130	135	140	
Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	145	150	155	160
Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	165	170	175	
Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	180	185	190	
Leu	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	195	200	205	
Gln	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	210	215	220	
Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	225	230	235	240
Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gln	245	250	255	
Ser	Ala	Leu	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	260	265	270	
Leu	Glu	Phe	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	Leu	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	275	280	285	
Tyr	Lys	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Arg	Ala	Lys	Ile	Pro	Asn	Ile	Gly	Asn				

ES 2 885 245 T3

290		295		300
Val Met Asn Lys Phe Glu Ile Leu Gly Val Val Gly Glu Gly Ala Tyr				
305		310		315 320
Gly Val Val Leu Lys Cys Arg His Lys Glu Thr His Glu Ile Val Ala				
		325	330	335
Ile Lys Lys Phe Lys Asp Ser Glu Glu Asn Glu Glu Val Lys Glu Thr				
		340	345	350
Thr Leu Arg Glu Leu Lys Met Leu Arg Thr Leu Lys Gln Glu Asn Ile				
		355	360	365
Val Glu Leu Lys Glu Ala Phe Arg Arg Arg Gly Lys Leu Tyr Leu Val				
		370	375	380
Phe Glu Tyr Val Glu Lys Asn Met Leu Glu Leu Leu Glu Glu Met Pro				
		385	390	395 400
Asn Gly Val Pro Pro Glu Lys Val Lys Ser Tyr Ile Tyr Gln Leu Ile				
		405	410	415
Lys Ala Ile His Trp Cys His Lys Asn Asp Ile Val His Arg Asp Ile				
		420	425	430
Lys Pro Glu Asn Leu Leu Ile Ser His Asn Asp Val Leu Lys Leu Cys				
		435	440	445
Asp Phe Gly Phe Ala Arg Asn Leu Ser Glu Gly Asn Asn Ala Asn Tyr				
		450	455	460
Thr Glu Tyr Val Ala Thr Arg Trp Tyr Arg Ser Pro Glu Leu Leu Leu				
		465	470	475 480
Gly Ala Pro Tyr Gly Lys Ser Val Asp Met Trp Ser Val Gly Cys Ile				
		485	490	495
Leu Gly Glu Leu Ser Asp Gly Gln Pro Leu Phe Pro Gly Glu Ser Glu				
		500	505	510
Ile Asp Gln Leu Phe Thr Ile Gln Lys Val Leu Gly Pro Leu Pro Ser				
		515	520	525
Glu Gln Met Lys Leu Phe Tyr Ser Asn Pro Arg Phe His Gly Leu Arg				
		530	535	540

ES 2 885 245 T3

Phe	Pro	Ala	Val	Asn	His	Pro	Gln	Ser	Leu	Glu	Arg	Arg	Tyr	Leu	Gly	545	550	555	560
Ile	Leu	Asn	Ser	Val	Leu	Leu	Asp	Leu	Met	Lys	Asn	Leu	Leu	Lys	Leu	565	570	575	
Asp	Pro	Ala	Asp	Arg	Tyr	Leu	Thr	Glu	Gln	Cys	Leu	Asn	His	Pro	Thr	580	585	590	
Phe	Gln	Thr	Gln	Arg	Leu	Leu	Asp	Arg	Ser	Pro	Ser	Arg	Ser	Ala	Lys	595	600	605	
Arg	Lys	Pro	Tyr	His	Val	Glu	Ser	Ser	Thr	Leu	Ser	Asn	Arg	Asn	Gln	610	615	620	
Ala	Gly	Lys	Ser	Thr	Ala	Leu	Gln	Ser	His	His	Arg	Ser	Asn	Ser	Lys	625	630	635	640
Asp	Ile	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Gly	Leu	Pro	Arg	Ala	Asp	Glu	Gly	Leu	645	650	655	
Pro	Ala	Asn	Glu	Ser	Phe	Leu	Asn	Gly	Asn	Leu	Ala	Gly	Ala	Ser	Leu	660	665	670	
Ser	Pro	Leu	His	Thr	Lys	Thr	Tyr	Gln	Ala	Ser	Ser	Gln	Pro	Gly	Ser	675	680	685	
Thr	Ser	Lys	Asp	Leu	Thr	Asn	Asn	Asn	Ile	Pro	His	Leu	Leu	Ser	Pro	690	695	700	
Lys	Glu	Ala	Lys	Ser	Lys	Thr	Glu	Phe	Asp	Phe	Asn	Ile	Asp	Pro	Lys	705	710	715	720
Pro	Ser	Glu	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Tyr	Leu	Lys	Ser	Asn	Ser	Arg	Ser	725	730	735	
Gln	Gln	Asn	Arg	His	Ser	Phe	Met	Glu	Ser	Ser	Gln	Ser	Lys	Ala	Gly	740	745	750	
Thr	Leu	Gln	Pro	Asn	Glu	Lys	Gln	Ser	Arg	His	Ser	Tyr	Ile	Asp	Thr	755	760	765	
Ile	Pro	Gln	Ser	Ser	Arg	Ser	Pro	Ser	Tyr	Arg	Thr	Lys	Ala	Lys	Ser	770	775	780	
His	Gly	Ala	Leu	Ser	Asp	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Asn	Leu	Ser	Glu	Ala	785	790	795	800

ES 2 885 245 T3

Arg Ala Gln Ile Ala Glu Pro Ser Thr Ser Arg Tyr Phe Pro Ser Ser
 805 810 815
 Cys Leu Asp Leu Asn Ser Pro Thr Ser Pro Thr Pro Thr Arg His Ser
 820 825 830
 Asp Thr Arg Thr Leu Leu Ser Pro Ser Gly Arg Asn Asn Arg Asn Glu
 835 840 845
 Gly Thr Leu Asp Ser Arg Arg Thr Thr Thr Arg His Ser Lys Thr Met
 850 855 860
 Glu Glu Leu Lys Leu Pro Glu His Met Asp Ser Ser His Ser His Ser
 865 870 875 880
 Leu Ser Ala Pro His Glu Ser Phe Ser Tyr Gly Leu Gly Tyr Thr Ser
 885 890 895
 Pro Phe Ser Ser Gln Gln Arg Pro His Arg His Ser Met Tyr Val Thr
 900 905 910
 Arg Asp Lys Val Arg Ala Lys Gly Leu Asp Gly Ser Leu Ser Ile Gly
 915 920 925
 Gln Gly Met Ala Ala Arg Ala Asn Ser Leu Gln Leu Leu Ser Pro Gln
 930 935 940
 Pro Gly Glu Gln Leu Pro Pro Glu Met Thr Val Ala Arg Ser Ser Val
 945 950 955 960
 Lys Glu Thr Ser Arg Glu Gly Thr Ser Ser Phe His Thr Arg Gln Lys
 965 970 975
 Ser Glu Gly Gly Val Tyr His Asp Pro His Ser Asp Asp Gly Thr Ala
 980 985 990
 Pro Lys Glu Asn Arg His Leu Tyr Asn Asp Pro Val Pro Arg Arg Val
 995 1000 1005
 Gly Ser Phe Tyr Arg Val Pro Ser Pro Arg Pro Asp Asn Ser Phe
 1010 1015 1020
 His Glu Asn Asn Val Ser Thr Arg Val Ser Ser Leu Pro Ser Glu
 1025 1030 1035
 Ser Ser Ser Gly Thr Asn His Ser Lys Arg Gln Pro Ala Phe Asp
 1040 1045 1050

ES 2 885 245 T3

Pro Trp Lys Ser Pro Glu Asn Ile Ser His Ser Glu Gln Leu Lys
1055 1060 1065

Glu Lys Glu Lys Gln Gly Phe Phe Arg Ser Met Lys Lys Lys Lys
1070 1075 1080

Lys Lys Ser Gln Thr Val Pro Asn Ser Asp Ser Pro Asp Leu Leu
1085 1090 1095

Thr Leu Gln Lys Ser Ile His Ser Ala Ser Thr Pro Ser Ser Arg
1100 1105 1110

Pro Lys Glu Trp Arg Pro Glu Lys Ile Ser Asp Leu Gln Thr Gln
1115 1120 1125

Ser Gln Pro Leu Lys Ser Leu Arg Lys Leu Leu His Leu Ser Ser
1130 1135 1140

Ala Ser Asn His Pro Ala Ser Ser Asp Pro Arg Phe Gln Pro Leu
1145 1150 1155

Thr Ala Gln Gln Thr Lys Asn Ser Phe Ser Glu Ile Arg Ile His
1160 1165 1170

Pro Leu Ser Gln Ala Ser Gly Gly Ser Ser Asn Ile Arg Gln Glu
1175 1180 1185

Pro Ala Pro Lys Gly Arg Pro Ala Leu Gln Leu Pro Gly Gln Met
1190 1195 1200

Asp Pro Gly Trp His Val Ser Ser Val Thr Arg Ser Ala Thr Glu
1205 1210 1215

Gly Pro Ser Tyr Ser Glu Gln Leu Gly Ala Lys Ser Gly Pro Asn
1220 1225 1230

Gly His Pro Tyr Asn Arg Thr Asn Arg Ser Arg Met Pro Asn Leu
1235 1240 1245

Asn Asp Leu Lys Glu Thr Ala Leu Ser Ala Arg Gly Gly Pro Glu
1250 1255 1260

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His
1265 1270 1275

His His His His His
1280

<210> 13
<211> 3124
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADNc de proteína de fusión TATk-CDKL5
<400> 13

ES 2 885 245 T3

gctagccacc atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg	60
ttccactggt gacgcggccc agccggccag gcgcgcgcgc cgtacgaagc ttgcggccta	120
cgccagaaaag gccgccaggc aggccagggc accggtgaag attcctaaca ttggtaatgt	180
gatgaataaa tttgagatcc ttggggttgt aggtgaagga gcctatggag ttgtacttaa	240
atgcagacac aaggaaacac atgaaattgt ggcgatcaag aaattcaagg acagtgaaga	300
aatgaagaa gtcaaagaaa cgactttacg agagcttaaa atgcttcgga ctctcaagca	360
ggaaaacatt gtggagttga aggaagcatt tcgtcggagg ggaaagttgt acttggtggt	420
tgagtatggt gaaaaaata tgctcgaatt gctggaagaa atgccaaatg gagttccacc	480
tgagaaagta aaaagctaca tctatcagct aatcaaggct attcactggt gccataagaa	540
tgatatgtgc catcgagata taaaaccaga aaatctctta atcagccaca atgatgtcct	600
aaaactgtgt gactttggtt ttgctcgtaa tctgtcagaa ggcaataatg ctaattacac	660
agagtacgtt gccaccagat ggtatcggtc ccagaaactc ttacttggcg ctccctatgg	720
aaagtccgtg gacatgtggt cgggtgggctg tattcttggg gagcttagcg atggacagcc	780
tttatttcct ggagaaagtg aaattgacca actttttact attcagaagg tgctaggacc	840
acttccatct gagcagatga agcttttcta cagtaatcct cgcttccatg ggctccggtt	900
tccagctggt aaccatcctc agtccttga aagaagatac cttggaattt tgaatagtgt	960
tctacttgac ctaatgaaga atttactgaa gttggaccca gctgacagat acttgacaga	1020
acagtgtttg aatcaccccta catttcaaac ccagagactt ctggatcggt ctccctcaag	1080
gtcagcaaaa agaaaacctt accatgtgga aagcagcaca ttgtctaata gaaaccaagc	1140
cggcaaaaagt actgctttgc agtctcacca cagatctaac agcaaggaca tccagaacct	1200
gagtgtaggc ctgccccggg ctgacgaagg tctccctgcc aatgaaagct tcctaaatgg	1260
aaaccttgct ggagctagtc ttagtccact gcacacccaa acctaccaag caagcagcca	1320
gcctgggtct accagcaaag atctcaccaa caacaacata ccacaccttc ttagcccaa	1380
agaagccaag tcaaaaacag agtttgattt taatattgac ccaaagcctt cagaaggccc	1440
agggacaaag tacctcaagt caaacagcag atctcagcag aaccgccact cattcatgga	1500
aagctctcaa agcaaagctg ggacactgca gcccaatgaa aagcagagtc ggcatagcta	1560

ES 2 885 245 T3

tattgacaca attccccagt cctctaggag tccctcctac aggaccaag ccaaaagcca	1620
tggggcactg agtgactcca agtctgtgag caacctttct gaagccagg cccaaattgc	1680
ggagcccagt accagtaggt acttcccatc tagctgctta gacttgaatt ctcccaccag	1740
cccaaccccc accagacaca gtgacacgag aactttgtct agcccttctg gaagaaataa	1800
ccgaaatgag ggaacgctgg actcacgtcg aaccacaacc agacattcta agacgatgga	1860
ggaattgaag ctgccggagc acatggacag tagccattcc cattcactgt ctgcacctca	1920
cgaatctttt tcttatggac tgggctacac cagccccctt tcttcccagc aacgtcctca	1980
taggcattct atgtatgtga cccgtgacaa agtgagagcc aagggttgg atggaagctt	2040
gagcataggg caagggatgg cagctagagc caacagcctg caactcttgt cccccagcc	2100
tggagaacag ctccctccag agatgactgt ggcaagatct tcggtcaaag agacctccag	2160
agaaggcacc tcttccttcc atacacgcca gaagtctgag ggtggagtgt atcatgacct	2220
acactctgat gatggcacag cccccaaaga aaatagacac ctatacaatg atcctgtgcc	2280
aaggagagtt ggtagctttt acagagtgcc atctccacgt ccagacaatt ctttccatga	2340
aaataatgtg tcaactagag tttcttctct accatcagag agcagttctg gaaccaacca	2400
ctcaaaaaga caaccagcat tcgatccatg gaaaagtctt gaaaatatta gtcattcaga	2460
gcaactcaag gaaaaagaga agcaaggatt ttccaggtca atgaaaaaga aaaagaagaa	2520
atctcaaaca gtacccaatt ccgacagccc tgatcttctg acgttgacga aatccattca	2580
ttctgctagc actccaagca gcagacccaa ggagtggcgc cccgagaaga tctcagatct	2640
gcagacccaa agccagccat taaaatcact gcgcaagttg ttacatctct cttcggcctc	2700
aaatcaccog gcttctcag atccccgctt ccagccctta acagctcaac aaaccaaaaa	2760
ttccttctca gaaattcgga ttcacccctt gagccaggcc tctggcggga gcagcaacat	2820
ccggcaggaa cccgcaccga agggcaggcc agccctccag ctgccaggtc agatggatcc	2880
tggttggcat gtgtcctctg tgaccaggag tgccacagag gcccttcctt actctgaaca	2940
gctgggtgcc aaaagtgggc caaatgggca cccctataac agaacaatc gctcacgaat	3000
gccaaatctg aatgatttaa aagagacagc cttgtctaga ggatcccggt ctgactacaa	3060
agaccatgac ggtgattata aagatcatga catcgactac aaggatgacg atgacaagta	3120
gtga	3124

<210> 14

<211> 1036

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de proteína de fusión TATk-CDKL5

<400> 14

ES 2 885 245 T3

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr
 20 25 30
 Lys Leu Ala Ala Tyr Ala Arg Lys Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Pro
 35 40 45
 Val Lys Ile Pro Asn Ile Gly Asn Val Met Asn Lys Phe Glu Ile Leu
 50 55 60
 Gly Val Val Gly Glu Gly Ala Tyr Gly Val Val Leu Lys Cys Arg His
 65 70 75 80
 Lys Glu Thr His Glu Ile Val Ala Ile Lys Lys Phe Lys Asp Ser Glu
 85 90 95
 Glu Asn Glu Glu Val Lys Glu Thr Thr Leu Arg Glu Leu Lys Met Leu
 100 105 110
 Arg Thr Leu Lys Gln Glu Asn Ile Val Glu Leu Lys Glu Ala Phe Arg
 115 120 125
 Arg Arg Gly Lys Leu Tyr Leu Val Phe Glu Tyr Val Glu Lys Asn Met
 130 135 140
 Leu Glu Leu Leu Glu Glu Met Pro Asn Gly Val Pro Pro Glu Lys Val
 145 150 155 160
 Lys Ser Tyr Ile Tyr Gln Leu Ile Lys Ala Ile His Trp Cys His Lys
 165 170 175
 Asn Asp Ile Val His Arg Asp Ile Lys Pro Glu Asn Leu Leu Ile Ser
 180 185 190
 His Asn Asp Val Leu Lys Leu Cys Asp Phe Gly Phe Ala Arg Asn Leu
 195 200 205
 Ser Glu Gly Asn Asn Ala Asn Tyr Thr Glu Tyr Val Ala Thr Arg Trp
 210 215 220
 Tyr Arg Ser Pro Glu Leu Leu Leu Gly Ala Pro Tyr Gly Lys Ser Val
 225 230 235 240

ES 2 885 245 T3

Asp Met Trp Ser Val Gly Cys Ile Leu Gly Glu Leu Ser Asp Gly Gln
 245 250 255
 Pro Leu Phe Pro Gly Glu Ser Glu Ile Asp Gln Leu Phe Thr Ile Gln
 260 265 270
 Lys Val Leu Gly Pro Leu Pro Ser Glu Gln Met Lys Leu Phe Tyr Ser
 275 280 285
 Asn Pro Arg Phe His Gly Leu Arg Phe Pro Ala Val Asn His Pro Gln
 290 295 300
 Ser Leu Glu Arg Arg Tyr Leu Gly Ile Leu Asn Ser Val Leu Leu Asp
 305 310 315 320
 Leu Met Lys Asn Leu Leu Lys Leu Asp Pro Ala Asp Arg Tyr Leu Thr
 325 330 335
 Glu Gln Cys Leu Asn His Pro Thr Phe Gln Thr Gln Arg Leu Leu Asp
 340 345 350
 Arg Ser Pro Ser Arg Ser Ala Lys Arg Lys Pro Tyr His Val Glu Ser
 355 360 365
 Ser Thr Leu Ser Asn Arg Asn Gln Ala Gly Lys Ser Thr Ala Leu Gln
 370 375 380
 Ser His His Arg Ser Asn Ser Lys Asp Ile Gln Asn Leu Ser Val Gly
 385 390 395 400
 Leu Pro Arg Ala Asp Glu Gly Leu Pro Ala Asn Glu Ser Phe Leu Asn
 405 410 415
 Gly Asn Leu Ala Gly Ala Ser Leu Ser Pro Leu His Thr Lys Thr Tyr
 420 425 430
 Gln Ala Ser Ser Gln Pro Gly Ser Thr Ser Lys Asp Leu Thr Asn Asn
 435 440 445
 Asn Ile Pro His Leu Leu Ser Pro Lys Glu Ala Lys Ser Lys Thr Glu
 450 455 460
 Phe Asp Phe Asn Ile Asp Pro Lys Pro Ser Glu Gly Pro Gly Thr Lys
 465 470 475 480
 Tyr Leu Lys Ser Asn Ser Arg Ser Gln Gln Asn Arg His Ser Phe Met
 485 490 495

ES 2 885 245 T3

Glu Ser Ser Gln Ser Lys Ala Gly Thr Leu Gln Pro Asn Glu Lys Gln
 500 505 510

Ser Arg His Ser Tyr Ile Asp Thr Ile Pro Gln Ser Ser Arg Ser Pro
 515 520 525

Ser Tyr Arg Thr Lys Ala Lys Ser His Gly Ala Leu Ser Asp Ser Lys
 530 535 540

Ser Val Ser Asn Leu Ser Glu Ala Arg Ala Gln Ile Ala Glu Pro Ser
 545 550 555 560

Thr Ser Arg Tyr Phe Pro Ser Ser Cys Leu Asp Leu Asn Ser Pro Thr
 565 570 575

Ser Pro Thr Pro Thr Arg His Ser Asp Thr Arg Thr Leu Leu Ser Pro
 580 585 590

Ser Gly Arg Asn Asn Arg Asn Glu Gly Thr Leu Asp Ser Arg Arg Thr
 595 600 605

Thr Thr Arg His Ser Lys Thr Met Glu Glu Leu Lys Leu Pro Glu His
 610 615 620

Met Asp Ser Ser His Ser His Ser Leu Ser Ala Pro His Glu Ser Phe
 625 630 635 640

Ser Tyr Gly Leu Gly Tyr Thr Ser Pro Phe Ser Ser Gln Gln Arg Pro
 645 650 655

His Arg His Ser Met Tyr Val Thr Arg Asp Lys Val Arg Ala Lys Gly
 660 665 670

Leu Asp Gly Ser Leu Ser Ile Gly Gln Gly Met Ala Ala Arg Ala Asn
 675 680 685

Ser Leu Gln Leu Leu Ser Pro Gln Pro Gly Glu Gln Leu Pro Pro Glu
 690 695 700

Met Thr Val Ala Arg Ser Ser Val Lys Glu Thr Ser Arg Glu Gly Thr
 705 710 715 720

Ser Ser Phe His Thr Arg Gln Lys Ser Glu Gly Gly Val Tyr His Asp
 725 730 735

Pro His Ser Asp Asp Gly Thr Ala Pro Lys Glu Asn Arg His Leu Tyr
 740 745 750

ES 2 885 245 T3

Asn Asp Pro Val Pro Arg Arg Val Gly Ser Phe Tyr Arg Val Pro Ser
 755 760 765
 Pro Arg Pro Asp Asn Ser Phe His Glu Asn Asn Val Ser Thr Arg Val
 770 775 780
 Ser Ser Leu Pro Ser Glu Ser Ser Ser Gly Thr Asn His Ser Lys Arg
 785 790 795 800
 Gln Pro Ala Phe Asp Pro Trp Lys Ser Pro Glu Asn Ile Ser His Ser
 805 810 815
 Glu Gln Leu Lys Glu Lys Glu Lys Gln Gly Phe Phe Arg Ser Met Lys
 820 825 830
 Lys Lys Lys Lys Lys Ser Gln Thr Val Pro Asn Ser Asp Ser Pro Asp
 835 840 845
 Leu Leu Thr Leu Gln Lys Ser Ile His Ser Ala Ser Thr Pro Ser Ser
 850 855 860
 Arg Pro Lys Glu Trp Arg Pro Glu Lys Ile Ser Asp Leu Gln Thr Gln
 865 870 875 880
 Ser Gln Pro Leu Lys Ser Leu Arg Lys Leu Leu His Leu Ser Ser Ala
 885 890 895
 Ser Asn His Pro Ala Ser Ser Asp Pro Arg Phe Gln Pro Leu Thr Ala
 900 905 910
 Gln Gln Thr Lys Asn Ser Phe Ser Glu Ile Arg Ile His Pro Leu Ser
 915 920 925
 Gln Ala Ser Gly Gly Ser Ser Asn Ile Arg Gln Glu Pro Ala Pro Lys
 930 935 940
 Gly Arg Pro Ala Leu Gln Leu Pro Gly Gln Met Asp Pro Gly Trp His
 945 950 955 960
 Val Ser Ser Val Thr Arg Ser Ala Thr Glu Gly Pro Ser Tyr Ser Glu
 965 970 975
 Gln Leu Gly Ala Lys Ser Gly Pro Asn Gly His Pro Tyr Asn Arg Thr
 980 985 990
 Asn Arg Ser Arg Met Pro Asn Leu Asn Asp Leu Lys Glu Thr Ala Leu
 995 1000 1005
 Ser Arg Gly Ser Arg Ala Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr
 1010 1015 1020
 Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1025 1030 1035

<210> 15

<211> 2877

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADNc de CDKL5 (107)

<400> 15

ES 2 885 245 T3

aagattccta acattggtaa tgtgatgaat aaatttgaga tccttgggggt tgtaggtgaa	60
ggagcctatg gagttgtact taaatgcaga cacaaggaaa cacatgaaat tgtggcgatc	120
aagaaattca aggacagtga agaaaatgaa gaagtcaaag aaacgacttt acgagagctt	180
aaaatgcttc ggactctcaa gcaggaaaac atttgggagt tgaaggaagc atttcgtcgg	240
aggggaaagt tgtacttggg gtttgagtat gttgaaaaa atatgctcga attgctggaa	300
gaaatgccaa atggagttcc acctgagaaa gtaaaaagct acatctatca gctaatacag	360
gctattcact ggtgccataa gaatgatatt gtccatcgag atataaaacc agaaaatctc	420
ttaatcagcc acaatgatgt cctaaaactg tgtgactttg gttttgctcg taatctgtca	480
gaaggcaata atgctaatta cacagagtac gttgccacca gatggtatcg gtccccagaa	540
ctcttacttg gcgctcccta tggaaagtcc gtggacatgt ggtcgggtggg ctgtattctt	600
ggggagctta gcgatggaca gcctttatct cctggagaaa gtgaaattga ccaacttttt	660
actattcaga agtgcttagg accacttcca tctgagcaga tgaagctttt ctacagtaat	720
cctcgcttcc atgggctccg gtttccagct gttaaccatc ctcagtcctt ggaaagaaga	780
taccttgga ttttgaatag tgttctactt gacctaatga agaatttact gaagttggac	840
ccagctgaca gatacttgac agaacagtgt ttgaatcacc ctacatttca aaccagaga	900
cttctggatc gttctccttc aaggctcagca aaaagaaaac cttaccatgt ggaaagcagc	960
acattgtcta atagaaacca agccggcaaa agtactgctt tgcagtctca ccacagatct	1020
aacagcaagg acatccagaa cctgagtgtg ggcctgcccc gggctgacga aggtctccct	1080
gccaatgaaa gcttcctaaa tggaaacctt gctggagcta gtcttagtcc actgcacacc	1140
aaaacctacc aagcaagcag ccagcctggg tctaccagca aagatctcac caacaacaac	1200
ataccacacc ttcttagccc aaaagaagcc aagtcaaaaa cagagtttga ttttaatat	1260
gacccaaagc cttcagaagg cccagggaca aagtacctca agtcaaacag cagatctcag	1320

ES 2 885 245 T3

cagaaccgcc	actcattcat	ggaaagctct	caaagcaaag	ctgggacact	gcagcccaat	1380
gaaaagcaga	gtcggcatag	ctatatgtac	acaattcccc	agtcctctag	gagtcctctc	1440
tacaggacca	aggccaaaag	ccatggggca	ctgagtgact	ccaagtctgt	gagcaacctt	1500
tctgaagcca	gggcccgaat	tggggagccc	agtaccagta	ggtacttccc	atctagctgc	1560
ttagacttga	attctcccac	cagcccaacc	cccaccagac	acagtgcac	gagaactttg	1620
ctcagccctt	ctggaagaaa	taaccgaaat	gagggaaagg	tggactcacg	tcgaaccaca	1680
accagacatt	ctaagacgat	ggaggaattg	aagctgcccg	agcacatgga	cagtagccat	1740
tcccattcac	tgtctgcacc	tcacgaatct	ttttcttatg	gactgggcta	caccagcccc	1800
ttttcttccc	agcaacgtcc	tcataggcat	tctatgtatg	tgacccgtga	caaagtgaga	1860
gccaagggct	tggatggaag	cttgagcata	gggcaaggga	tggcagctag	agccaacagc	1920
ctgcaactct	tgtcacccca	gcctggagaa	cagctccctc	cagagatgac	tgtggcaaga	1980
tcttcggtca	aagagacctc	cagagaaggc	acctcttctt	tccatacacg	ccagaagtct	2040
gaggggtggg	tgtatcatga	cccacactct	gatgatggca	cagcccccaa	agaaaataga	2100
cacctataca	atgatcctgt	gccaaaggaga	gttggttagct	tttacagagt	gccatctcca	2160
cgtccagaca	attctttcca	tgaaaataat	gtgtcaacta	gagtttcttc	tctaccatca	2220
gagagcagtt	ctggaaccaa	ccactcaaaa	agacaaccag	cattcgatcc	atggaaaagt	2280
cctgaaaata	ttagtcattc	agagcaactc	aaggaaaaag	agaagcaagg	atttttcagg	2340
tcaatgaaaa	agaaaaagaa	gaaatctcaa	acagtaccca	attccgacag	cctgatcttt	2400
ctgacgttgc	agaaatccat	tcattctgct	agcactccaa	gcagcagacc	aaaggagtgg	2460
cgccccgaga	agatctcaga	tctgcagacc	caaagccagc	cattaaaatc	actgcgcaag	2520
ttgttacatc	tctcttcggc	ctcaaataac	ccggcttctt	cagatccccg	cttcagcccc	2580
ttaacagctc	aacaaaccaa	aaattccttc	tcagaaattc	ggattcaccc	cctgagccag	2640
gcctctggcg	ggagcagcaa	catccggcag	gaacccgcac	cgaagggcag	gccagccctc	2700
cagctgccag	gtcagatgga	tcctgggttg	catgtgtcct	ctgtgaccag	gagtgccaca	2760
gagggccctt	cctactctga	acagctgggt	gccaaaagtg	ggccaaatgg	gcacccctat	2820
aacagaacaa	atcgctcacg	aatgccaaat	ctgaatgatt	taaaagagac	agccttg	2877

<210> 16

<211> 959

<212> PRT

<213> Polipéptido de CDKL5 (107)

<400> 16

ES 2 885 245 T3

Lys Ile Pro Asn Ile Gly Asn Val Met Asn Lys Phe Glu Ile Leu Gly
 1 5 10 15
 Val Val Gly Glu Gly Ala Tyr Gly Val Val Leu Lys Cys Arg His Lys
 20 25 30
 Glu Thr His Glu Ile Val Ala Ile Lys Lys Phe Lys Asp Ser Glu Glu
 35 40 45
 Asn Glu Glu Val Lys Glu Thr Thr Leu Arg Glu Leu Lys Met Leu Arg
 50 55 60
 Thr Leu Lys Gln Glu Asn Ile Val Glu Leu Lys Glu Ala Phe Arg Arg
 65 70 75 80
 Arg Gly Lys Leu Tyr Leu Val Phe Glu Tyr Val Glu Lys Asn Met Leu
 85 90 95
 Glu Leu Leu Glu Glu Met Pro Asn Gly Val Pro Pro Glu Lys Val Lys
 100 105 110
 Ser Tyr Ile Tyr Gln Leu Ile Lys Ala Ile His Trp Cys His Lys Asn
 115 120 125
 Asp Ile Val His Arg Asp Ile Lys Pro Glu Asn Leu Leu Ile Ser His
 130 135 140
 Asn Asp Val Leu Lys Leu Cys Asp Phe Gly Phe Ala Arg Asn Leu Ser
 145 150 155 160
 Glu Gly Asn Asn Ala Asn Tyr Thr Glu Tyr Val Ala Thr Arg Trp Tyr
 165 170 175
 Arg Ser Pro Glu Leu Leu Leu Gly Ala Pro Tyr Gly Lys Ser Val Asp
 180 185 190
 Met Trp Ser Val Gly Cys Ile Leu Gly Glu Leu Ser Asp Gly Gln Pro
 195 200 205
 Leu Phe Pro Gly Glu Ser Glu Ile Asp Gln Leu Phe Thr Ile Gln Lys
 210 215 220
 Val Leu Gly Pro Leu Pro Ser Glu Gln Met Lys Leu Phe Tyr Ser Asn
 225 230 235 240
 Pro Arg Phe His Gly Leu Arg Phe Pro Ala Val Asn His Pro Gln Ser
 245 250 255
 Leu Glu Arg Arg Tyr Leu Gly Ile Leu Asn Ser Val Leu Leu Asp Leu

ES 2 885 245 T3

	260		265		270										
Met	Lys	Asn	Leu	Leu	Lys	Leu	Asp	Pro	Ala	Asp	Arg	Tyr	Leu	Thr	Glu
	275						280					285			
Gln	Cys	Leu	Asn	His	Pro	Thr	Phe	Gln	Thr	Gln	Arg	Leu	Leu	Asp	Arg
	290					295					300				
Ser	Pro	Ser	Arg	Ser	Ala	Lys	Arg	Lys	Pro	Tyr	His	Val	Glu	Ser	Ser
305					310					315					320
Thr	Leu	Ser	Asn	Arg	Asn	Gln	Ala	Gly	Lys	Ser	Thr	Ala	Leu	Gln	Ser
			325						330					335	
His	His	Arg	Ser	Asn	Ser	Lys	Asp	Ile	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Gly	Leu
			340					345					350		
Pro	Arg	Ala	Asp	Glu	Gly	Leu	Pro	Ala	Asn	Glu	Ser	Phe	Leu	Asn	Gly
		355					360					365			
Asn	Leu	Ala	Gly	Ala	Ser	Leu	Ser	Pro	Leu	His	Thr	Lys	Thr	Tyr	Gln
	370					375					380				
Ala	Ser	Ser	Gln	Pro	Gly	Ser	Thr	Ser	Lys	Asp	Leu	Thr	Asn	Asn	Asn
385					390					395					400
Ile	Pro	His	Leu	Leu	Ser	Pro	Lys	Glu	Ala	Lys	Ser	Lys	Thr	Glu	Phe
			405						410					415	
Asp	Phe	Asn	Ile	Asp	Pro	Lys	Pro	Ser	Glu	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Tyr
			420					425					430		
Leu	Lys	Ser	Asn	Ser	Arg	Ser	Gln	Gln	Asn	Arg	His	Ser	Phe	Met	Glu
	435						440					445			
Ser	Ser	Gln	Ser	Lys	Ala	Gly	Thr	Leu	Gln	Pro	Asn	Glu	Lys	Gln	Ser
	450					455					460				
Arg	His	Ser	Tyr	Ile	Asp	Thr	Ile	Pro	Gln	Ser	Ser	Arg	Ser	Pro	Ser
465					470					475					480
Tyr	Arg	Thr	Lys	Ala	Lys	Ser	His	Gly	Ala	Leu	Ser	Asp	Ser	Lys	Ser
			485						490					495	
Val	Ser	Asn	Leu	Ser	Glu	Ala	Arg	Ala	Gln	Ile	Ala	Glu	Pro	Ser	Thr
		500						505					510		

ES 2 885 245 T3

Ser Arg Tyr Phe Pro Ser Ser Cys Leu Asp Leu Asn Ser Pro Thr Ser
 515 520 525
 Pro Thr Pro Thr Arg His Ser Asp Thr Arg Thr Leu Leu Ser Pro Ser
 530 535 540
 Gly Arg Asn Asn Arg Asn Glu Gly Thr Leu Asp Ser Arg Arg Thr Thr
 545 550 555 560
 Thr Arg His Ser Lys Thr Met Glu Glu Leu Lys Leu Pro Glu His Met
 565 570 575
 Asp Ser Ser His Ser His Ser Leu Ser Ala Pro His Glu Ser Phe Ser
 580 585 590
 Tyr Gly Leu Gly Tyr Thr Ser Pro Phe Ser Ser Gln Gln Arg Pro His
 595 600 605
 Arg His Ser Met Tyr Val Thr Arg Asp Lys Val Arg Ala Lys Gly Leu
 610 615 620
 Asp Gly Ser Leu Ser Ile Gly Gln Gly Met Ala Ala Arg Ala Asn Ser
 625 630 635 640
 Leu Gln Leu Leu Ser Pro Gln Pro Gly Glu Gln Leu Pro Pro Glu Met
 645 650 655
 Thr Val Ala Arg Ser Ser Val Lys Glu Thr Ser Arg Glu Gly Thr Ser
 660 665 670
 Ser Phe His Thr Arg Gln Lys Ser Glu Gly Gly Val Tyr His Asp Pro
 675 680 685
 His Ser Asp Asp Gly Thr Ala Pro Lys Glu Asn Arg His Leu Tyr Asn
 690 695 700
 Asp Pro Val Pro Arg Arg Val Gly Ser Phe Tyr Arg Val Pro Ser Pro
 705 710 715 720
 Arg Pro Asp Asn Ser Phe His Glu Asn Asn Val Ser Thr Arg Val Ser
 725 730 735
 Ser Leu Pro Ser Glu Ser Ser Ser Gly Thr Asn His Ser Lys Arg Gln
 740 745 750
 Pro Ala Phe Asp Pro Trp Lys Ser Pro Glu Asn Ile Ser His Ser Glu
 755 760 765

ES 2 885 245 T3

Gln Leu Lys Glu Lys Glu Lys Gln Gly Phe Phe Arg Ser Met Lys Lys
 770 775 780
 Lys Lys Lys Lys Ser Gln Thr Val Pro Asn Ser Asp Ser Pro Asp Leu
 785 790 795 800
 Leu Thr Leu Gln Lys Ser Ile His Ser Ala Ser Thr Pro Ser Ser Arg
 805 810 815
 Pro Lys Glu Trp Arg Pro Glu Lys Ile Ser Asp Leu Gln Thr Gln Ser
 820 825 830
 Gln Pro Leu Lys Ser Leu Arg Lys Leu Leu His Leu Ser Ser Ala Ser
 835 840 845
 Asn His Pro Ala Ser Ser Asp Pro Arg Phe Gln Pro Leu Thr Ala Gln
 850 855 860
 Gln Thr Lys Asn Ser Phe Ser Glu Ile Arg Ile His Pro Leu Ser Gln
 865 870 875 880
 Ala Ser Gly Gly Ser Ser Asn Ile Arg Gln Glu Pro Ala Pro Lys Gly
 885 890 895
 Arg Pro Ala Leu Gln Leu Pro Gly Gln Met Asp Pro Gly Trp His Val
 900 905 910
 Ser Ser Val Thr Arg Ser Ala Thr Glu Gly Pro Ser Tyr Ser Glu Gln
 915 920 925
 Leu Gly Ala Lys Ser Gly Pro Asn Gly His Pro Tyr Asn Arg Thr Asn
 930 935 940
 Arg Ser Arg Met Pro Asn Leu Asn Asp Leu Lys Glu Thr Ala Leu
 945 950 955

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico recombinante que comprende:

una secuencia de ácido nucleico de CDKL5, en donde la secuencia de ácido nucleico de CDKL5 codifica una secuencia polipeptídica de CDKL5, en donde la secuencia polipeptídica de CDKL5 comprende la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 16; y

una secuencia de ácido nucleico de TATk, en donde la secuencia de ácido nucleico de TATk codifica una secuencia polipeptídica de TATk, en donde la secuencia polipeptídica de TATk tiene de 90 % a 100 % de identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 4 y en donde la secuencia de ácido nucleico de TATk está acoplada funcionalmente a la secuencia de ácido nucleico de CDKL5 y/o la secuencia polipeptídica de TATk está acoplada funcionalmente a la secuencia polipeptídica de CDKL5.

2. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico de CDKL5 tiene de 90 % a 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 15.

3. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1 o 2, en donde la secuencia de ácido nucleico de TAT_k tiene de 90 % a 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3.

4. El ácido nucleico recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el ácido nucleico recombinante comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una etiqueta proteica, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la etiqueta proteica está acoplada funcionalmente a la secuencia de ácido nucleico de CDKL5.

5. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 4, en donde la etiqueta proteica se selecciona del grupo que consiste en proteína de unión a quitina (CBP), proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión-S-transferasa (GST), poli(His), tiorredoxina (TRX), poli(NANP), etiqueta FLAG, etiqueta V5, etiqueta Myc, etiqueta HA, etiqueta S, etiqueta SBP, Sftag 1, Softag 3, etiqueta Tc, etiqueta Xpress, etiqueta Strep, etiqueta Isopep, etiqueta Spy, etiqueta Ty, proteína portadora de biotina carboxilo (BCCP) y etiqueta Nus.

6. El ácido nucleico recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el ácido nucleico recombinante comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína indicadora, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína indicadora está acoplada funcionalmente con la secuencia de ácido nucleico de CDKL5.

7. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 6, en donde la proteína indicadora se selecciona del grupo que consiste en: una proteína fluorescente, beta-galactosidasa, una proteína luciferasa, una proteína de resistencia a antibióticos, p-glucuronidasa y fosfatasa alcalina.

8. Un vector que comprende el ácido nucleico recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

9. El vector de la reivindicación 8, en donde el vector es adecuado para la expresión en una célula bacteriana.

10. El vector de la reivindicación 8, en donde el vector es adecuado para la expresión en una célula de mamíferos.

11. Un método que comprende transfectar células con el ácido nucleico recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

12. El método de la reivindicación 11, en donde el ácido nucleico recombinante está contenido en un vector.

13. El método de la reivindicación 11 o 12, en donde las células comprenden células bacterianas o células de mamífero.

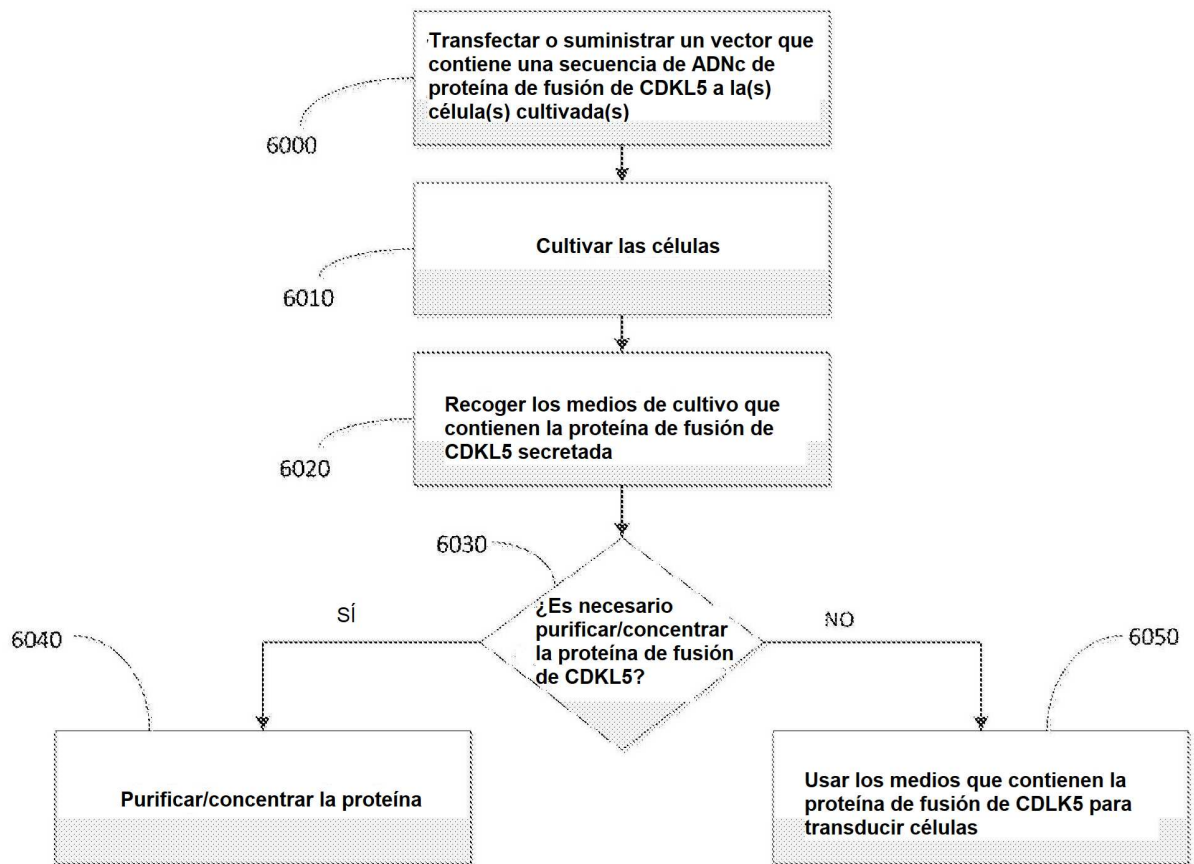


Fig. 1

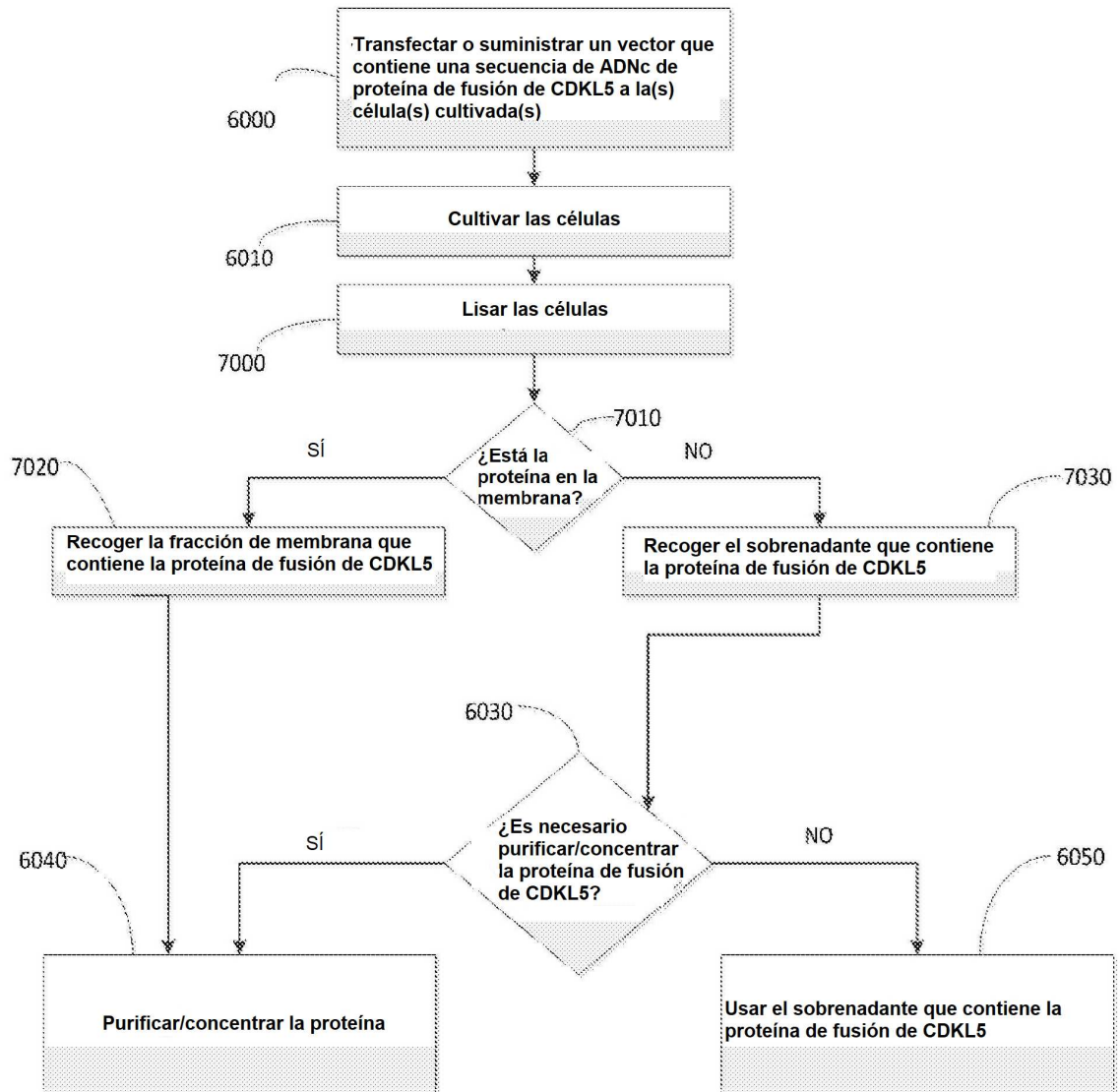


Fig. 2

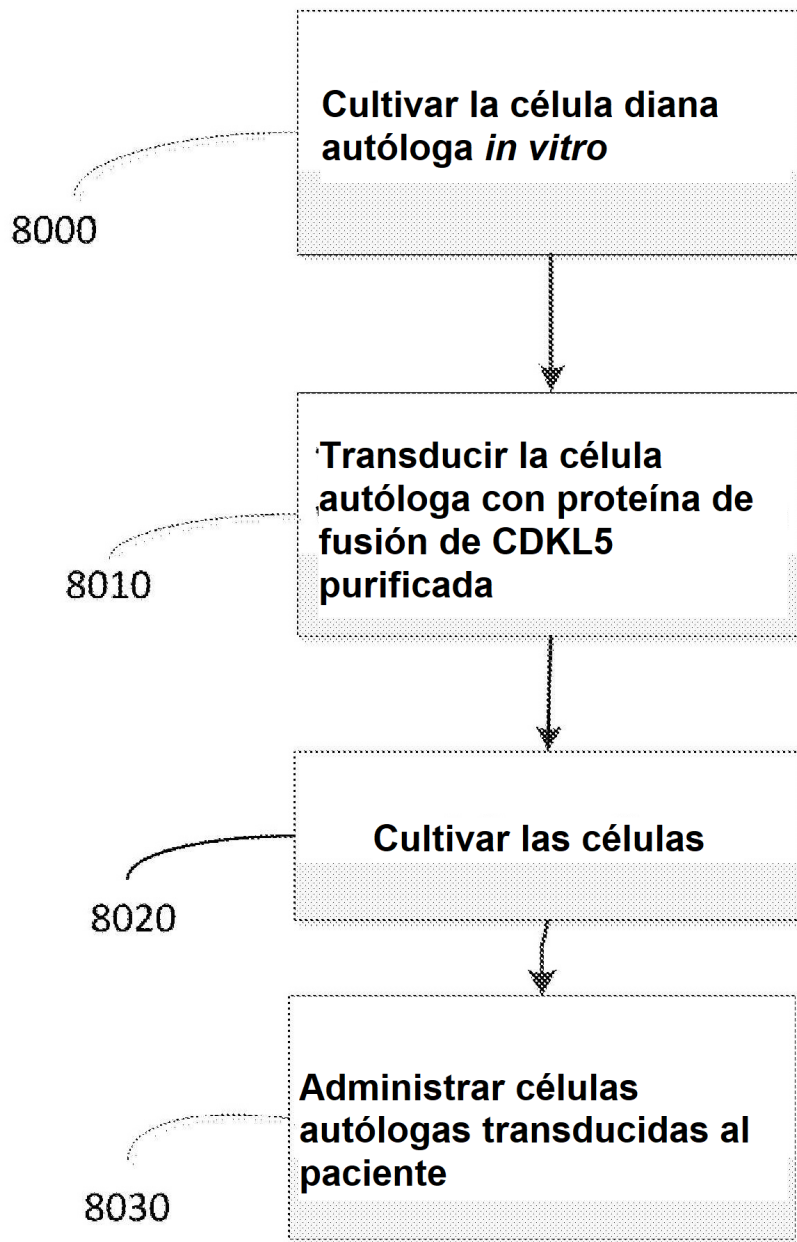


Fig. 3

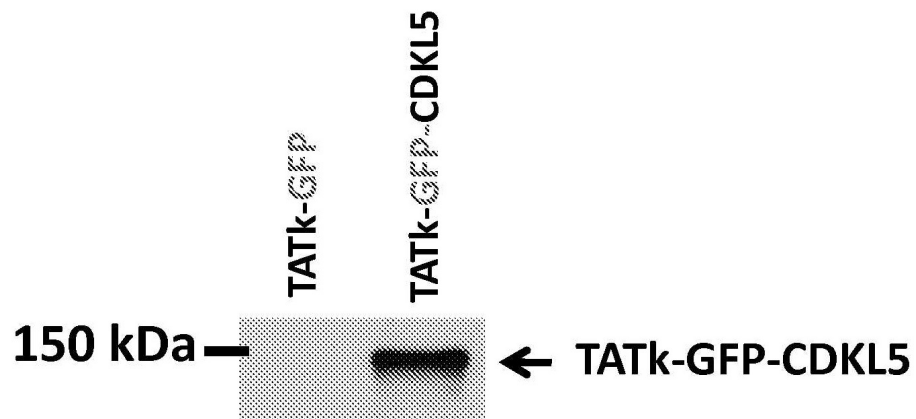


Fig. 4A

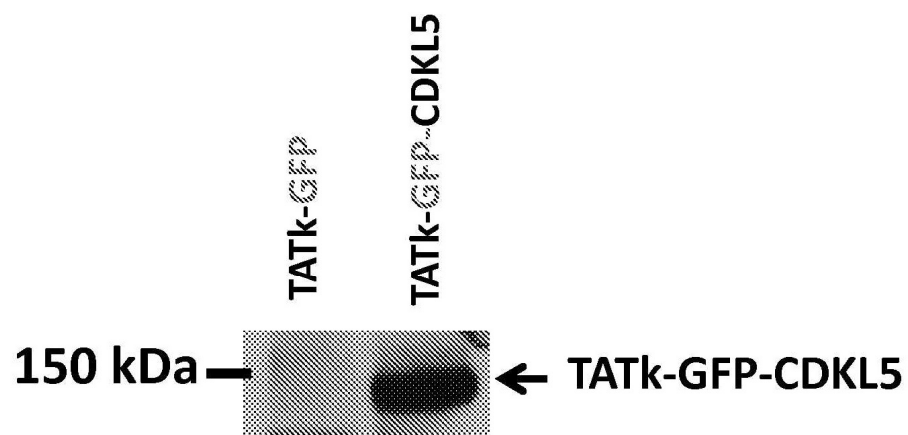


Fig. 4B

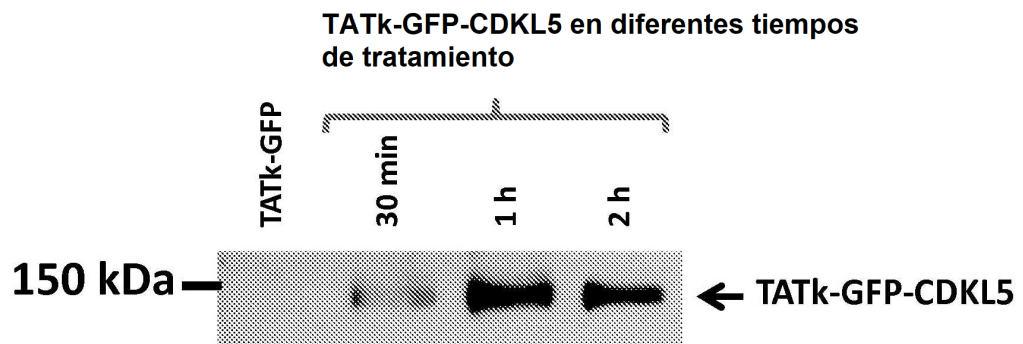
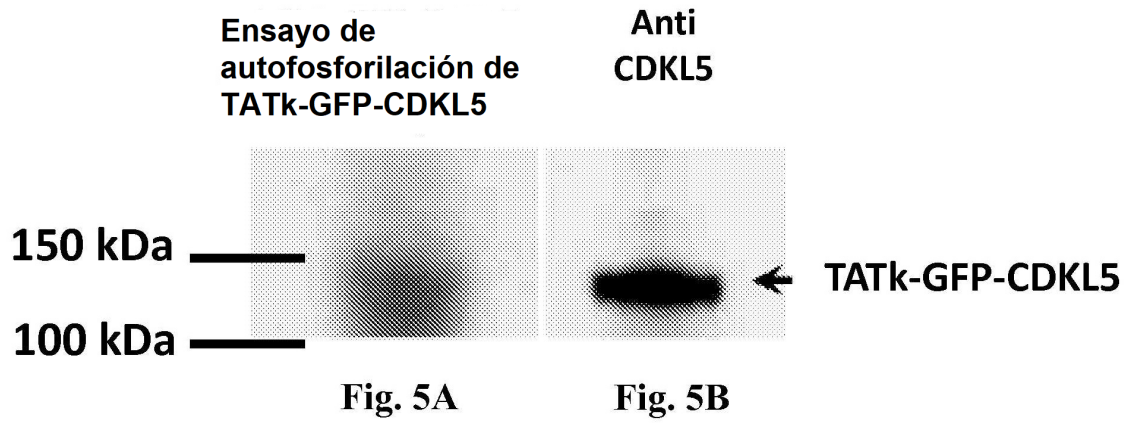


Fig. 6

293T no tratadas

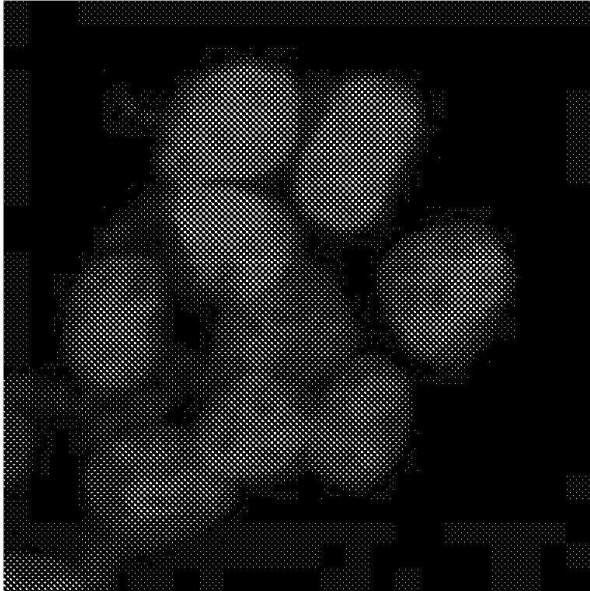


Fig. 7A

293T tratadas con
TATk-GFP-CDKL5

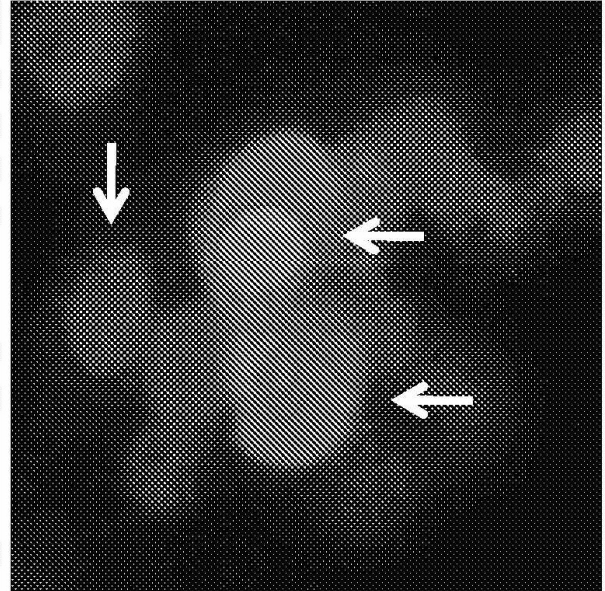


Fig. 7B

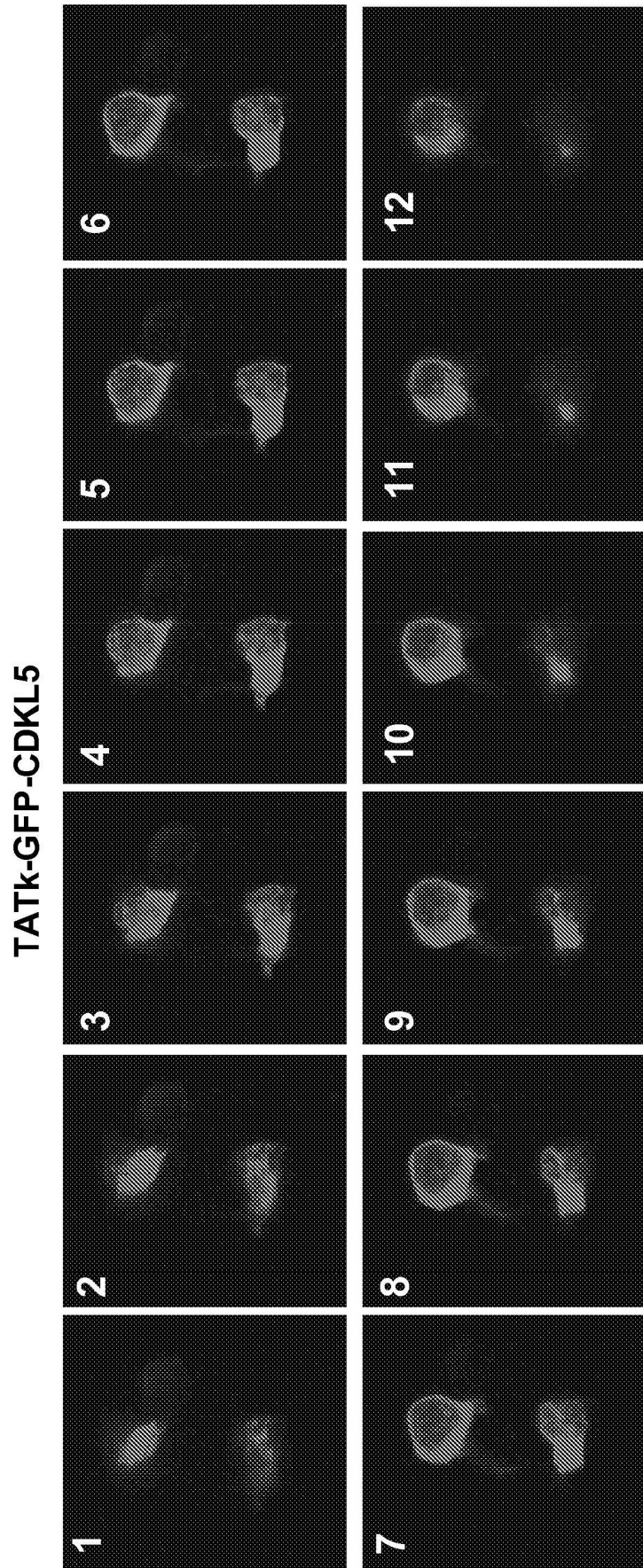


Fig. 8

SH-SY5Y tratadas
con TATk-GFP

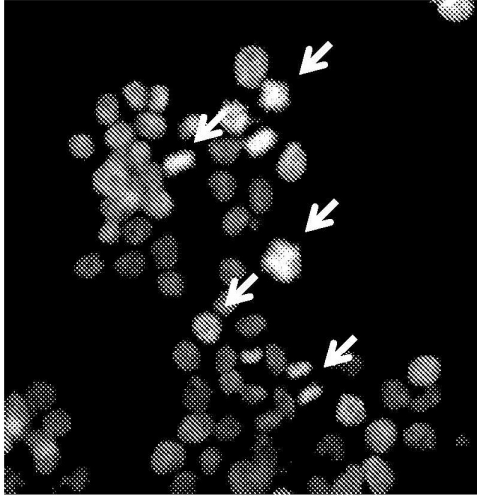


Fig. 9A

SH-SY5Y tratadas con
TATk-GFP-CDKL5

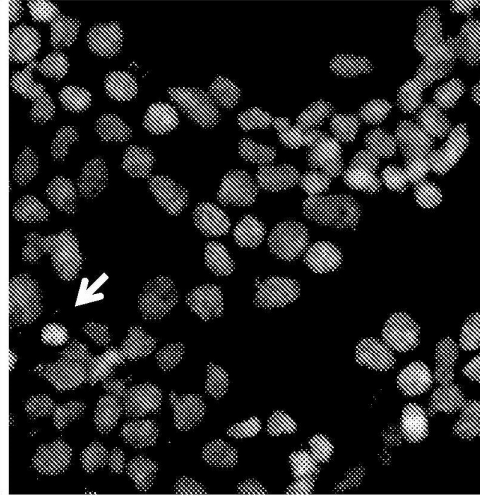


Fig. 9B

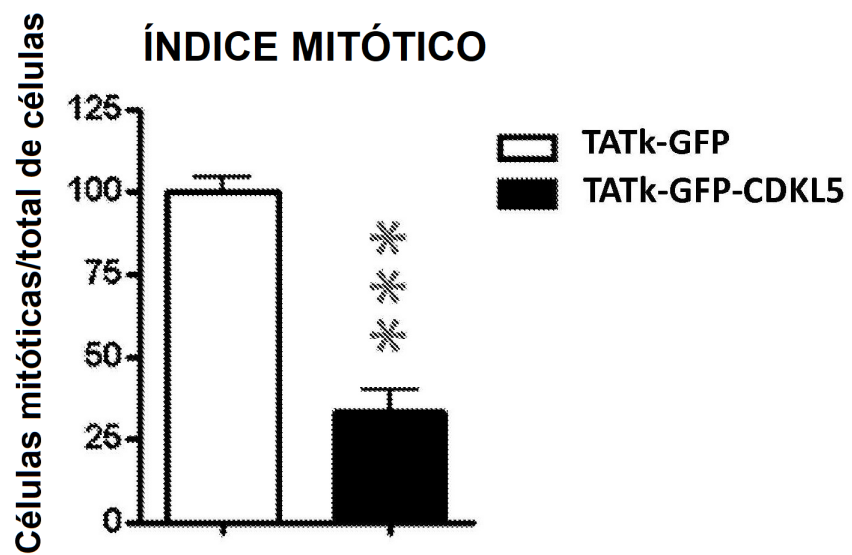


Fig. 10

SH-SY5Y tratadas
con TATk-GFP

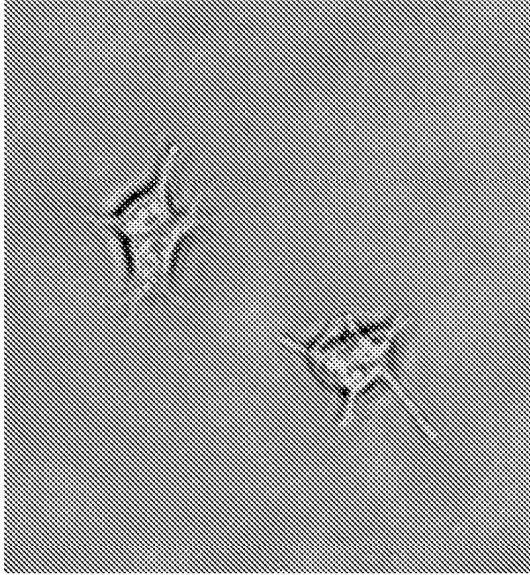


Fig. 11A

SH-SY5Y tratadas con
TATk-GFP-CDKL5

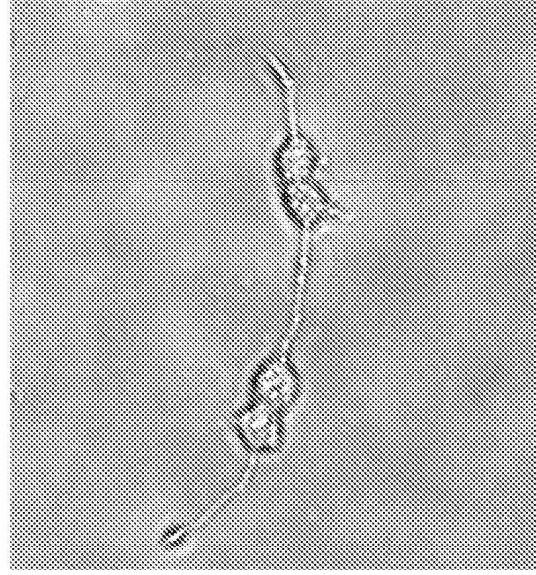


Fig. 11B

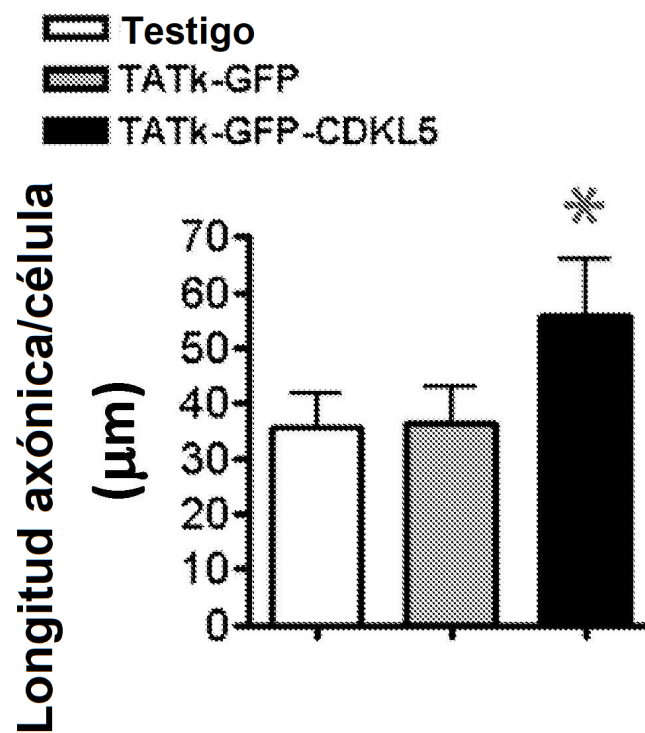


Fig. 12

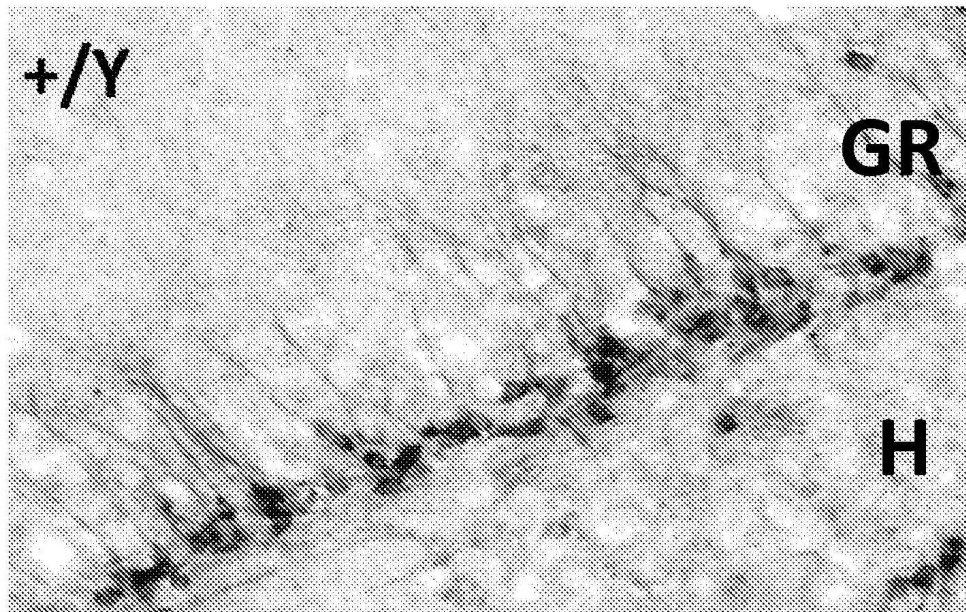


Fig. 13A

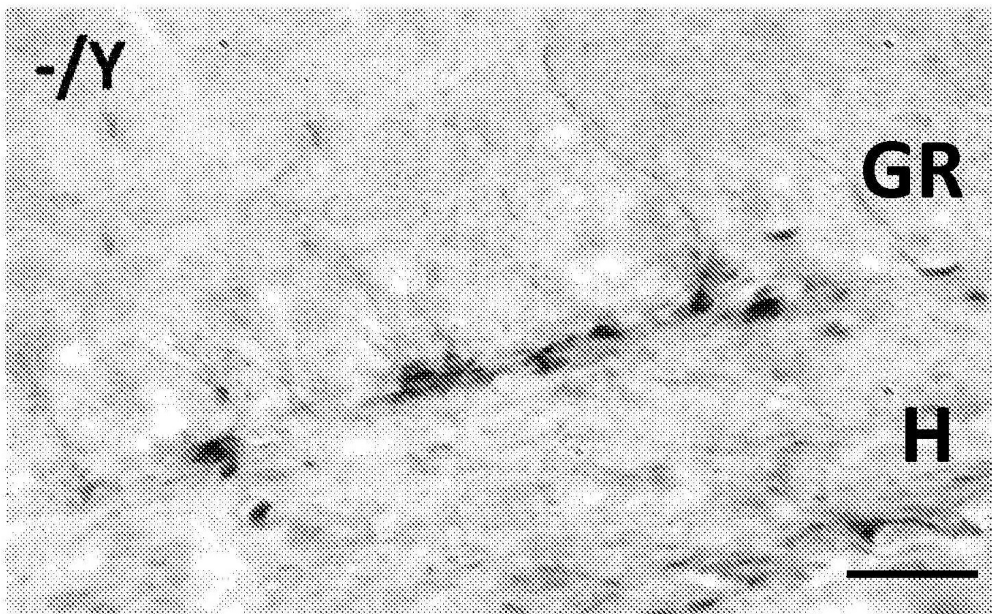


Fig. 13B

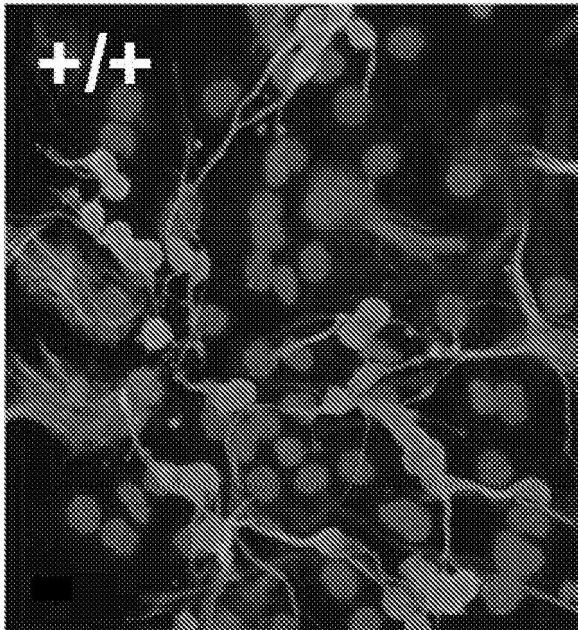


Fig. 14A

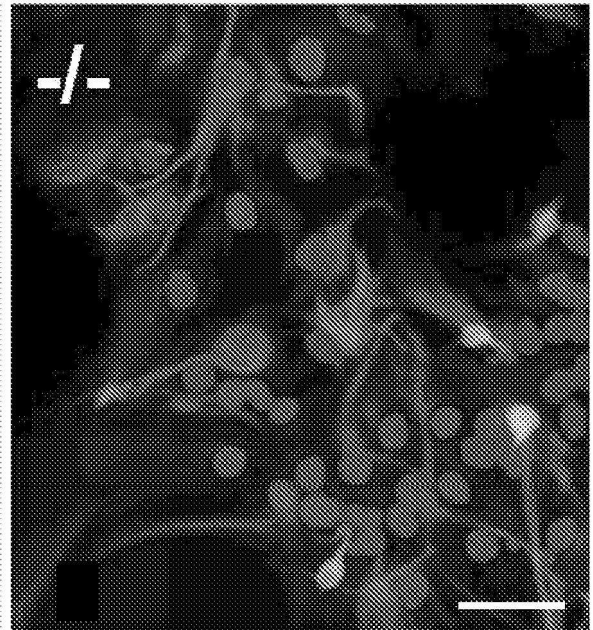


Fig. 14B

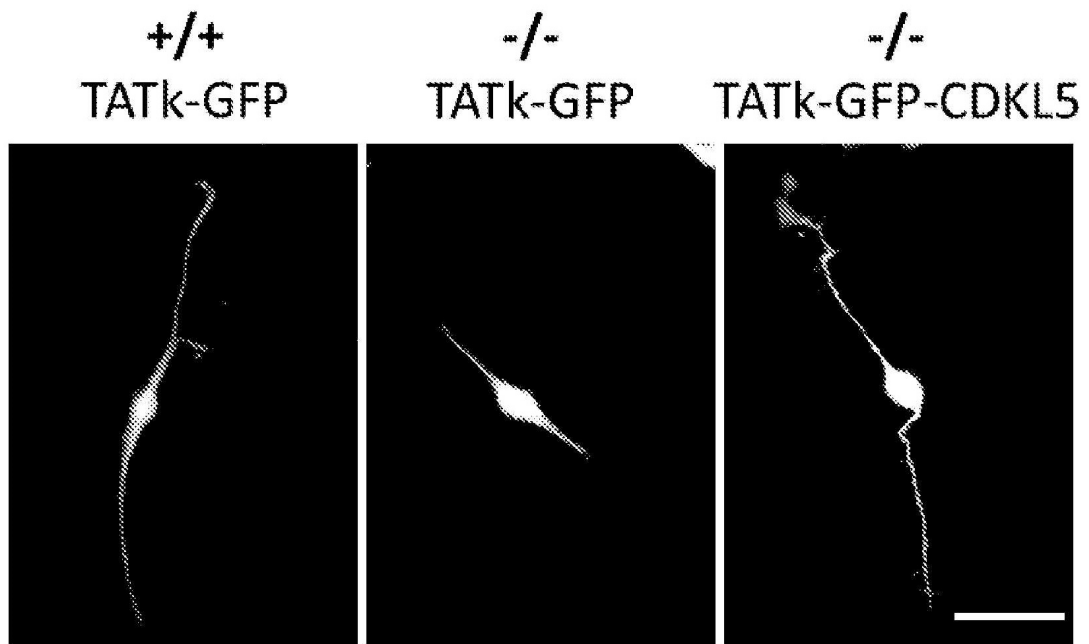


Fig. 15A

Fig. 15B

Fig. 15C

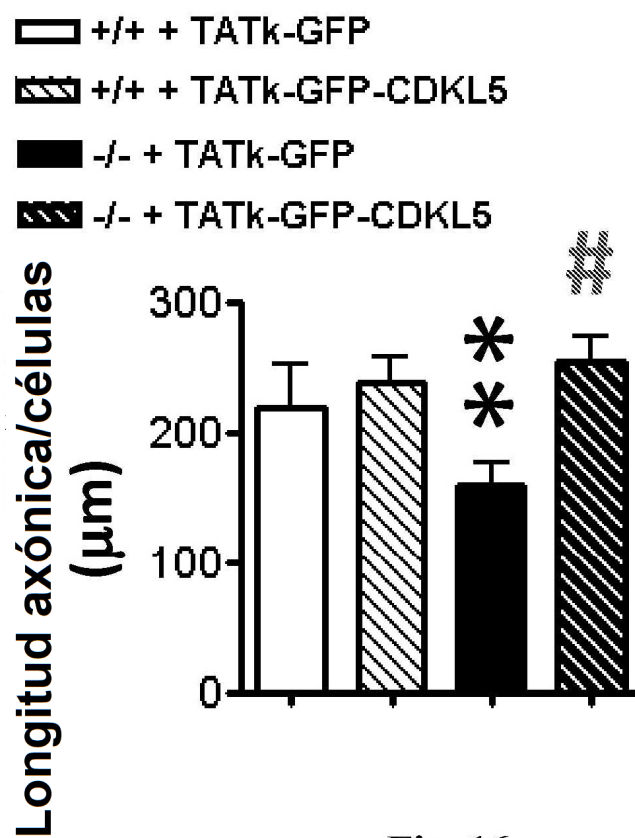


Fig. 16

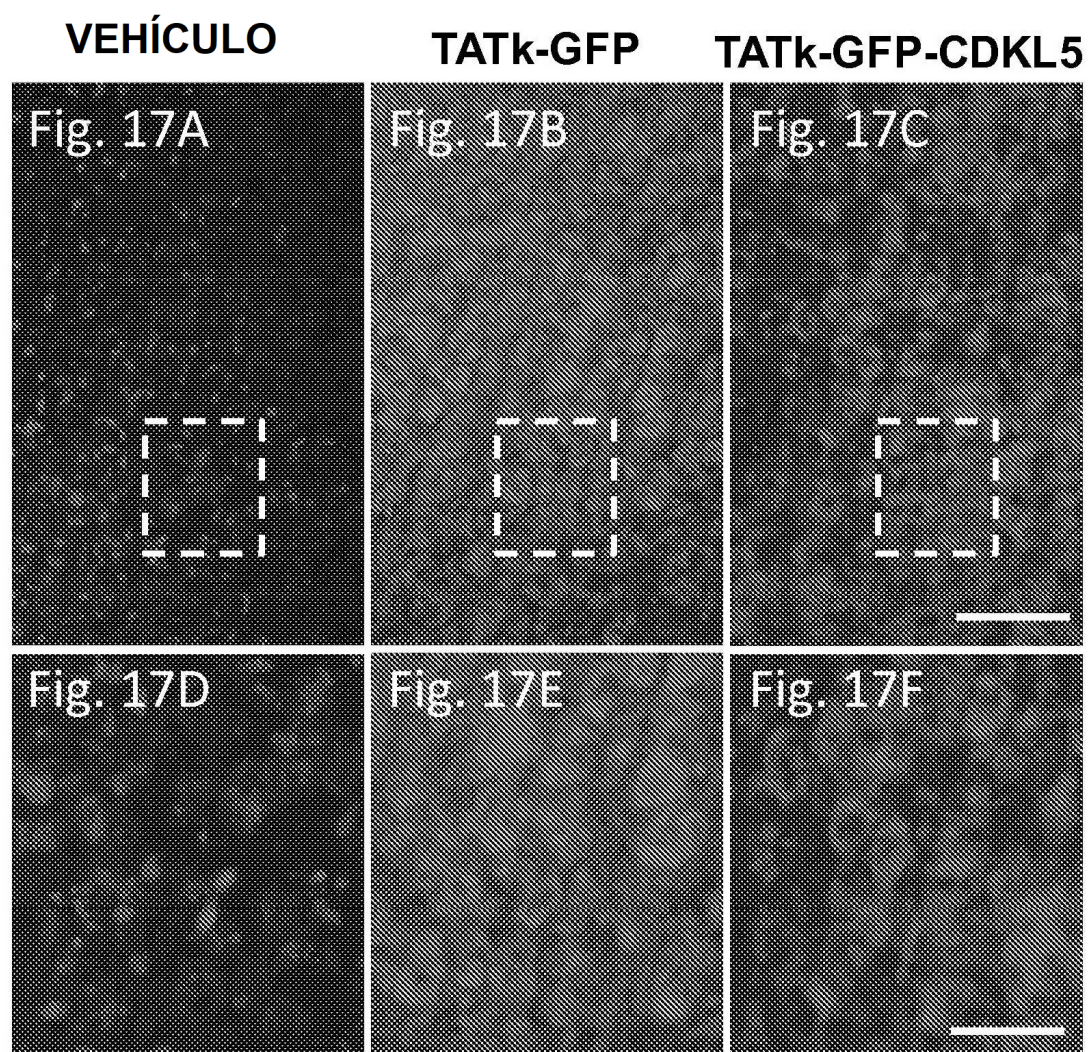


Fig. 17A-F

VEHÍCULO

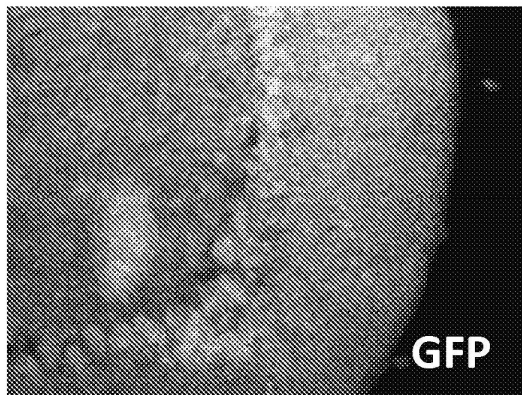


Fig. 18A

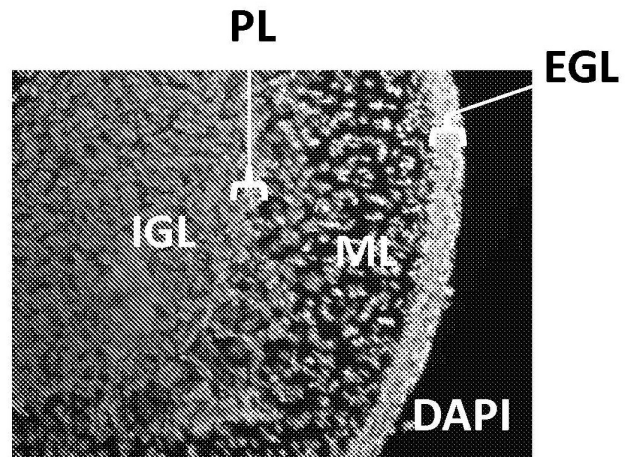


Fig. 18B

TATk-GFP-CDKL5

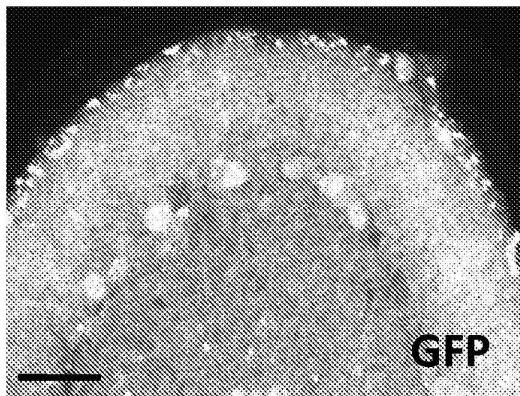


Fig. 18C

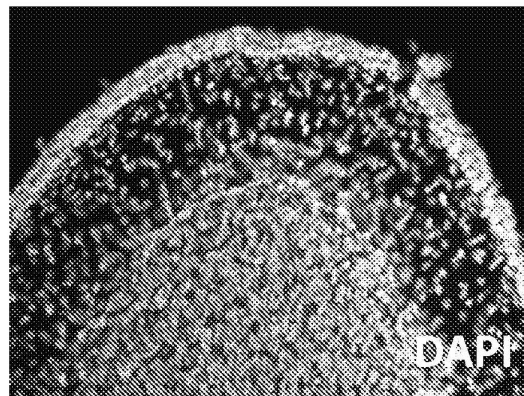


Fig. 18D

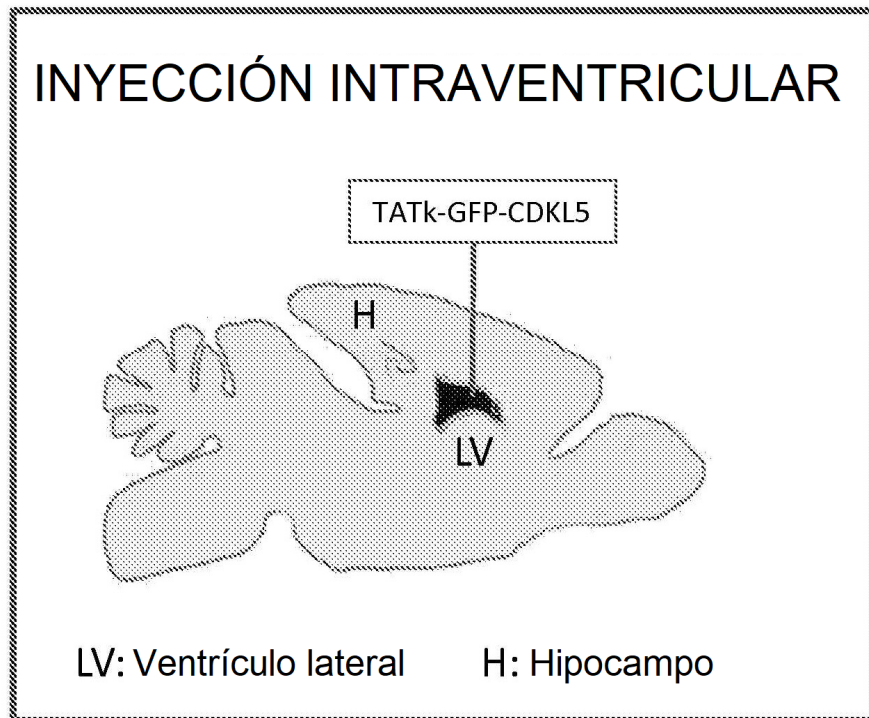


Fig. 19

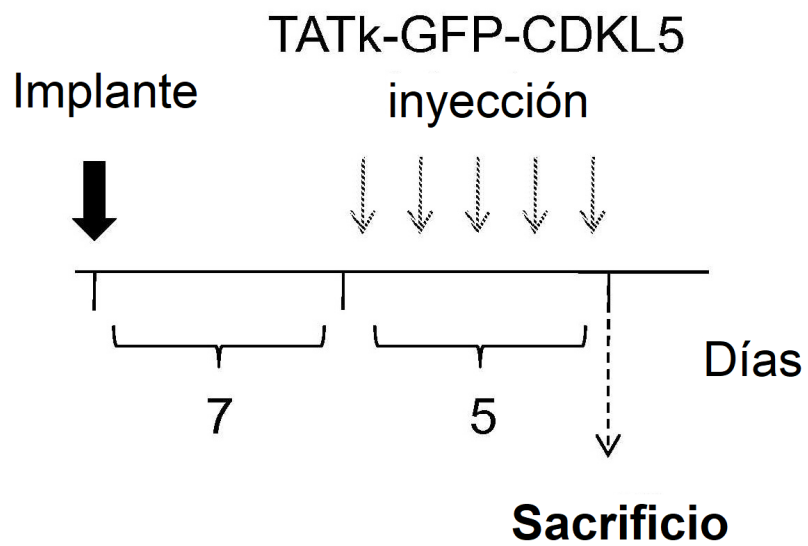


Fig. 20

+ /Y



Fig. 21A

- /Y

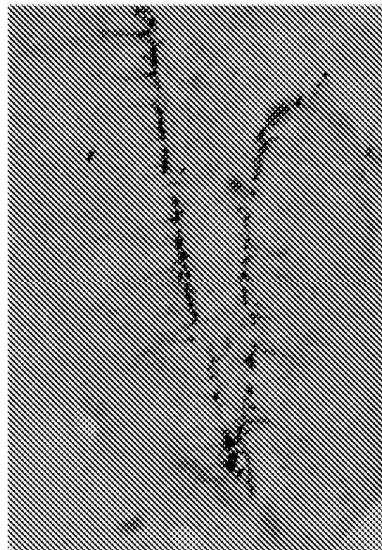


Fig. 21B

- /Y + TAT-CDKL5

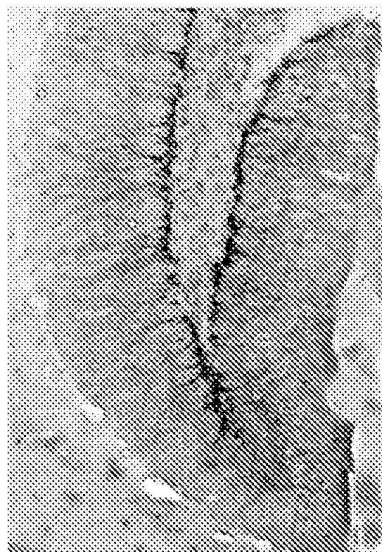


Fig. 21C

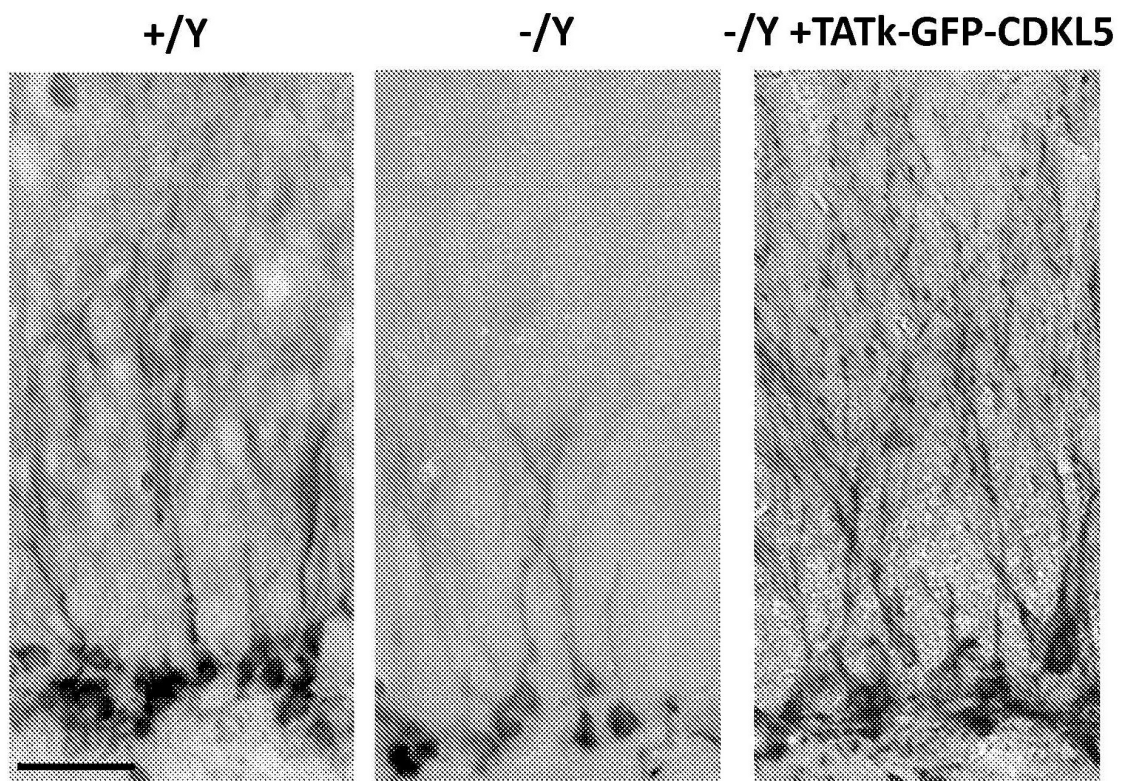


Fig. 22A

Fig. 22B

Fig. 22C

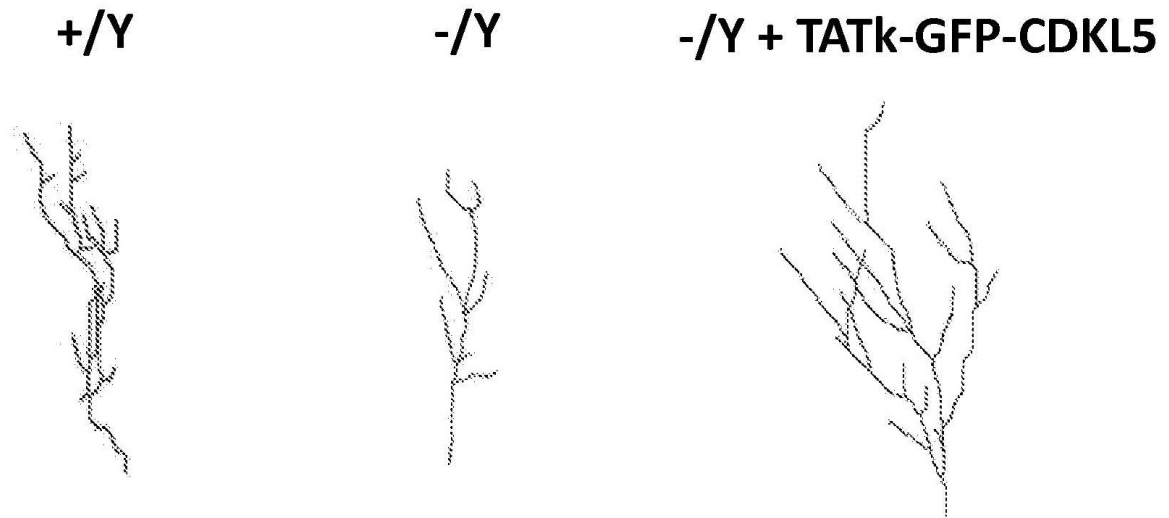


Fig. 23A

Fig. 23B

Fig. 23C

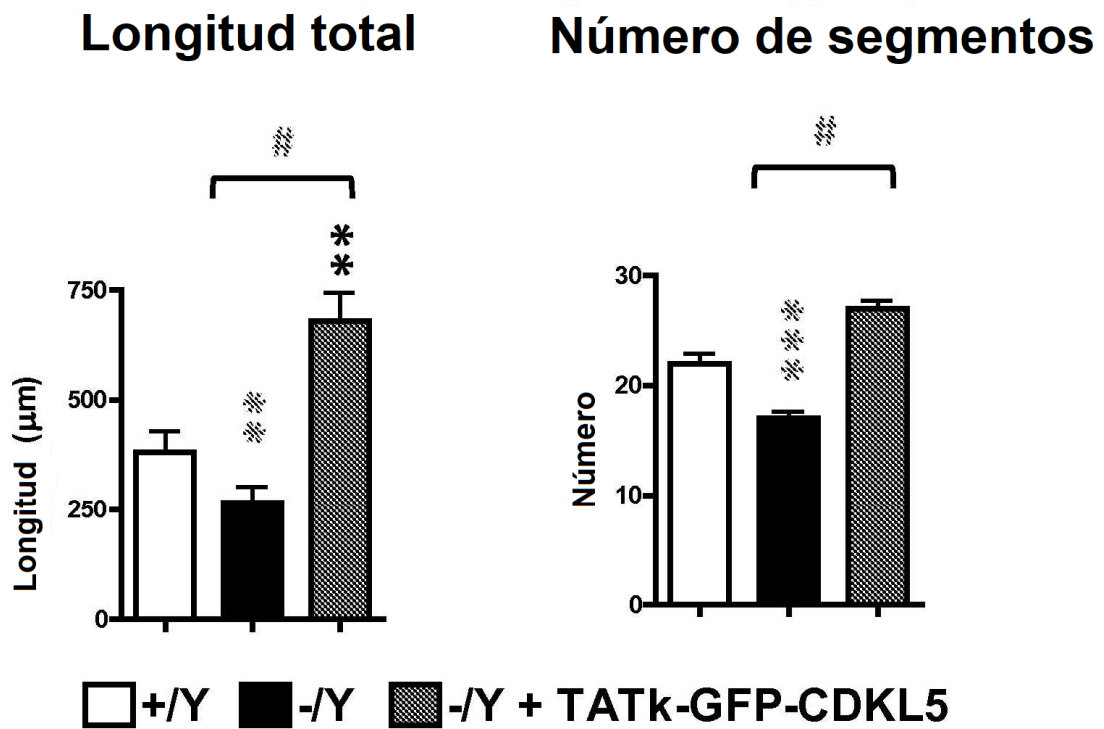


Fig. 24A

Fig. 24B

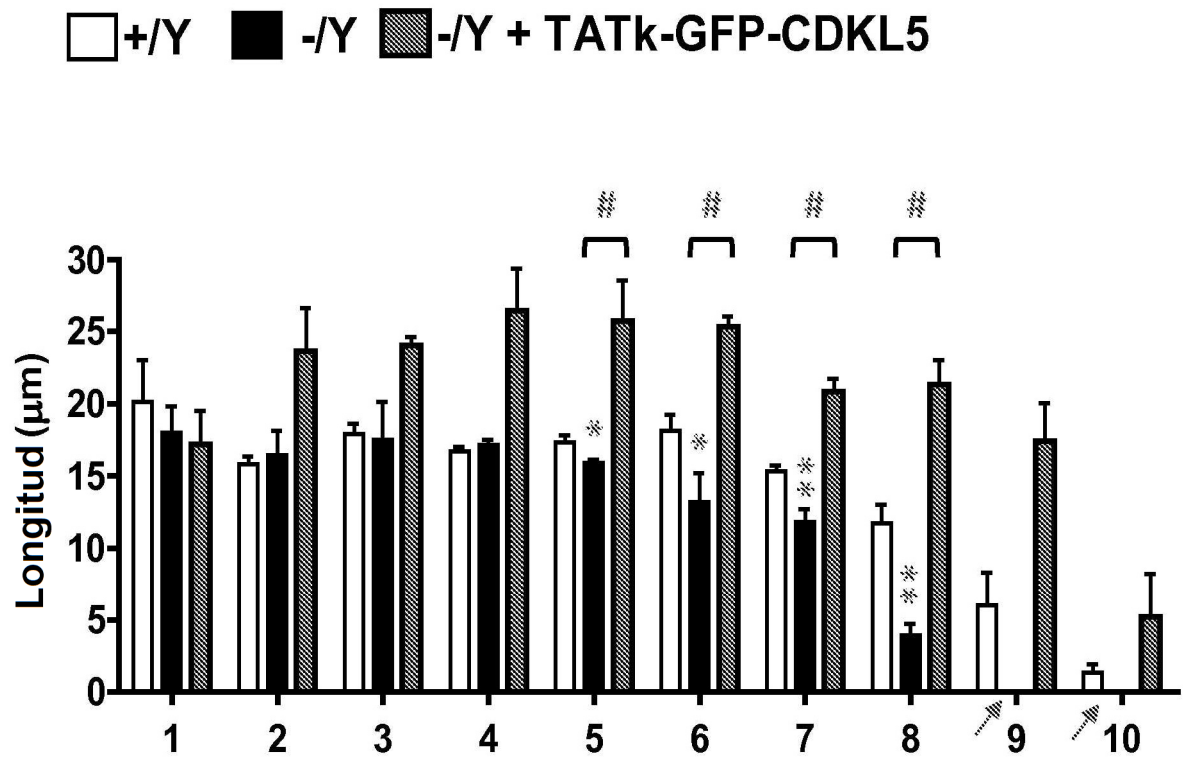


Fig. 25A

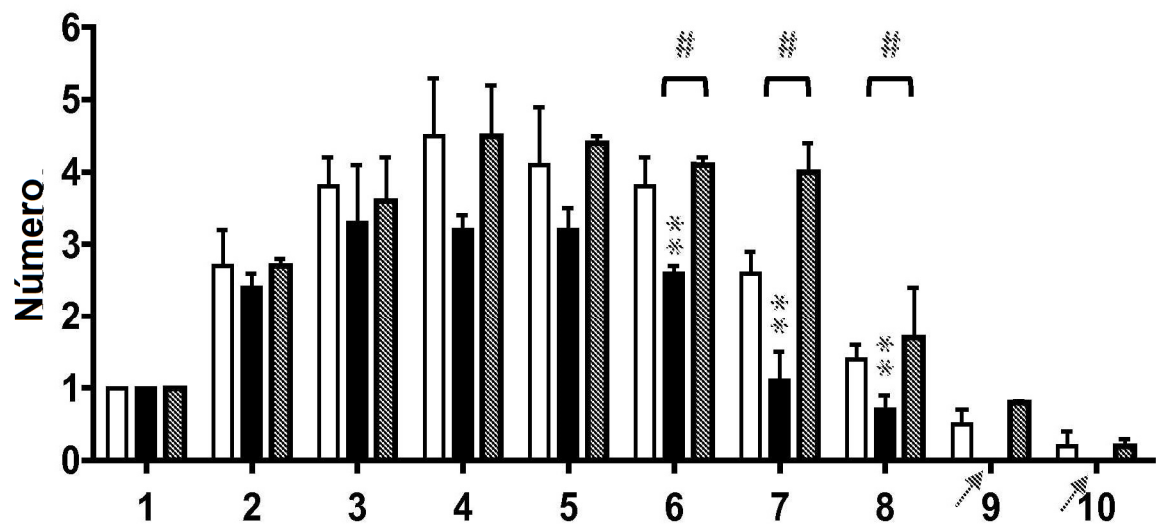


Fig. 25B

□ +/Y ■ -/Y ▨ -/Y + TATk-GFP-CDKL5

Células positivas para Caspasa 3 escindida

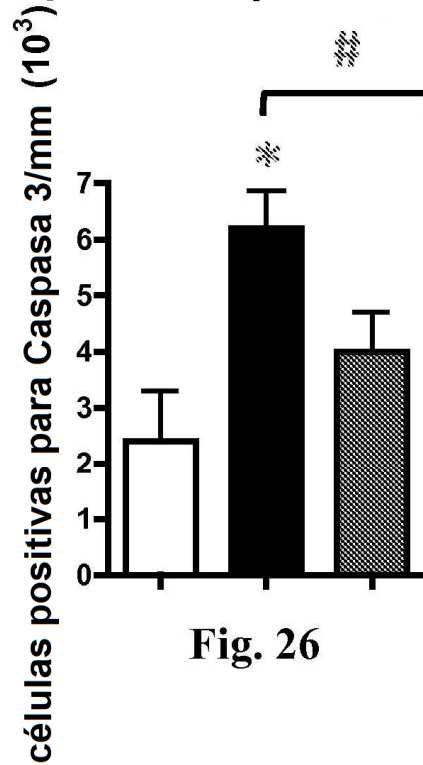


Fig. 26

Células positivas para DCX

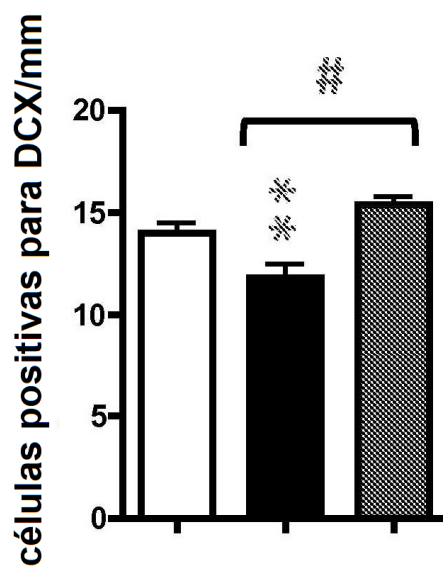


Fig. 27

SYN

+ / Y

- / Y

- / Y + TATk-GFP-CDKL5

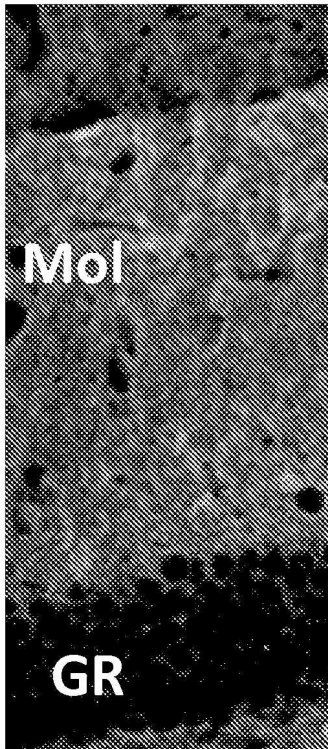


Fig. 28A

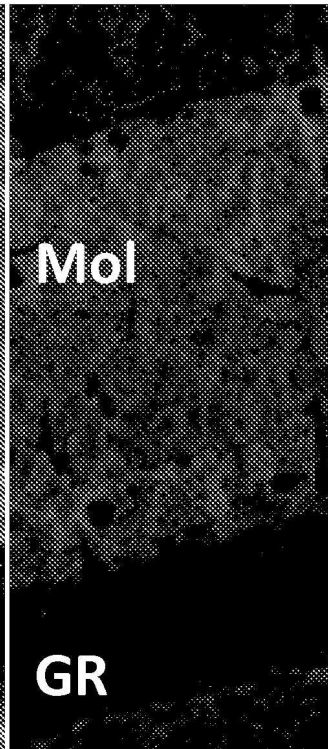


Fig. 28B

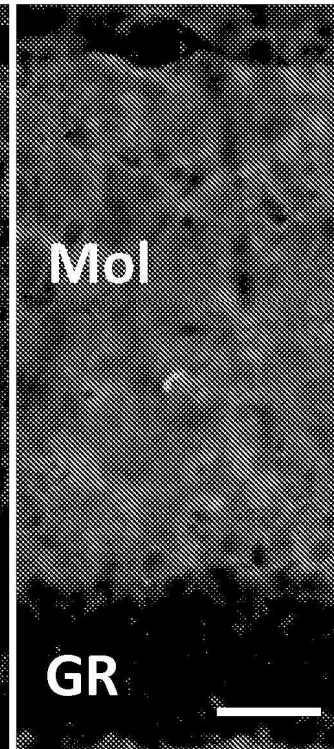


Fig. 28C

P-AKT

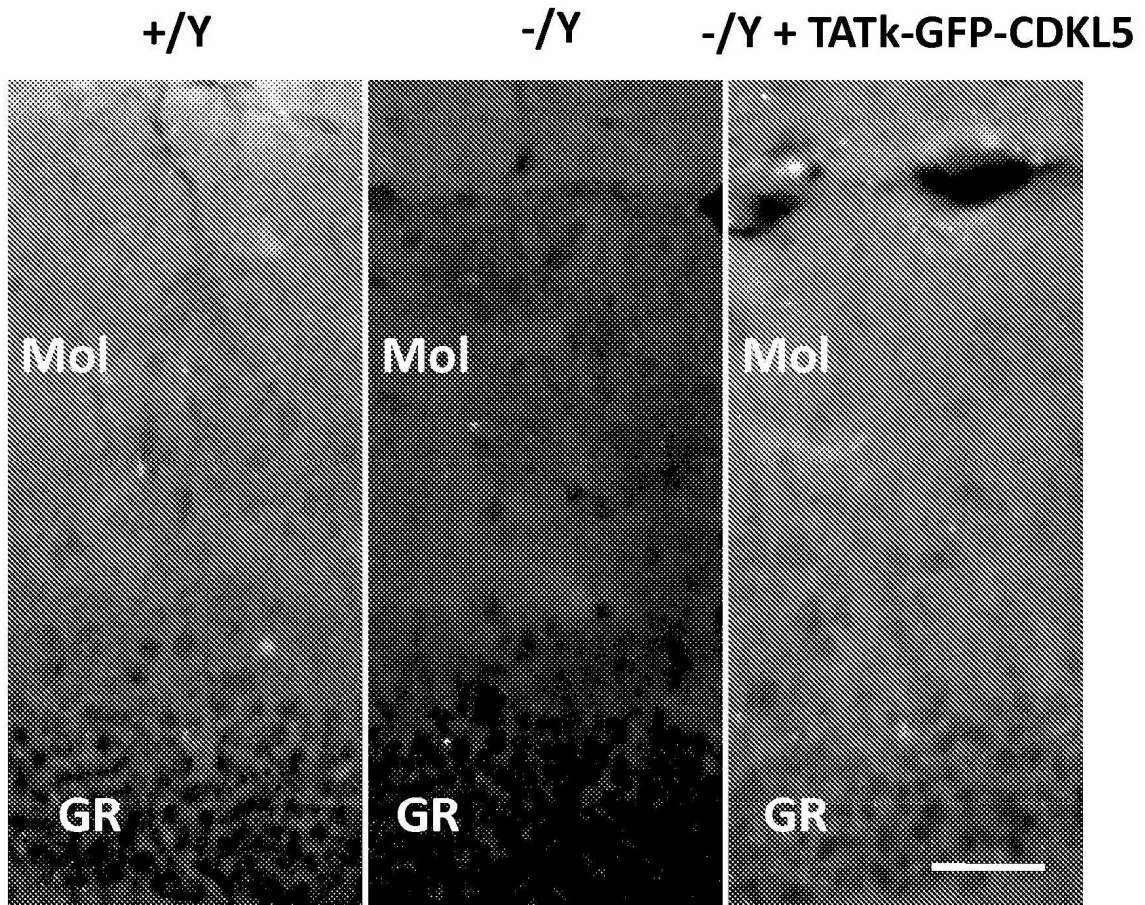


Fig. 29A

Fig. 29B

Fig. 29C

□ +/Y ■ -/Y ▨ -/Y + TATk-GFP-CDKL5

Hipocampo (capa molecular)

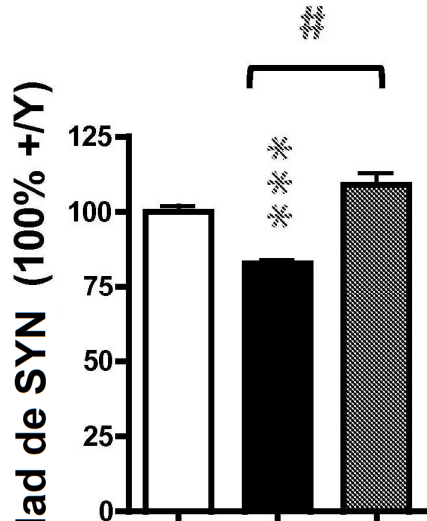


Fig. 30A

Corteza (capa III)

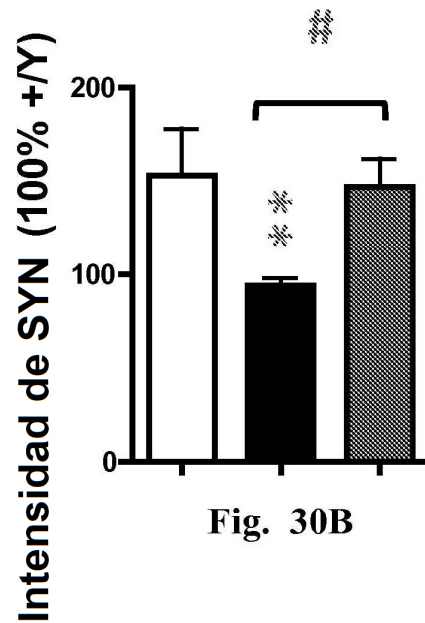


Fig. 30B

Hipocampo (capa molecular)

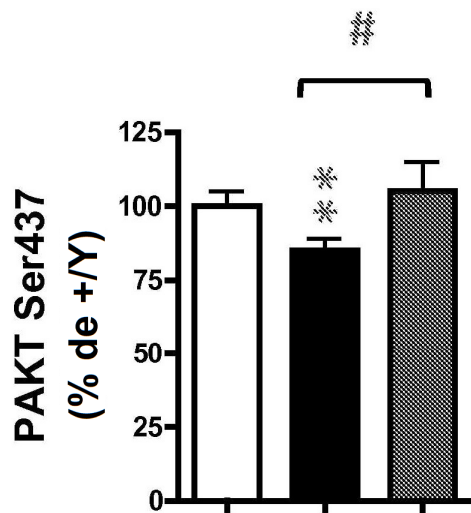


Fig. 31A

Corteza (capa V)

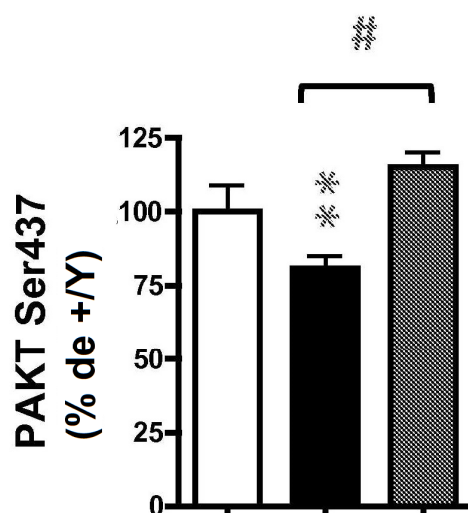


Fig. 31B

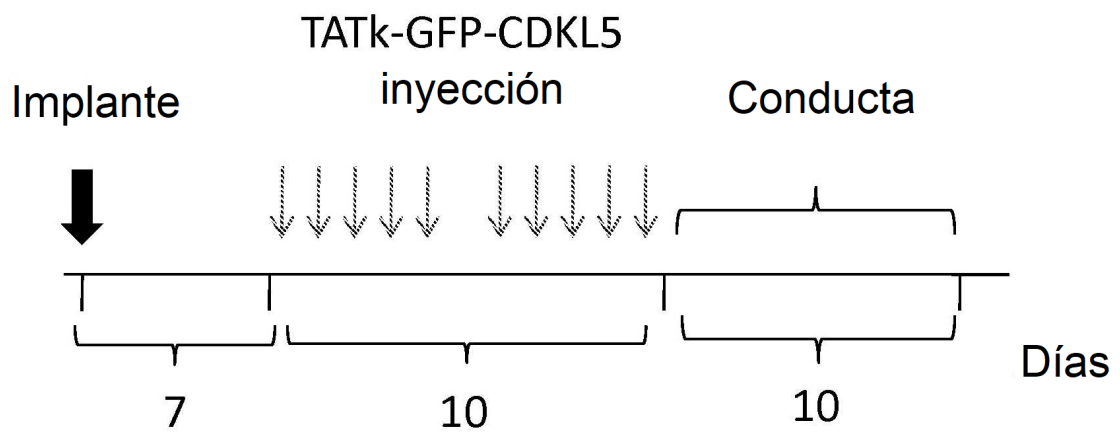


Fig. 32

Prueba de laberinto de agua de Morris

Fase de aprendizaje

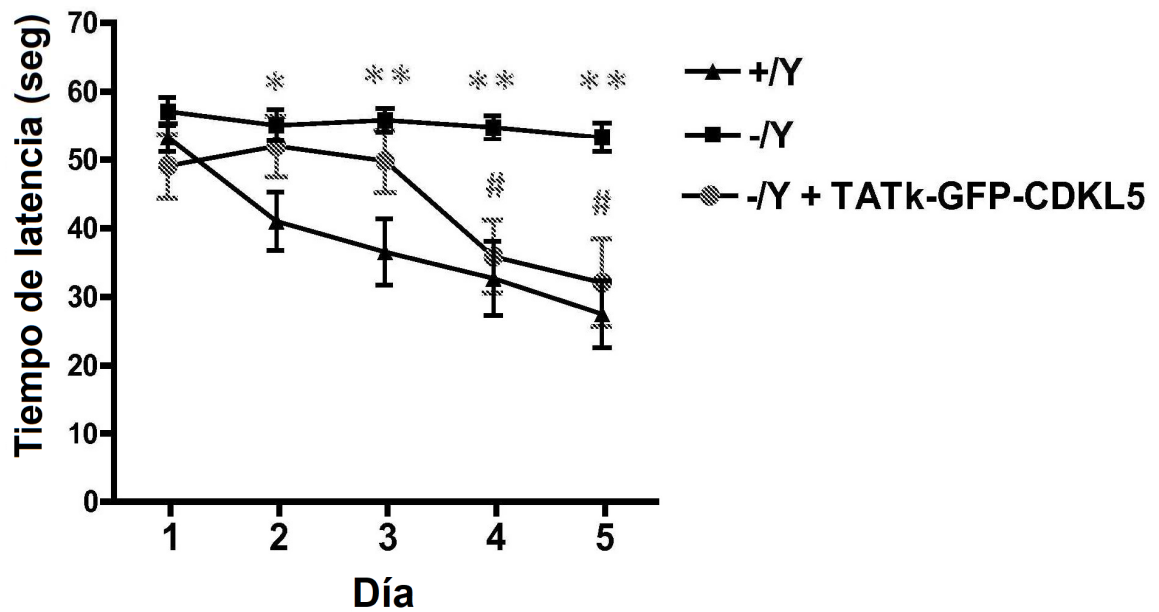


Fig. 33

Prueba de evitación pasiva

□ +/Y ■ -/Y ▨ -/Y + TATk-GFP-CDKL5

Primer día

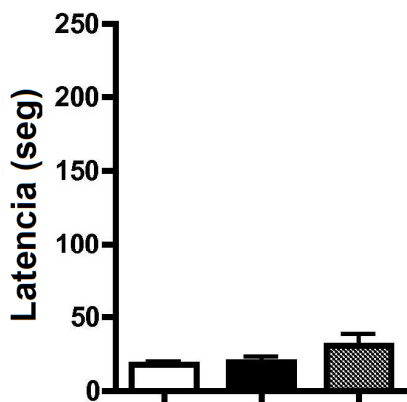


Fig. 34A

Segundo día

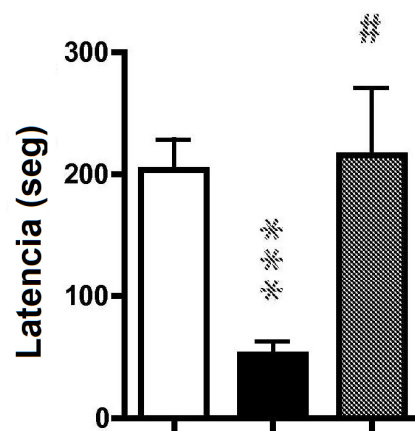


Fig. 34B

Prueba de agarre de extremidad posterior

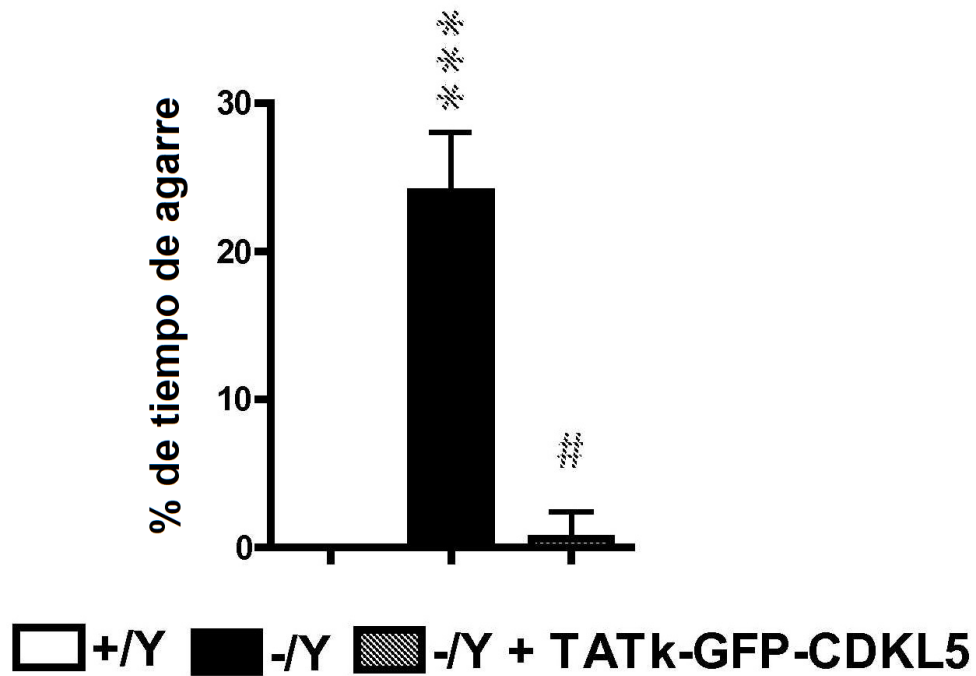


Fig. 35A

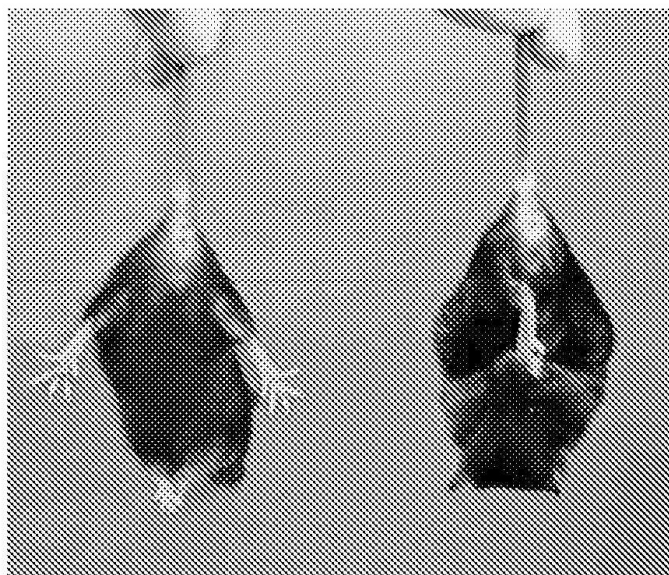


Fig. 35B

Pesos corporales de grupos experimentales

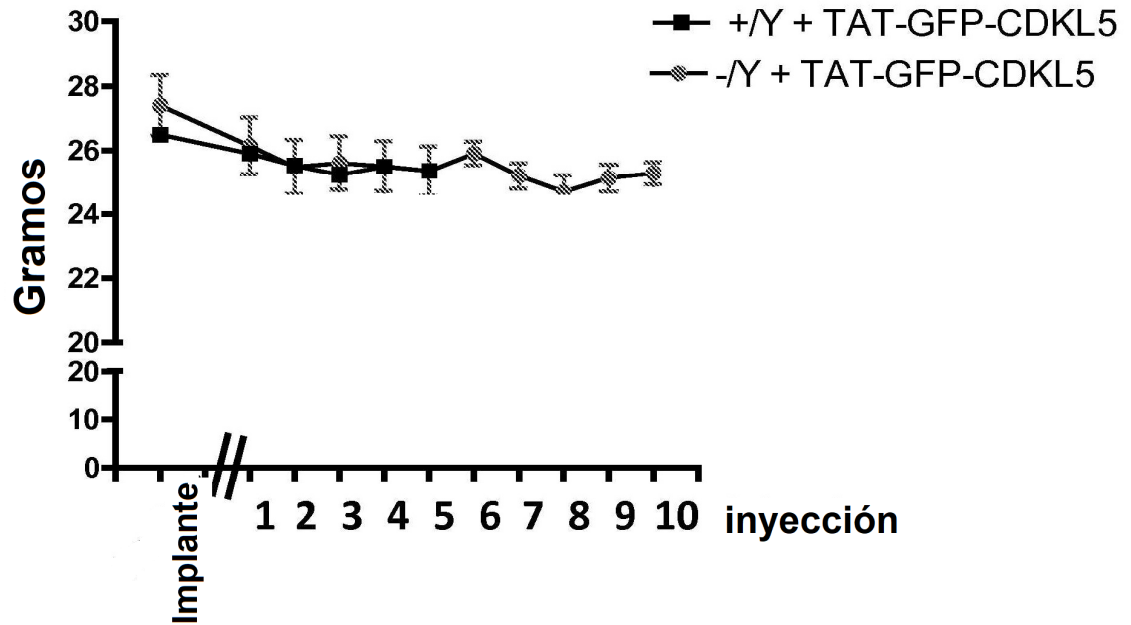


Fig. 36