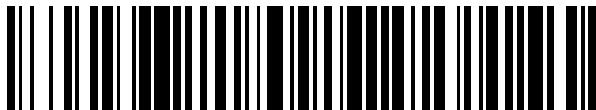


(19)



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.

30 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

40 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.

45 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

30 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.

35 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.

45 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.

55 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 µm. 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 ± 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 ± 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 µm. 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 µm.

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 µm.

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 beta-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 ± 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 µm (ampliación inferior) y 20 µm (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 µm.

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 µm.

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.

5 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).

10 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).

15 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).

20 Las Figuras 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).

25 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).

30 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.

35 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.

40 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 + 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; ***p <0,001 en comparación con la +/Y; # p <0,05 en comparación con las muestras -/Y (prueba de Bonferroni después de ANOVA).

45 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 ± 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 ± 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 ± 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.

15 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 ± ET. ***p<0,001 en comparación con la +/Y; # p <0,001 en comparación con las muestras -/Y (prueba de Bonferroni después de ANOVA).

20 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

35 El término "biocompatible", según se usa en la presente memoria, se refiere a un material que junto con cualesquier 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.

40 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 lipofílicas (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.

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".

25 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 transcrita 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, "sobreexpresado/a" o "sobreexpresión" 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 transcripto 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 predisposto 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 padecen el trastorno, así como aquellos en los que se debe prevenir el trastorno.

50 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 contraíones 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 amídico 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"
15 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 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 trilitadas, para nombrar apenas dos ejemplos,
20 son polinucleótidos como se usa el término en la presente memoria. "Polinucleótido" y "ácidos nucleicos" también 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.

- 40 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 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.

- 50 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.

- 55 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 cualesquier 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

- 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 exógeno 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, Grabskov, 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.

- 5 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.
- 10 Según se usa en la presente memoria, "ADNc" se refiere a una secuencia de ADN que es complementaria a un transcripto 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 transcriptos 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.
- 15 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).
- 20 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.
- 25 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/ARN, enzima o proteína/ADN y/o molécula de ADN con otro ácido nucleico (ADN o ARN) o aminoácido, que puede mediarse 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 lipofílicas. 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/ARN, 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 epítopo simple y no a otro epítopo dentro de la familia de proteínas.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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 axónicas 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.

10 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.

20 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.

30 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.

35 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 de 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.

40 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.

45 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.

55 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)), betagalactosidasa, 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 secretan 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 compresión 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 lisarlas.

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 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, 40 hormonas, inmunomoduladores, antipiréticos, ansiolíticos, antipsicóticos, analgésicos, antiespasmódicos, antiinflamatorios, antihistamínicos, antiinfecciosos y quimioterapéuticos.

45 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 folículo y hormona estimulante de la tiroides), eicosanoides (p. ej., ácido araquidónico, lipoxinas y prostaglandinas), y hormonas esteroides (p. ej., estradiol, testosterona, tetrahidro testosterona cortisol).

50 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).

55 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.

Los ansiolíticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, benzodiacepinas (p. ej., alprazolam, bromazepam, clordiacepóxido, clonazepam, clorazepam, 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, 5 dicirazina, flufenazina, levomepromazina, mesoridazina, perazina, periciazina, perfenazina, pipotiazina, proclorperazina, promazina, prometazina, protipendilo, tioproperazina, tioridazina, trifluoperazina, triflupromazina, clorprotixeno, clopentixol, flupentixol, tiotixeno, zuclopentixol, clotiapina, loxapina, protipendilo, carpipramina, clozaprina, 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, papverina, ciclobenzaprina, carisoprodol, orfenadrina, tizanidina, metaxalona, metodcarbamol, clorzoxazona, 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).

25 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, dexbromfeniramina, dexclorfeniramina, dimenhidrínato, dimetindeno, difenhidramina, doxilamina, ebasiina, embramina, fexofenadina, hidroxizina, levocetirzina, loratadina, meclozina, mirtazapina, olopatadina, orfenadrina, fenindamina, feniramina, feniltoloxamina, 30 prometazina, pirlamina, quetiapina, rupatadina, tripeleannamina y triprolidina), antagonistas del receptor de H₂ (p. ej., cimetidina, famotidina, lafutidina, nizatidina, rafitidina 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, 35 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, flucitosina y polienos (p. ej., nistatin y anfotericina b), agentes antimaláricos (p. ej., pirimetamina/sulfadoxina, artemeter/lumefantrina, atovacauna/procuanil, quinina, hidroxicloroquina, mefloquina, cloroquina, doxiciclina, pirimetamina y haloantrina), 40 agentes antituberculosos (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, 45 lamivudina/zidovudina, emtricitabina/tenofovir, emtricitabina/opinavir/ritonavir/tenofovir, interferón alfa-2b/ribavirina, peginterferón alfa-2b, maraviroc, raltegravir, dolutegravir, enfuvirtida, foscarnet, fomivirsen, oseltamivir, zanamivir, nevirapina, efavirenz, etravirina, rilpivirina, delaviridina, nevirapina, entecavir, lamivudina, adefovir, sofosbuvir, didanosina, tenofovir, avacavir, zidovudina, estavudina, emtricitabina, xalcitabina, telbivudina, simeprevir, boceprevir, 50 telaprevir, lopinavir/ritonavir, fosamprenavir, dranuavir, ritonavir, tipranavir, atazanavir, nelfinavir, amprenavir, indinavir, sawuínavir, ribavirin, valciclovir, aciclovir, famciclovir, ganciclovir y valganciclovir), carbapenémicos (p. ej., doripenem, meropenem, ertapenem y cilastatina/imipenem), cefalosporinas (p. ej., cefadroxil, cefradina, cefazolina, cefalexina, cefepima, ceftarolina, loracarbef, cefotetan, cefuroxima, cefprozil, loracarbef, cefoxitina, cefaclor, 55 ceftibuten, ceftriaxona, cefotaxima, cefpodoxima, cefdinir, cefixima, cefditoren, cefizoxima, y ceftazidima), antibióticos glicopeptídicos (p. ej., vancomicina, dalbavancina, oritavancina y telavancina), glicilciclinas (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, 60 procaína penicilina, oxacilina, dicloxacilina y naftcilina), quinolonas (p. ej., lomefloxacina, norfloxacina, ofloxacina, cuatifloxacina, moxifloxacina, ciprofloxacina, levofloxacina, gemifloxacina, moxifloxacina, cinoxacina, ácido nalidíxico,

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

10 Los quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, apaclitaxel, brentuximab vedotin, doxorrbicina, 5-FU (fluorouracilo), everolimus, pemetrexed, melfalán, pamidronato, anastrozol, exemestano, nelarabina, ofatumumab, bevacizumab, belinostat, tositumomab, carmustina, bleomicina, bosutinib, busulfán, alemtuzumab, irinotecan, vandetanib, bicalutamida, lomustina, daunorrubicina, clofarabina, cabozantinib, dactinomicina, ramucirumab, citarabina, citoxán, ciclofosfamida, decitabina, dexametasona, docetaxel, hidroxiurea, decarbazina, leuprolida, epirrubicina, oxaliplatino, asparaginasa, estramustina, cetuximab, vismodegib, asparginasa Erwinia chrysanthemi, amifostina, etopósido, flutamida, toremifeno, fulvestrant, letrozol, degarelix, pralatrexato, metotrexato, floxuridina, obinutuzumab, gemcitabinea, afatinib, imatinib mesilate, carmustina, eribulin, trastuzumab, altretamina, topotecan, ponatinib, idarrubicina, ifosfamida, ibrutinib, axitinib, interferón alfa-2a, gefitinib, romidepsina, ixabepilona, 15 ruxolitinib, cabazitaxel, ado-trastuzumab emtansina, carfilzomib, clorambucil, sargramostim, cladribina, mitotano, vincristina, procarbazina, megestrol, trametinib, mesna, cloruro de estroncio-89, mecloretamina, mitomicina, busulfán, gemtuzumab ozogamicina, vinorelbina, filgrastim, pegfilgrastim, sorafenib, nilutamida, pentostatina, tamoxifeno, mitoxantrona, pegaspargasa, denileucina diftitox, altretinoína, carboplatino, pertuzumab, cisplatino, pomalidomida, prednisona, aldesleucina, mercaptopurina, ácido zoledrónico, lenalidomida, rituximab, octretida, 20 dasatinib, regorafenib, histrelina, sunitinib, siltuximab, omacetaxina, tioguanina (tioguanina), dabrafenib, erlotinib, bexaroteno, temozolomida, tiotepa, talidomida, BCG, temsirolimus, clorhidrato de bendamustina, triptoreolina, trióxido de arésnio, lapatinib, valrubicina, panitumumab, vinblastina, bortezomib, tretinóina, 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.

30 35 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.

40 45 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 aproximadamente 200 a aproximadamente 300 µL por inyección, tal como para una inyección administrada sistémicamente. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz puede ser aproximadamente 5 ng/µL, tal como para inyecciones sistémicas. Para algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz puede ser 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.

50 55 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, intracardíaca, 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, hidroxipropilmetylcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetylcelulosa y acetato succinato de hidroxipropilmetylcelulosa; 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 polímérico 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 unguento tópico o crema. Cuando se formula en un unguento, 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 unguento 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.

5 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 deseche después de que se haya agotado el contenido del contenedor.

10 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.

15 20 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 cellobiosa y/o sales metálicas de ácido esteárico, estearato de magnesio o calcio.

25 30 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.

35 40 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, intracardíaca, intraarticular, intracavernosa, intratecal, intavireal, 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.

45 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.

50 55 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 folículo y hormona estimulante de la tiroides), eicosanoides (p. ej., ácido araquidónico, lipoxinas y prostaglandinas), y hormonas esteroides (p. ej., estradiol, testosterona, tetrahidro 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, salicilato de magnesio y salicilato de sodio), paracetamol/acetaminofeno, metamizol, nabumetona, fenazona y quinina.

Los ansiolíticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, benzodiacepinas (p. ej., alprazolam, bromazepam, clordiacepóxido, clonazepam, clorazepato, diazepam, flurazepam, lorazepam, oxazepam, temazepam, triazolam y tofisopam), antidepresivos serotonérgeticos (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, diclazina, flufenazina, levomepromazina, mesoridazina, perazina, periciazina, perfenazina, pipotiazina, proclorperazina, promazina, prometazina, protipendilo, tioproperazina, tiqidazina, trifluoperazina, trifluopromazina, clorprotixeno, clopentixol, flupentixol, tiotixeno, zuclopentixol, clotiapina, loxapina, protipendilo, caripramina, clozaprina, 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).
- 5 Los antiespasmódicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, mebeverina, papverina, ciclobenzaprina, carisoprodol, orfenadrina, tizanidina, metaxalona, metodcarbamol, clorzoxazona, baclofeno, dantroleno, baclofeno, tizanidina y dantroleno.
- 10 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).
- 15 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, levocetirzina, loratadina, meclozina, mirtazapina, olopatadina, orfenadrina, fenindamina, feniramina, feniltoloxamina, prometazina, pirilamina, quetiapina, rupatadina, tripeleannamina y triprolidina), antagonistas del receptor de H₂ (p. ej., cimetidina, famotidina, lafutidina, nizatidina, rafitidina y roxatidina), tritocualina, catequina, cromoglicato, nedocromil y agonistas β2-adrenérgicos.
- 20 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, flucitosina y polienos (p. ej., nistatina y anfotericina b), agentes antimaláricos (p. ej., pirimetamina/sulfadoxina, artemeter/lumefantrina, atovacuona/procuanil, 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, fomivirsen, oseltamivir, zanamivir, 35 nevirapina, efavirenz, etravirina, rilpivirina, delavirdina, 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, sawuvinavir, ribavirin, valciclovir, aciclovir, famciclovir, ganciclovir y valganciclovir), carbápenémicos (p. ej., doripenem, meropenem, ertapenem y cilastatina/imipenem), cefalosporinas (p. ej., cefadroxil, cefradina, cefazolina, 40 cefalexina, cefepima, ceftarolina, loracarbef, cefotetan, cefuroxima, cefprozil, loracarbef, cefoxitina, cefaclor, cefributene, ceftriaxona, cefotaxima, cefpodoxima, cefdinir, cefixima, cefditoren, cefiximina, y ceftazidima), antibióticos glicopeptídicos (p. ej., vancomicina, dalbavancina, oritavancina y telvancina), glicilciclinas (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, 45 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, oxacilina, dicloxacilina y naftcilina), quinolonas (p. ej., lomefloxacina, norfloxacina, ofloxacina, cuatifloxacina, moxifloxacina, ciprofloxacina, levofloxacina, gemifloxacina, moxifloxacina, cinoxacina, ácido nalidíxico, 50 enoxacina, grepafloxacina, gatifloxacina, trovafloxacina y esparfloxacina), sulfonamidas (p. ej., sulfametoxazol/trimetoprima, sulfasalazina y sulfasoxazol), tetraciclinas (p. ej., doxiciclina, demeclocicicina, minociclina, doxiciclina/ácido salícílico, doxiciclina/ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y tetraciclina) y antiinfecciosos urinarios (p. ej., nitrofurantoína, metenamina, fosfomicina, cinoxacina, ácido nalidíxico, trimetoprima y azul de metileno).
- 55 Los quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, apaclitaxel, brentuximab vedotin, doxorubicina, 5-FU (fluorouracilo), everolimus, pemtrexed, melfalán, pamidronato, anastrozol, exemestano, nelarabina, ofatumumab, bevacizumab, belinostat, tositumomab, carmustina, bleomicina, bosutinib, busulfán, alemtuzumab, irinotecan, vandetanib, bicalutamida, lomustina, daunorrubicina, clofarabina, cabozantinib, dactinomicina, ramucirumab, citarabina, citoxán, ciclofosfamida, decitabina, dexametasona, docetaxel, hidroxiurea, decarbazine, leuprolida, epirubicina, oxaliplatin, asparaginasa, estramustina, cetuximab, vismodegib, asparginasa Erwinia chrysanthemi, amifostina, etopósido, flutamida, toremifeno, fulvestrant, letrozol, degarelix, pralatrexato, metotrexato, floxuridina, obinutuzumab, gemcitabinea, afatinib, imatinib mesilate, 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, procarbazina, megestrol, trametinib, mesna, cloruro de estroncio-89, mecloretamina, mitomicina, busulfán, gentuzumab ozogamicina, vinorelbina, filgrastim, pegfilgrastim, sorafenib, nilutamida, pentostatina, tamoxifeno, mitoxantrona, pegaspargasa, denileucina diftitox, 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, triptorelin, trióxido de arésnio, lapatinib, valrubicina, panitumumab, vinblastina, bortezomib, tretinóína, 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, intavireal, 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 cultivas 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 transfecitan 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. Despues 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.

10 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 25 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 35 40 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 cualesquier 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 55 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.

15 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 transfecaron 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.

35 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.

40 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 inmunotinieron 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 (-/Y) exhibieron un árbol dendrítico con un patrón muy inmaduro (Figura 13B) en comparación con las contrapartes naturales (+/Y) (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 celulares 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). Despues 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 micrótomo 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) estereotácticamente 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 dendrítica 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 hemicigótico (-/Y) (Figura 28B) y un ratón macho con CDKL5 inactivada hemicigótico 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). Despues 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 | |
| | <210> 1 | |
| | <211> 727 | |
| | <212> ADN | |
| 25 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> CDKL5 | |
| | <400> 1 | |
| | gtgagcaagg gcgaggagct gttcacccggg gtgggtgccca tccctggtcga gctggacggc | 60 |
| | gacgtaaacg gccacaagt cagcgtgtcc ggcgaggggcg agggcgatgc cacctacggc | 120 |
| | aagctgaccc tgaagttcat ctgcaccacc ggcaagctgc ccgtgccctg gcccaccctc | 180 |
| | gtgaccaccc tgacctacgg cgtgcagtgc ttcaagccgtt acccccacca catgaagcag | 240 |
| | cacgacttct tcaagtccgc catgcccggaa ggctacgtcc aggagcgcac catcttcttc | 300 |
| | aaggacgacg gcaactacaa gaccccgccc gaggtgaagt tcgaggggcga caccctggtg | 360 |
| | aacccgcatcg agctgaaggg catcgacttc aaggaggacg gcaacatcct ggggcacaag | 420 |
| | ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc tatcatgg ccgacaagca gaagaacggc | 480 |
| | atcaaggtga acttcaagat ccgccacaac atcgaggacg gcagcgtgca gctcgccgac | 540 |
| | cactaccaggc agaacaccccc catcgccgac ggcggccgtgc tgctgcccga caaccactac | 600 |
| | ctgagcaccc agtccgcccct gagcaaagac cccaacgaga agcgcgatca catggtcctg | 660 |
| | ctggagttcg tgaccgcccgc cgggatcact ctcggcatgg 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 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 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

ES 2 885 245 T3

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

10 <220>
 <223> TATk

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

15 <210> 5
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

20 <400> 5
atggagacag acacactcct gctatggta ctgctgcct gggtccagg ttccactgg 60
<210> 6
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <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

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

30 <220>
 <223> ADNc de proteína de fusión TATk-CDKL5

35 <400> 7

ES 2 885 245 T3

| | |
|---|------|
| atggagacag acacactcct gctatggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt | 60 |
| gacgcggccc agccggccag gcgcgcgcgc cgtaaaaaaaatggtaatgt gatgaataaa | 120 |
| gccccccaggc aggccaggc accggtaag attcctaaca ttggtaatgt gatgaataaa | 180 |
| tttgagatcc ttggggttgt aggtgaagga gcctatggag ttgtactaa atgcagacac | 240 |
| aaggaaacac atgaaaattgt ggcgatcaag aaattcaagg acagtgaaga aaatgaagaa | 300 |
| gtcaaagaaa cgactttacg agagcttaaa atgcttcgga ctctcaagca ggaaaacatt | 360 |
| gtggagttga aggaaggcatt tcgtcggagg gggaaagttgt acttgggttt tgagtatgtt | 420 |
| gaaaaaaaaata tgctcgaatt gctggaaatg atgccaatg gagttccacc tgagaaagta | 480 |
| aaaagctaca tctatcagct aatcaaggct attcactggt gccataagaa tgatattgtc | 540 |
| catcgagata taaaaccaga aaatcttta atcagccaca atgatgtcct aaaactgtgt | 600 |
| gactttggtt ttgctcgtaa tctgtcagaa ggcataatg ctaattacac agagtacgtt | 660 |
| gccaccagat ggtatcggtc cccagaactc ttacttggcg ctccctatgg aaagtccgtg | 720 |
| gacatgtggt cggggggctg tattttggg gagcttagcg atggacagcc tttatttcct | 780 |
| ggagaaaagtg aaatttacca actttttact attcagaagg tgctaggacc actttccatct | 840 |
| gagcagatga agctttctta cagtaatcct cgcttccatg ggctccgggtt tccagctgtt | 900 |
| aaccatcctc agtccttggaa aagaagatac ctggaaattt tgaatagtgt tctacttgac | 960 |
| ctaataatgtt gttggaccctt gctgacagat acttgacaga acagtgtttg | 1020 |
| aatcacccta catttcaaaac ccagagactt ctggatcggtt ctccctcaag gtcagcaaaa | 1080 |
| agaaaaacctt accatgtggaa aagcagcaca ttgtctata gaaaccaagc cggcaaaaagt | 1140 |
| actgctttgc agtctcacca cagatctaac agcaaggaca tccagaacct gagtgttaggc | 1200 |
| ctggcccccggg ctgacgaagg tctccctgcc aatgaaagct tcctaaatgg aaacccgtt | 1260 |
| ggagcttagtc ttgtccact gcacacccaa acctaccaag caagcagccca gcctgggtct | 1320 |
| accagcaacat atctcaccaaa caacaacata ccacacccctt ttagcccaaa agaagccaaag | 1380 |
| tcaaaaaacag agtttgattt taatattgac ccaaagcctt cagaaggccc agggacaaag | 1440 |
| tacctcaagt caaacagcag atctcagcag aaccgccact cattcatggaa aagctctcaa | 1500 |
| agcaaagctg ggacactgca gcccataatgaa aagcagagtc ggcataagcta tattgacaca | 1560 |
| attccccagt cctcttaggag tccctcctac aggaccaagg cccaaagccca tggggcactg | 1620 |
| agtgactcca agtctgtgag caaccccttctt gaagccaggg cccaaattgc ggagcccaagt | 1680 |

ES 2 885 245 T3

| | |
|---|------|
| accagtaggt acttcccatc tagctgctta gacttgaatt ctcccaccag cccaaacccc | 1740 |
| accagacaca gtgacacgag aacttgctc agcccttctg gaagaaaataa ccgaaatgag | 1800 |
| ggaacgctgg actcacgtcg aaccacaacc agacattcta agacgatgga ggaattgaag | 1860 |
| ctgccggagc acatggacag tagccattcc cattcactgt ctgcaccta cgaatcttt | 1920 |
| tcttatggac tgggctacac cagccccttt tcttcccagc aacgtcctca taggcattct | 1980 |
| atgtatgtga cccgtgacaa agtgagagcc aagggttgg atggaagctt gagcataggg | 2040 |
| caagggatgg cagctagagc caacagcctg caactcttgt cacccccagcc tggagaacag | 2100 |
| ctccctccag agatgactgt ggcaagatct tcggtcaaag agacctccag agaaggcacc | 2160 |
| tcttccttcc atacacgcca gaagtctgag ggtggagtgt atcatgaccc acactctgat | 2220 |
| gatggcacag cccccaaga aaatagacac ctatacaatg atcctgtgcc aaggagagtt | 2280 |
| ggtagctttt acagagtgcc atctccacgt ccagacaatt ctttccatga aaataatgtg | 2340 |
| tcaactagag tttcttctct accatcagag agcagttctg gaaccaacca ctcaaaaaga | 2400 |
| caaccagcat tcgatccatg gaaaagtctt gaaaatatta gtcattcaga gcaactcaag | 2460 |
| aaaaaaagaga agcaaggatt ttccaggtca ataaaaaaga aaaagaagaa atctcaaaca | 2520 |
| gtacccaatt ccgacagccc tgatctctg acgttgcaga aatccattca ttctgctagc | 2580 |
| actccaagca gcagacaaa ggagtggcgc cccgagaaga tctcagatct gcagacccaa | 2640 |
| agccagccat taaaatcaact gcgcaagttt ttacatctct cttcggcctc aaatcaccgg | 2700 |
| gcttcctcag atccccctt ccagccctta acagctcaac aaaccaaaaa ttccctctca | 2760 |
| gaaattcggta ttccacccctt gagccaggcc tctggcggga gcagcaacat ccggcaggaa | 2820 |
| cccgacccga agggcaggcc agccctccag ctgccagacg gtggatgtga tggcagaaga | 2880 |
| cagagacacc attctggacc ccaagataga cgcttcatgt taaggacgac agaacaacaa | 2940 |
| ggagaatact tctgctgtgg tgacccaaag aagcctcaca ctccgtgcgt cccaaaccga | 3000 |
| gcccttcatac gtccaatctc cagtcctgct ccctatccag tactccaggt ccgaggcact | 3060 |
| tccatgtgcc cgacactcca ggtccgaggc actgatgctt tcaagtcgtccc aaccctggaa | 3120 |
| tccgggttct ctttcttcgt gagacacgtt atgagggaag ccctgattca cagggccag | 3180 |
| gtaaaccaag ctgcgctcct gacataccat gagaatgcgg cactgacggg caagtccgct | 3240 |
| cgaggagggc ccgaacaaaactcatctca 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 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
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 gctatggta ctgctgctct gggttccagg | 60 |
| ttccactgggt gacgcggccc agccggccag gcgcgcgcgc cgtacgaagc ttgcggccta | 120 |
| cgcaggaaag gccgccaggc aggccaggc acggtcgcca ccatggtgag caagggcgag | 180 |
| gagctgttca ccgggggtggt gccccatcctg gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac | 240 |
| aagttcagcg tgtccggcga gggcgaggc gatgccacct acggcaagct gaccctgaag | 300 |
| ttcatctgca ccaccggcaa gctgcccgtg ccctggccca ccctcgtgac caccctgacc | 360 |
| tacggcgtgc agtgcttcag ccgctacccc gaccacatga agcagcacga cttttcaag | 420 |
| tccgcccattgc ccgaaggcta cgtccaggag cgccacatct tcttcaagga cgacggcaac | 480 |
| tacaagaccc gcgccgaggt gaagttcgag ggcgacaccc tggtaaccg catcgagctg | 540 |
| aagggcatcg acttcaagga ggacggcaac atccctgggc acaagctgga gtacaactac | 600 |
| aacagccaca acgtctatat catggccgac aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc | 660 |

ES 2 885 245 T3

| | |
|---|------|
| aagatccgcc acaacatcg a ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac | 720 |
| acccccattcg gcgacggccc cgtgctgctg cccgacaacc actaccttag cacccagtcc | 780 |
| gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc gatcacatgg tcctgctgga gttcgtgacc | 840 |
| gccgccccggaa tcactctcg catggacgag ctgtacaagt ccggactcag atctcgagcg | 900 |
| aagattccta acattggtaa tgtgatgaat aaatttgaga tccttgggt ttaggtgaa | 960 |
| ggaggcctatg gagttgtact taaatgcaga cacaaggaaa cacatgaaaat tgtggcgatc | 1020 |
| aagaaaattca aggacagtga agaaaatgaa gaagtcaaag aaacgacttt acgagagctt | 1080 |
| aaaatgcttc ggactctcaa gcaggaaaac atttgtggagt tgaaggaagc atttcgtcg | 1140 |
| aggggaaagt tgtacttggt gttttagtat gttgaaaaaa atatgctcgaa attgtggaa | 1200 |
| gaaatgccaa atggagttcc acctgagaaa gtaaaaagct acatctatca gctaatacg | 1260 |
| gctattcact ggtgcctaag aatgatattt tccatcgaga tataaaaacca gaaaatctct | 1320 |
| taatcagcca caatgatgtc ctaaaactgt gtgactttgg ttttgcgt aatctgtcag | 1380 |
| aaggcaataa tgctaattac acagagtacg ttgccaccag atggtatcg tccccagaac | 1440 |
| tcttacttgg cgctccctat ggaaagtccg tggacatgtg gtcgggtggc tgtatttttg | 1500 |
| gggagcttag cgtggacag cctttatcc ctggagaaaag tgaaattgac caactttta | 1560 |
| ctattcagaa ggtgcttagga ccacttccat ctgagcagat gaagctttt tacagtaatc | 1620 |
| ctcgcttcca tgggctccgg tttccagctg ttaaccatcc tcagtccttg gaaagaagat | 1680 |
| accttggaat tttgaatagt gtttacttg acctaattgaa gaatttactg aagttggacc | 1740 |
| cagctgacag atacttgaca gaacagtgtt tgaatcaccc tacatttcaa acccagagac | 1800 |
| ttctggatcg ttctccttca aggtcagcaa aaagaaaacc ttaccatgtg gaaaggcagca | 1860 |
| cattgtctaa tagaaaccaa gccggcaaaa gtactgttt gcagtctcac cacagatcta | 1920 |
| acagcaagga catccagaac ctgagtgtag gcctgccccg ggctgacgaa ggtctccctg | 1980 |
| ccaatgaaag cttccctaaat ggaaaccttg ctggagctag tcttagtcca ctgcacacca | 2040 |
| aaaccttacca agcaaggcgc cagcctgggt ctaccagcaa agatctcacc aacaacaaca | 2100 |
| taccacacct tcttagccca aaagaagccaa agtcaaaaac agatttgtat ttaatattt | 2160 |
| acccaaagcc ttcagaaggc ccagggacaa agtacctcaa gtcaaacagc agatctcagc | 2220 |
| agaaccgcca ctcattcatg gaaagctctc aaagcaaagc tgggacactg cagccaaatg | 2280 |
| aaaaggcagag tcggcatagc tatattgaca caattccccaa gtcctctagg agtccctct | 2340 |
| acaggaccaa ggccaaaagc catggggcac tgagtgactc caagtctgtg agcaacctt | 2400 |
| ctgaagccag ggcccaaatt gggagccca gtaccagtag gtacttccca tctagctgt | 2460 |
| tagacttgaa ttctcccacc agcccaaccc ccaccagaca cagtgacacg agaactttgc | 2520 |

ES 2 885 245 T3

| | |
|--|------|
| tcagcccttc tggaaaat aaccgaaatg aggaaacgct ggactcacgt cgaaccacaa | 2580 |
| ccagacattc taagacgatg gaggaattga agctgccgga gcacatggac agtagccatt | 2640 |
| cccattcact gtctgcacct cacgaatctt tttcttatgg actgggctac accagcccct | 2700 |
| tttcttcca gcaacgtcct cataggcatt ctatgtatgt gacccgtgac aaagtgagag | 2760 |
| ccaaggcctt ggatggaagc ttgagcatag ggcaaggat ggcagctaga gccaaacagcc | 2820 |
| tgcaactctt gtcaccccaag cctggagaac agctccctcc agagatgact gtggcaagat | 2880 |
| cttcggtaa agagacctcc agagaaggca cctcttcctt ccatacacgc cagaagtctg | 2940 |
| agggtggagt gtatcatgac ccacactctg atgatggcac agccccaaa gaaaatagac | 3000 |
| acctatacaa tgatcctgtg ccaaggagag ttggtagctt ttacagagtg ccatctccac | 3060 |
| gtccagacaa ttctttccat gaaaataatg tgtcaactag agtttcttctt ctaccatcag | 3120 |
| agagcagttc tggAACCAAC cactaaaaaa gacaaccagc attcgatcca tggAAAAGTC | 3180 |
| ctgaaaatat tagtcattca gagcaactca aggAAAAAAGA gaagcaagga ttttcaggt | 3240 |
| caatgaaaaa gaaaaAGAAAG aaatctcaaa cagtacccaa ttccgacagc cctgatctc | 3300 |
| tgacgttgca gaaatccatt cattctgcta gcactccaag cagcagacca aaggagtggc | 3360 |
| gccccggaag atctcagatc tgcagaccca aagccagcca ttaaaatcac tgcgcaagtt | 3420 |
| gttacatctc tcttcggcct caaatcaccc ggcttcctca gtccccgctt ccagccctta | 3480 |
| acagctcaac aaaccaaaaa ttccctctca gaaattcggg ttcacccctt gagccaggcc | 3540 |
| tctggggga gcagcaacat ccggcaggaa cccgcaccga agggcaggcc agccctccag | 3600 |
| ctgccagacg gtggatgtga tggcagaaga cagagacacc attctggacc ccaagataga | 3660 |
| cgcttcatgt taaggacgac agaacaacaa ggagaatact tctgctgtgg tgacccaaag | 3720 |
| aaggctcaca ctccgtcggt cccaaaccga gcccttcatac gtccaatctc cagtcctgt | 3780 |
| ccctatccag tactccaggt ccgaggcact tccatgtgcc cgacactcca ggtccgaggc | 3840 |
| actgatgctt tcagctgccc aaccagcaa tccgggtct ctttcttcgt gagacacgtt | 3900 |
| atgagggaaag ccctgattca cagggcccag gtaaaccaag ctgcgctctt gacataccat | 3960 |
| gagaatgcgg cactgacggg caagtccgct cgaggaggc 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
545 550 555 560

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

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 gctatggta ctgctgtct gggttccagg ttccactgg | 60 |
| gacgcggccc agccggccag gcgcgcgcgc cgtacgaagc ttgcggccta cgccagaaag | 120 |
| gccgccaggc aggccagggc accggtcgccc accatggtga gcaaggcgaa ggagctgttc | 180 |
| accgggtgg tgcccatcct ggtcgagctg gacggcgacg taaaacggcca caagttcagc | 240 |
| gtgtccggcg agggcgaggg cgatgccacc tacggcaagc tgaccctgaa gttcatctgc | 300 |
| accaccggca agctgccccgt gccctggccc accctcgta ccaccctgac ctacggcgtg | 360 |
| cagtgcttca gccgctaccc cgaccacatg aagcagcacg acttcttcaa gtccggccatg | 420 |
| cccgaaaggct acgtccagga ggcgcaccatc ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc | 480 |
| cgcgccgagg tgaagttcga gggcgacacc ctgggtgaacc gcatcgagct gaagggcatc | 540 |
| gacttcaagg aggacggcaa catcctgggg cacaagctgg agtacaacta caacagccac | 600 |
| aacgtctata tcatggccga caagcagaag aacggcatca aggtgaacctt caagatccgc | 660 |
| cacaacatcg aggacggcag cgtcagctc gccgaccact accagcagaa cacccccatc | 720 |
| ggcgacggcc ccgtgctgtt gcccgacaac cactacctga gcacccagtc cgccctgagc | 780 |

ES 2 885 245 T3

| | |
|--|------|
| aaagacccca acgagaagcg cgatcacatg gtcctgctgg agttcgtgac cgccgcggg | 840 |
| atcactctcg gcatggacga gctgtacaag tccggactca gatctcgagc gaagattcct | 900 |
| aacattggta atgtgatgaa taaattttag atccttgggg ttgttaggtga aggagcctat | 960 |
| ggagttgtac ttaaatgcag acacaaggaa acacatgaaa ttgtggcgat caagaaattc | 1020 |
| aaggacagtg aagaaaaatga agaagtcaaa gaaacgactt tacgagagct taaaatgctt | 1080 |
| cggactctca agcaggaaaa cattgtggag ttgaaggaag catttcgtcg gaggggaaag | 1140 |
| ttgtacttgg tggttgagta tggtgaaaaa aatatgctcg aattgctgga agaaatgcca | 1200 |
| aatggagttc cacctgagaa agtaaaaagc tacatctatc agctaatacaa ggctattcac | 1260 |
| tgggccata agaatgatat tgtccatcga gatataaaac cagaaaaattt cttaatcage | 1320 |
| cacaatgatg tcctaaaact gtgtgactt gggttgctc gtaatctgtc agaaggcaat | 1380 |
| aatgctaatt acacagaga cggtgccacc agatggtac ggtccccaga actcttactt | 1440 |
| ggcgctccct atggaaagtc cgtggacatg tggtcggtgg gctgtattct tggggagctt | 1500 |
| agcgatggac agcctttatt tctggagaa agtgaattt accaacttt tactattcag | 1560 |
| aagggtctag gaccacttcc atctgagcag atgaagctt tctacagtaa tcctcgcttc | 1620 |
| catgggctcc gggttccagc tgttaaccat cctcagtcct tggaaagaag ataccttgga | 1680 |
| attttgaata gtgttctact tgacctaatt aagaattttac tgaagttgga cccagctgac | 1740 |
| agatacttga cagaacagtg tttgaatcac cctacatttc aaacccagag acttctggat | 1800 |
| cgttctcctt caaggtcagc aaaaagaaaa ctttaccatg tggaaagcag cacattgtct | 1860 |
| aatagaaacc aagccggcaa aagtactgct ttgcagtctc accacagatc taacagcaag | 1920 |
| gacatccaga acctgagtgt aggccctccc cgggctgacg aaggtctccc tgccatgaa | 1980 |
| agcttcctaa atggaaacct tgctggagct agtcttagtc cactgcacac caaaacctac | 2040 |
| caagcaagca gccagcctgg gtctaccagc aaagatctca ccaacaacaa cataccacac | 2100 |
| cttcttagcc caaaaagaagc caagtcaaaa acagagttt attttaatat tgacccaaag | 2160 |
| ccttcagaag gcccaggac aaagtacctc aagtcaaaca gcagatctca gcagaaccgc | 2220 |
| cactcattca tggaaagctc tcaaagcaaa gctgggacac tgcagcccaa tgaaaagcag | 2280 |
| agtcggcata gctatattga cacaattccc cagtcctcta ggagtccctc ctacaggacc | 2340 |
| aaggccaaaa gccatggggc actgagtgac tccaaagtctg tgagcaacct ttctgaagcc | 2400 |
| agggccccaa ttgcggagcc cagtaccagt aggtacttcc catctagctg cttagacttg | 2460 |
| aattctccca ccagccaaac ccccaccaga cacagtgaca cgagaacttt gctcagccct | 2520 |
| tctggaagaa ataaccgaaa tgagggAACG ctggactcac gtcgaaccac aaccagacat | 2580 |
| tctaaagacga tggaggaatt gaagctccg gagcacatgg acagtagcca ttcccattca | 2640 |

ES 2 885 245 T3

| | |
|--|------|
| ctgtctgcac ctcacgaatc ttttcttat ggactgggct acaccagccc cttttttcc | 2700 |
| cagcaacgtc ctcataggca ttctatgtat gtgaccctgt acaaagttag agccaaggcg | 2760 |
| ttggatggaa gcttgagcat agggcaaggg atggcagacta gagccaacag cctgcaactc | 2820 |
| ttgtcacccc agcctggaga acagctccct ccagagatga ctgtggcaag atcttcggtc | 2880 |
| aaagagacct ccagagaagg cacctttcc ttccatacac gccagaagtc tgagggtgga | 2940 |
| gtgtatcatg acccacactc tgatgtggc acagccccca aagaaaatag acacctatac | 3000 |
| aatgtccctg tgccaaaggag agttggtagc ttttacagag tgccatctcc acgtccagac | 3060 |
| aattcttcc atgaaaataa tgtgtcaact agagtttctt ctctaccatc agagagcagt | 3120 |
| tctggaacca accactcaaa aagacaacca gcattcgatc catgaaaag tcctgaaaat | 3180 |
| attagtcatt cagagcaact caaggaaaaa gagaagcaag gatTTTcag gtcaatgaaa | 3240 |
| aagaaaaaga agaaatctca aacagtaccc aattccgaca gcccgtatct tctgacgttg | 3300 |
| cagaaatcca ttcatctgc tagcaactcca agcagcagac caaaggagtg gcgcccccag | 3360 |
| aagatctcag atctgcagac ccaaagccag ccattaaaat cactgcgcaa gttgttacat | 3420 |
| ctctcttcgg cctcaaatac cccggcttcc tcagatcccc gcttccagcc cttaacagct | 3480 |
| caacaaacca aaaattcttt ctcagaaatt cggttccacc ccctgagccca ggcctctggc | 3540 |
| gggagcagca acatccggca ggaacccgca ccgaaggcga ggccagccct ccagctgcca | 3600 |
| ggtcagatgg atcctggttg gcatgtgtcc tctgtgacca ggagtgccac agagggccct | 3660 |
| tcctactctg aacagctggg tgccaaaagt gggccaaatg ggcaccccta taacagaaca | 3720 |
| aatcgctcac gaatgcaaa tctgaatgat taaaagaga cagccttgtc cgctcgagga | 3780 |
| gggcccgaac aaaaactcat ctcagaagag gatctgaata ggcgcgtcga ccatcatcat | 3840 |
| catcatcatt qa | 3852 |

<210> 12

<211> 1283

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de proteína de fusión TATk-CDKL5

<400> 12

Met Glu T

1

20 25 30

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 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 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 gctatggta ctgctgctct gggttccagg | 60 |
| ttccactgggt gacgcggccc agccggccag gcgcgcgcgc cgtacgaagc ttgcggccta | 120 |
| cgcgcagaaag gccgcgcaggc aggccaggc accggtaag attcctaaca ttggtaatgt | 180 |
| gatgaataaaa tttgagatcc ttgggttgtt aggtgaagga gcctatggag ttgtactaa | 240 |
| atgcagacac aaggaaacac atgaaattgt ggcgatcaag aaattcaagg acagtgaaga | 300 |
| aaatgaagaa gtcaaagaaa cgactttacg agagcttaaa atgcttcgga ctctcaagca | 360 |
| ggaaaacatt gtggagttga aggaagcatt tcgtcgagg ggaaagttgt acttgggttt | 420 |
| tgagtatgtt gaaaaaaaaa tgctcgaatt gctggaagaa atgccaatag gagttccacc | 480 |
| tgagaaaagta aaaagctaca tctatcagct aatcaaggct attcactggc gccataagaa | 540 |
| tgatattgtc catcgagata taaaaccaga aaatctctta atcagccaca atgatgtcct | 600 |
| aaaactgtgt gactttgggtt ttgctcgtaa tctgtcagaa ggcaataatg ctaattacac | 660 |
| agagtacgtt gccaccagat ggtatcggtc cccagaactc ttacttggcg ctccctatgg | 720 |
| aaagtccgtg gacatgtgtt cggtggcgtg tatttttggg gagcttagcg atggacagcc | 780 |
| tttatttcct ggagaaaagtg aaattgacca actttttact attcagaagg tgcttaggacc | 840 |
| acttccatct gagcagatga agctttcta cagtaatcct cgcttccatg ggctccgggtt | 900 |
| tccagctgtt aaccatcctc agtccttgaa aagaagatac cttggaaattt tgaatagtgt | 960 |
| tctacttgac ctaatgaaga atttactgaa gttggaccca gctgacagat acttgacaga | 1020 |
| acagtgtttg aatcaccccta catttcaaacc ccagagactt ctggatcggtt ctccctcaag | 1080 |
| gtcagcaaaa agaaaaacctt accatgtgga aagcagcaca ttgtctaata gaaaccaagc | 1140 |
| cggcaaaaagt actgctttgc agtctcacca cagatctaacc agcaaggaca tccagaacct | 1200 |
| gagtgtaggc ctgccccggg ctgacgaagg tctccctgcc aatgaaagct tcctaaatgg | 1260 |
| aaacccctgct ggagcttagtc tttagtccact gcacacccaa acctaccaag caagcagccca | 1320 |
| gcctgggtct accagcaaaag atctcaccaaa caacaacata ccacacccctc tttagcccaaa | 1380 |
| agaagccaag tcaaaaaacag agtttgattt taatattgac ccaaagcctt cagaaggccc | 1440 |
| agggacaaag tacctcaagt caaacagcag atctcagcag aaccgcact cattcatgga | 1500 |
| aagctctcaa agcaaagctg ggacactgca gcccaatgaa aagcagagtc ggcatacgta | 1560 |

ES 2 885 245 T3

| | |
|--|------|
| tattgacaca attccccagt cctctaggag tccctcctac aggaccaagg ccaaaagcca | 1620 |
| tggggcaactg agtgactcca agtctgtgag caacccttct gaagccaggg cccaaattgc | 1680 |
| ggagcccagt accagtaggt acttcccatac tagctgctta gacttgaatt ctcccaccag | 1740 |
| cccaacccccc accagacaca gtgacacgag aactttgctc agcccttctg gaagaataa | 1800 |
| ccgaaatgag ggaacgctgg actcacgtcg aaccacaacc agacattcta agacgatgga | 1860 |
| ggaattgaag ctgccggagc acatggacag tagccattcc cattcactgt ctgcacctca | 1920 |
| cgaatcttt tcttatggac tgggctacac cagccccctt tcttcccagc aacgtcctca | 1980 |
| taggcattct atgtatgtga cccgtgacaa agtgagagcc aagggcttgg atgaaagctt | 2040 |
| gagcataggg caagggatgg cagctagagc caacagcctg caactctgt caccccagcc | 2100 |
| tggagaacag ctccctccag agatgactgt ggcaagatct tcggtcaaag agacctccag | 2160 |
| agaaggcacc ttttccttcc atacacgcca gaagtctgag ggtggagtgt atcatgaccc | 2220 |
| acactctgat gatggcacag ccccaaaga aaatagacac ctatacaatg atcctgtgcc | 2280 |
| aaggagagtt ggtagcttt acagagtgcc atctccacgt ccagacaatt ctttccatga | 2340 |
| aaataatgtg tcaactagag tttcttctct accatcagag agcagttctg gaaccaacca | 2400 |
| ctcaaaaaga caaccagcat tcgatccatg gaaaagtccct gaaaatatta gtcattcaga | 2460 |
| gcaactcaag gaaaaagaga agcaaggatt tttcaggtca atgaaaaaga aaaagaagaa | 2520 |
| atctcaaaca gtacccaatt ccgacagccc tgatcttctg acgttgcaga aatccattca | 2580 |
| ttctgctagc actccaagca gcagacccaa ggagtggcgc cccgagaaga tctcagatct | 2640 |
| gcagacccaa agccagccat taaaatcact ggcgaagttt ttacatctct cttccgcctc | 2700 |
| aaatcaccgg gcttcctcaat atccccctt ccagccctta acagctcaac aaaccaaaaa | 2760 |
| ttccttctca gaaattcggat ttcacccctt gagccaggcc tctggcgaaa gcagcaacat | 2820 |
| ccggcaggaa cccgcacccga agggcaggcc agccctccag ctgccaggtc agatggatcc | 2880 |
| tggttggcat gtgtcctctg tgaccaggag tgccacagag ggcccttccct actctgaaca | 2940 |
| gctgggtgcc aaaagtggc caaatggca cccctataac agaacaatc gctcacgaat | 3000 |
| gccaaatctg aatgatttaa aagagacagc cttgtctaga ggatcccggg 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 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 aaatttggaa tccttgggt ttaggtgaa | 60 |
| ggagcctatg gagttgtact taaatgcaga cacaaggaaa cacatgaat tgtggcgatc | 120 |
| aagaaattca aggacagtga agaaaatgaa gaagtcaaag aaacgacttt acgagagctt | 180 |
| aaaatgcttc ggactctcaa gcagggaaaac attgtggagt tgaaggaagc atttcgtcg | 240 |
| aggggaaagt tgtacttggt gtttgagtat gtggaaaaaa atatgctcgat ttgctggaa | 300 |
| gaaatgccaa atggagttcc acctgagaaa gtaaaaagct acatctatca gctaatacag | 360 |
| gctattcact ggtgccataa gaatgatatt gtccatcgag atataaaacc agaaaatctc | 420 |
| ttaatcagcc acaatgatgt cctaaaactg tgtgactttg gtttgctcg taatctgtca | 480 |
| gaaggcaata atgctaatta cacagagtac gtggccacca gatggatcg gtccccagaa | 540 |
| ctcttacttg gcgctcccta tggaaagtcc gtggacatgt ggtcggtgg ctgtattctt | 600 |
| ggggagctta gcgatggaca gcctttatcc cctggagaaa gtaaatttgc ccaactttt | 660 |
| actattcaga aggtgcttagg accacttcca tctgagcaga tgaagcttt ctacagtaat | 720 |
| cctcgcttcc atgggctccg gtttccagct gtaaccatc ctcaagtcc ttgaaagaaga | 780 |
| taccttggaa ttttgaatag ttttctactt gacctaatttga agaatttact gaagttggac | 840 |
| ccagctgaca gatacttgac agaacagtgt ttgaatcacc ctacatttca aaccctgaga | 900 |
| cttctggatc gttctccctc aaggtcagca aaaagaaaac cttaccatgt ggaaagcagc | 960 |
| acattgtcta atagaaacca agccggcaaa agtactgctt tgcaatctca ccacagatct | 1020 |
| aacagcaagg acatccagaa cctgagtgta ggctggccccc gggctgacga aggtctccct | 1080 |
| gc当地atgaaa gcttcctaaa tggaaacctt gctggagcta gtcttagtcc actgcacacc | 1140 |
| aaaacctacc aagcaagcag ccagcctggg tctaccagca aagatctcac caacaacaac | 1200 |
| ataccacacc ttcttagccc aaaagaagcc aagtcaaaaa cagagttga tttaatatt | 1260 |
| gacccaaagc cttcagaagg cccagggaca aagtacctca agtcaaacag cagatctcag | 1320 |

ES 2 885 245 T3

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------|
| cagaaccgcc | actcattcat | ggaaagctct | caaagcaaag | ctgggacact | gcagcccaat | 1380 |
| gaaaagcaga | gtcggcatacg | ctatattgac | acaattcccc | agtccctctag | gagtccctcc | 1440 |
| tacaggacca | aggccaaaag | ccatggggca | ctgagtgact | ccaagtctgt | gagcaacctt | 1500 |
| tctgaagcca | gggccc当地 | tgcgagccc | agtaccagta | ggtacttccc | atctagctgc | 1560 |
| ttagacttga | attctcccac | cagcccaacc | cccaccagac | acagtgacac | gagaactttg | 1620 |
| tctcagccctt | ctggaagaaa | taaccgaaat | gagggAACGC | tggactcact | tcgaaccaca | 1680 |
| accagacatt | ctaagacgat | ggaggaattt | aagctgccgg | agcacatgga | cagtagccat | 1740 |
| tcccattcac | tgtctgcacc | tcacgaatct | ttttcttatg | gactgggcta | caccagcccc | 1800 |
| ttttcttccc | agcaacgtcc | tcataaggcat | tctatgtatg | tgaccctgt | caaagtgaga | 1860 |
| gccaaaggct | tggatggaag | cttgagcata | gggcaaggga | tggcagctag | agccaacagc | 1920 |
| ctgcaactct | tgtcacccca | gcctggagaa | cagctccctc | cagagatgac | tgtggcaaga | 1980 |
| tcttcggtca | aagagacctc | cagagaaggc | acctttctt | tccatacacg | ccagaagtct | 2040 |
| gagggtggag | tgtatcatga | cccacactct | gatgatggca | cagcccccaa | agaaaataga | 2100 |
| cacctataca | atgatcctgt | gccaaaggaga | gttggtagct | tttacagagt | gccatctcca | 2160 |
| cgtccagaca | attcttcca | tgaaaataat | gtgtcaacta | gagtttcttc | tctaccatca | 2220 |
| gagagcagtt | ctggaaccaa | ccactcaaaa | agacaaccag | cattcgatcc | atggaaaagt | 2280 |
| cctgaaaata | ttagtcattc | agagcaactc | aaggaaaaag | agaagcaagg | attttcagg | 2340 |
| tcaatgaaaa | agaaaaagaa | gaaatctcaa | acagtaccca | attccgacag | ccctgatctt | 2400 |
| ctgacgttgc | agaaatccat | tcattctgct | agcactccaa | gcagcagacc | aaaggagtgg | 2460 |
| cgccccgaga | agatctcaga | tctgcagacc | caaagccagc | cattaaaatc | actgcgcag | 2520 |
| ttgttacatc | tctcttcggc | ctcaaatac | ccggcttccct | cagatccccg | cttccagccc | 2580 |
| ttaacagctc | aacaaaccaa | aaattccctc | tcagaaaattc | ggattcaccc | cctgagccag | 2640 |
| gcctctggcg | ggagcagcaa | catccggcag | gaacccgcac | cgaagggcag | gccagccctc | 2700 |
| cagctgccag | gtcagatgga | tcctggttgg | catgtgtct | 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 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 TAT_k, en donde la secuencia de ácido nucleico de TAT_k codifica una secuencia polipéptídica de TAT_k, en donde la secuencia polipéptídica de TAT_k 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 TAT_k está acoplada funcionalmente a la secuencia de ácido nucleico de CDKL5 y/o la secuencia polipéptídica de TAT_k está acoplada funcionalmente a la secuencia polipéptídica 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.

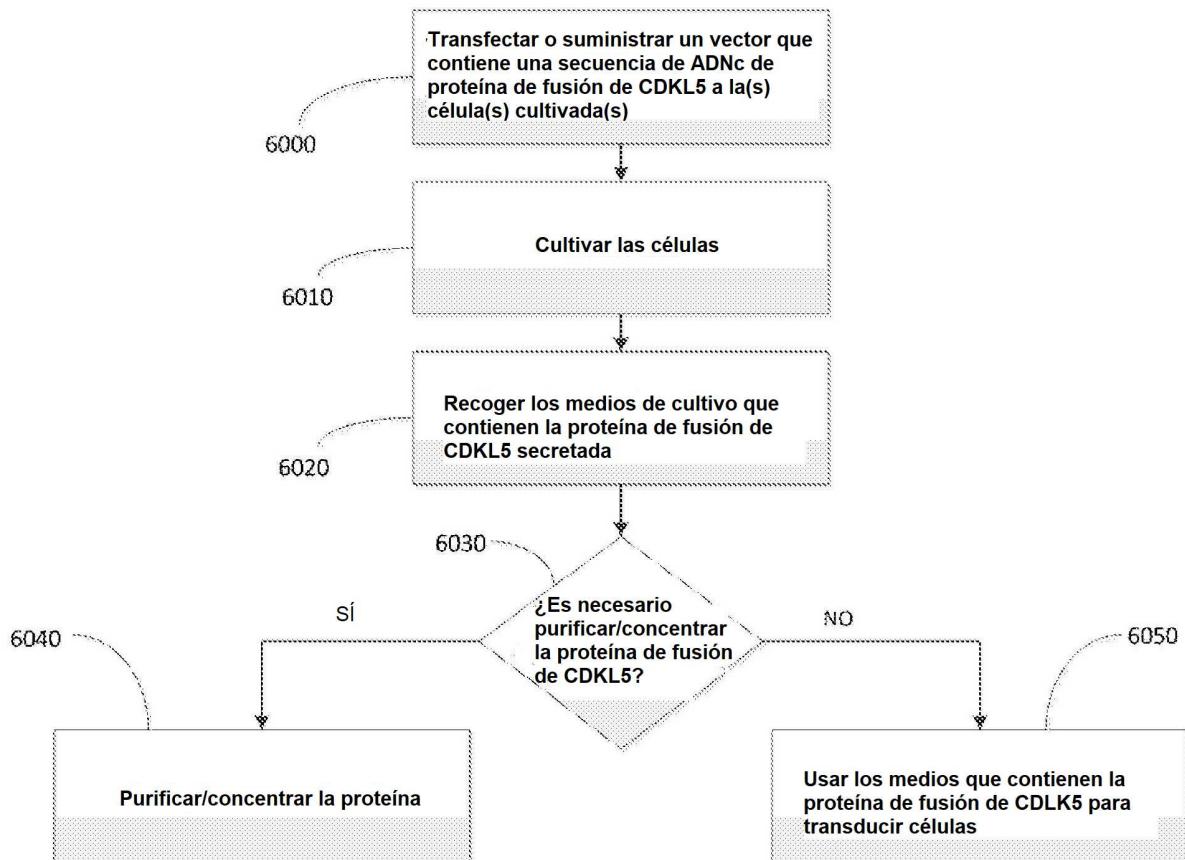


Fig. 1

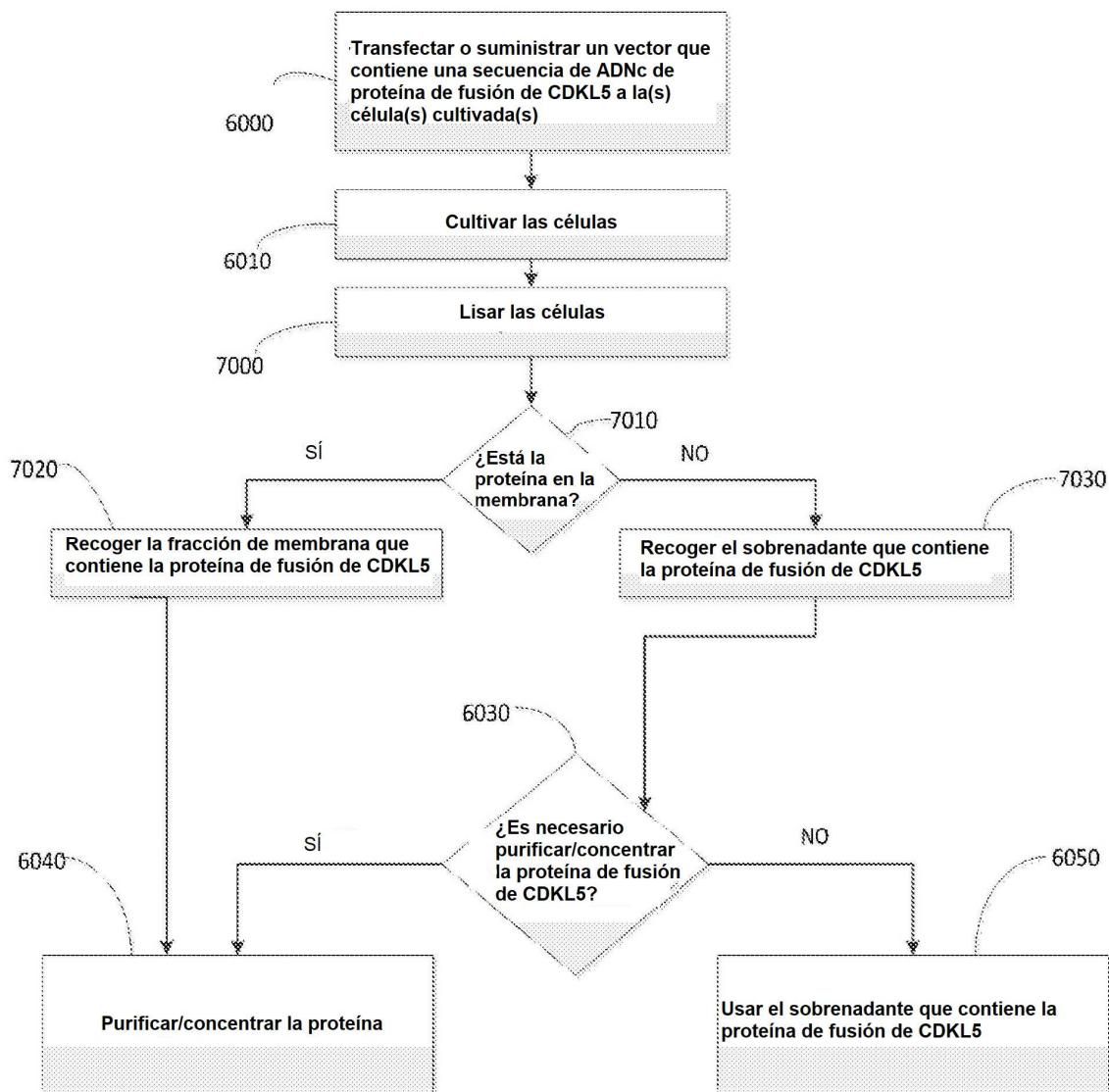


Fig. 2

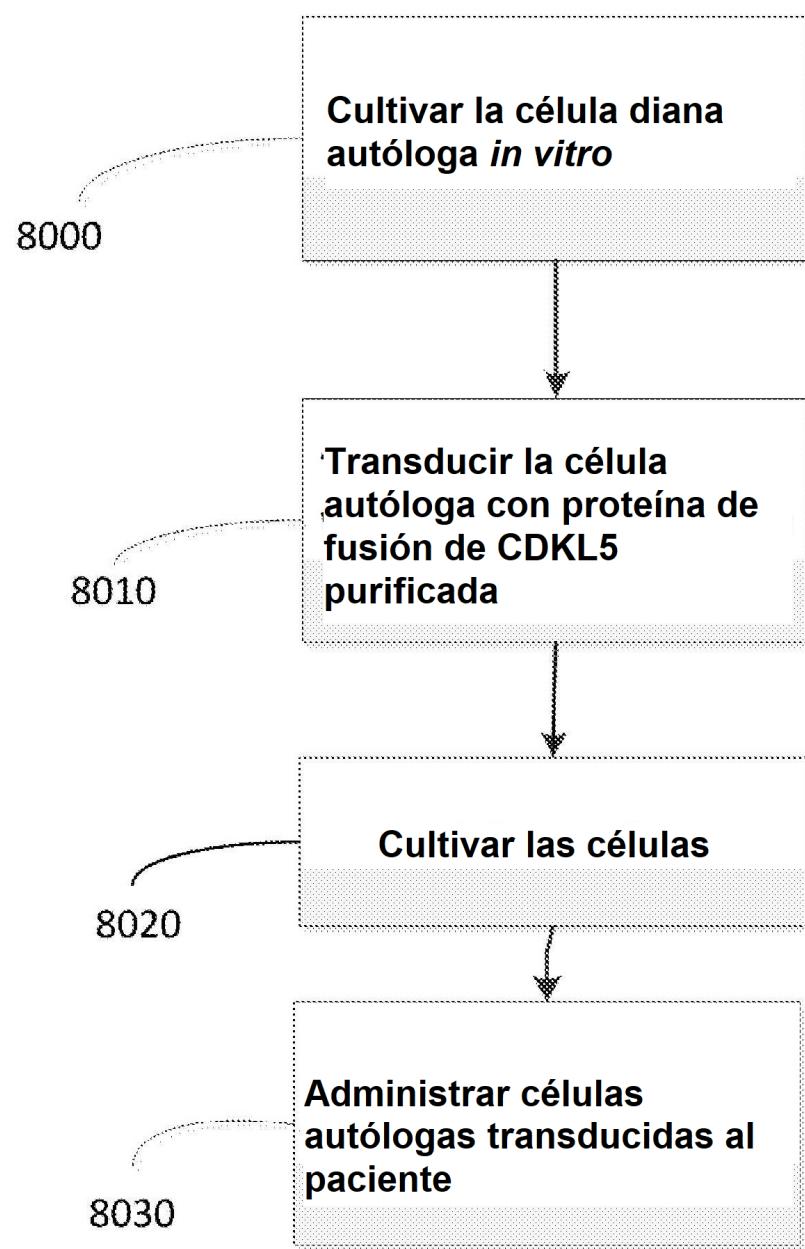


Fig. 3

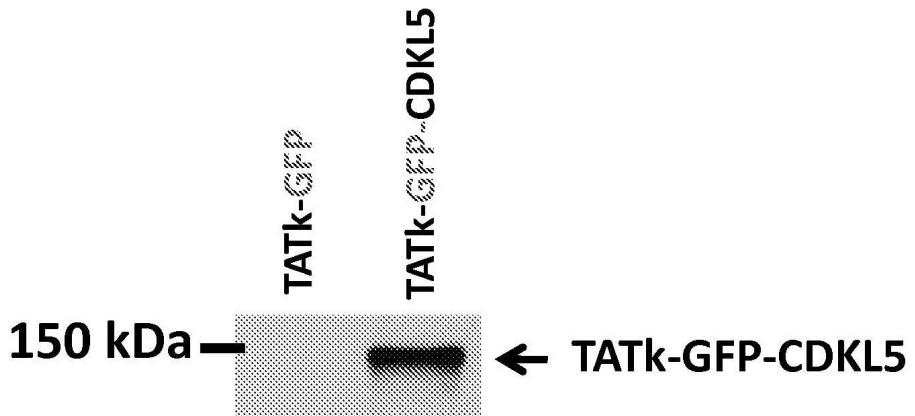


Fig. 4A

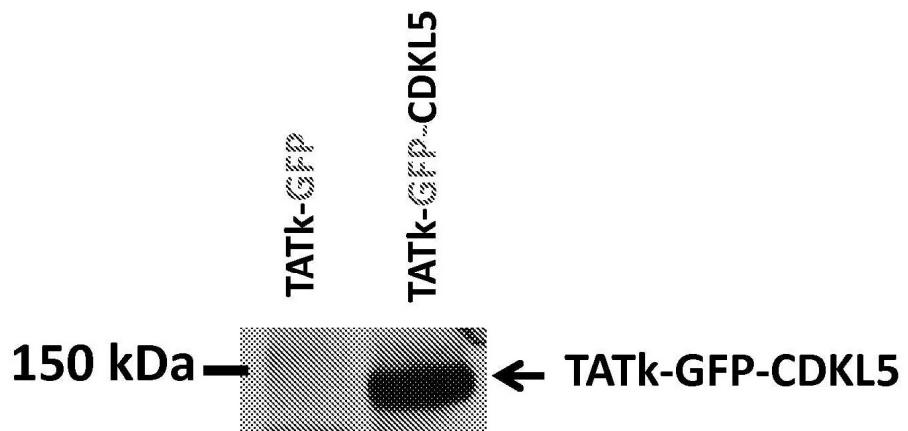
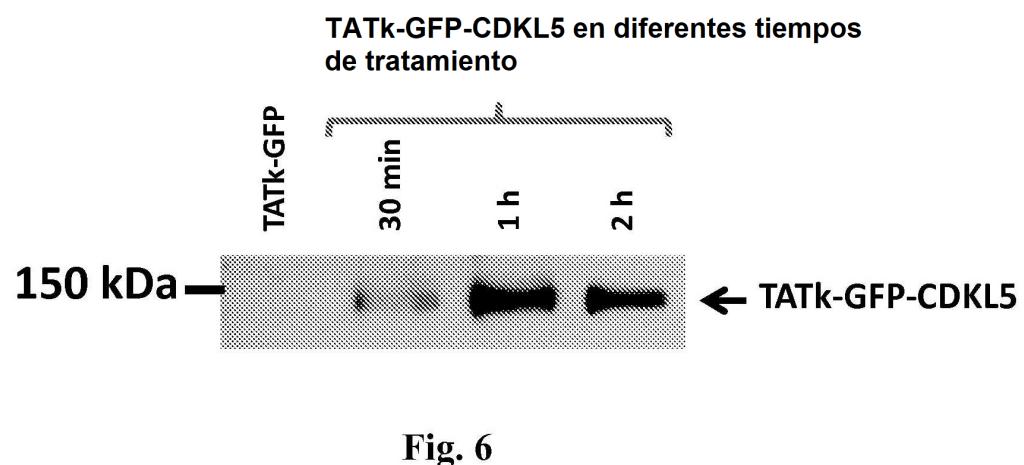
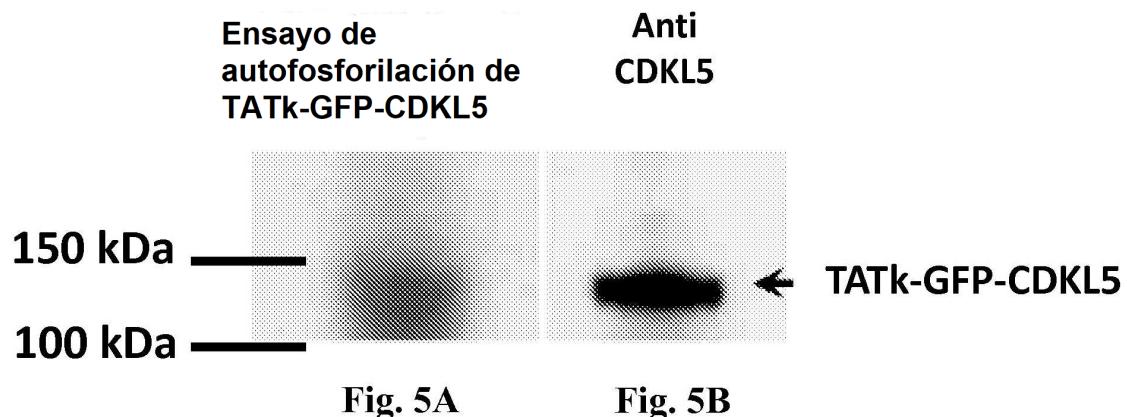
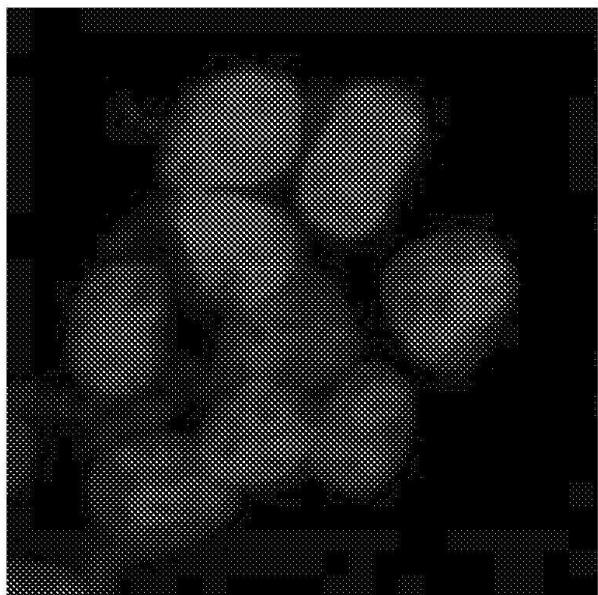


Fig. 4B



293T no tratadas



293T tratadas con
TATk-GFP-CDKL5

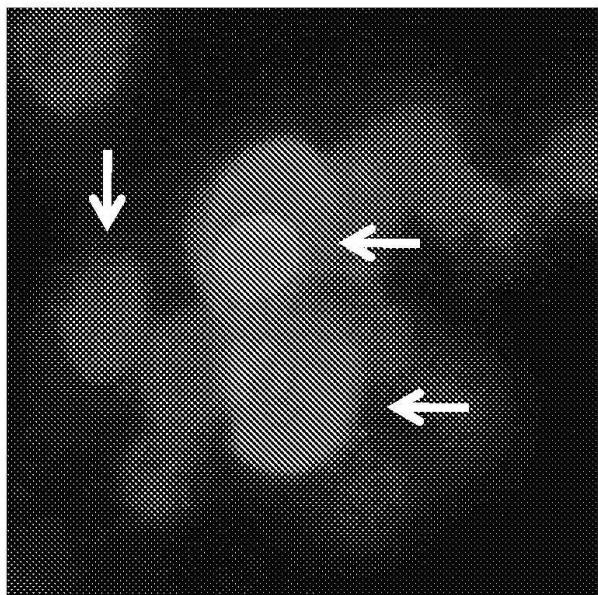


Fig. 7A

Fig. 7B

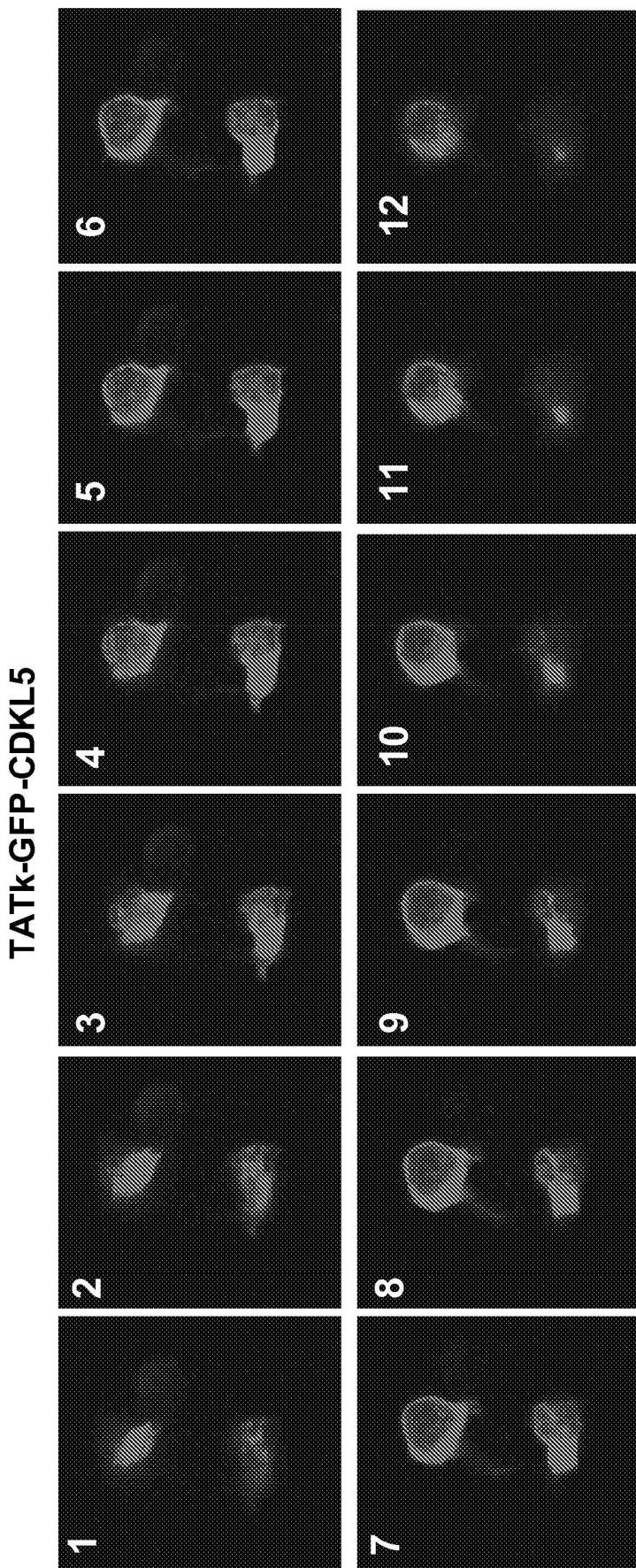


Fig. 8

SH-SY5Y tratadas
con TATk-GFP

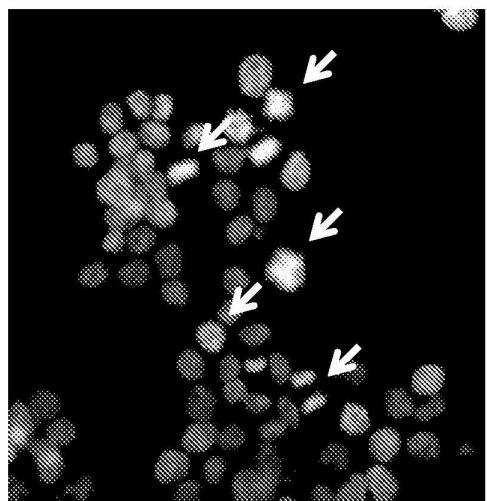


Fig. 9A

SH-SY5Y tratadas con
TATk-GFP-CDKL5

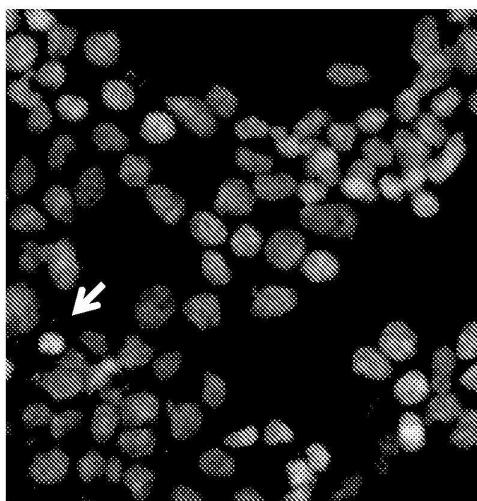


Fig. 9B

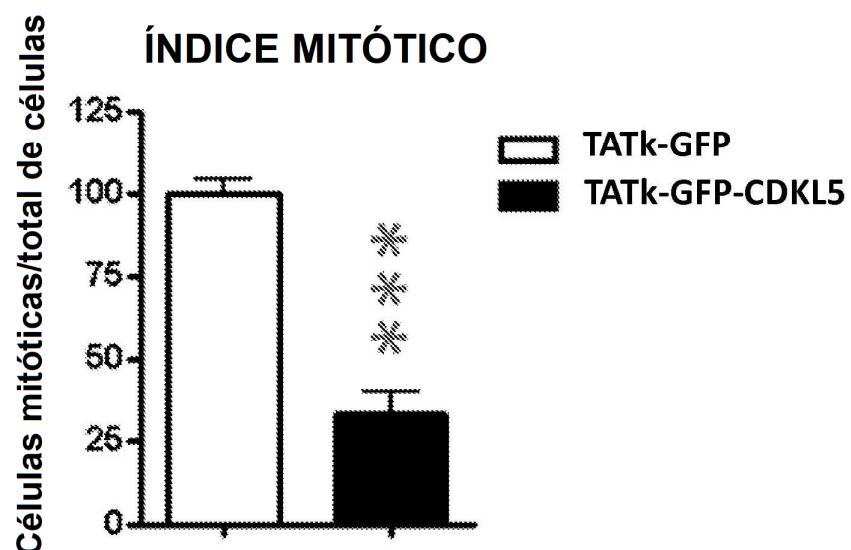


Fig. 10

SH-SY5Y tratadas
con TATk-GFP

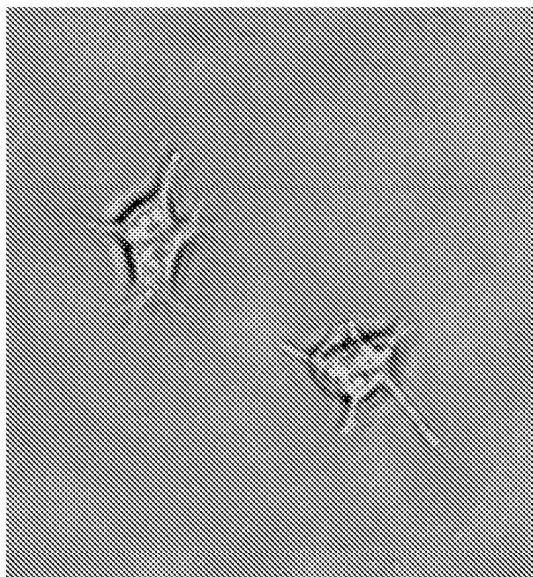


Fig. 11A

SH-SY5Y tratadas con
TATk-GFP-CDKL5

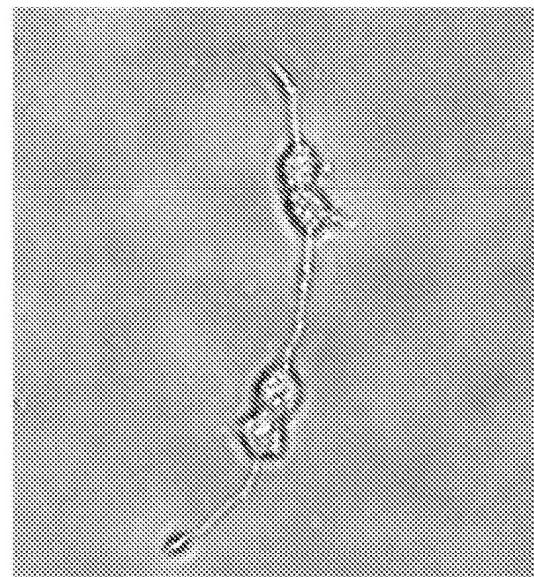


Fig. 11B

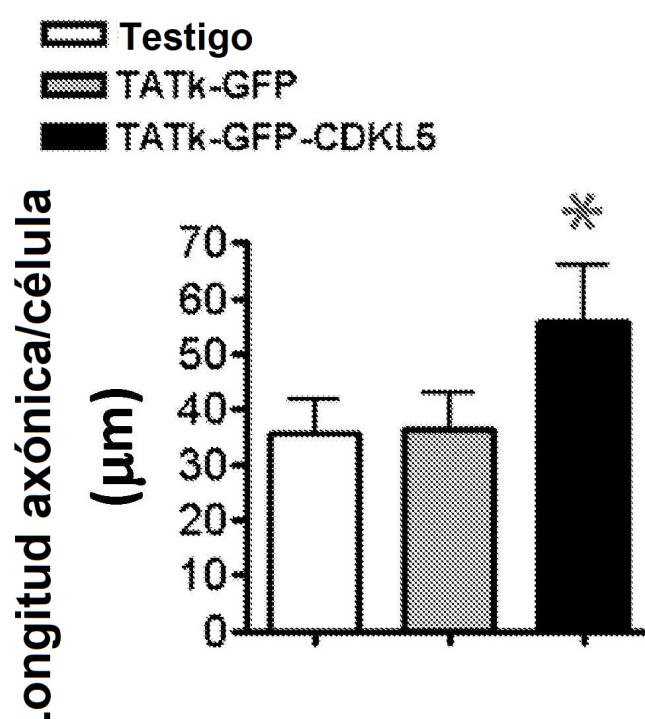


Fig. 12

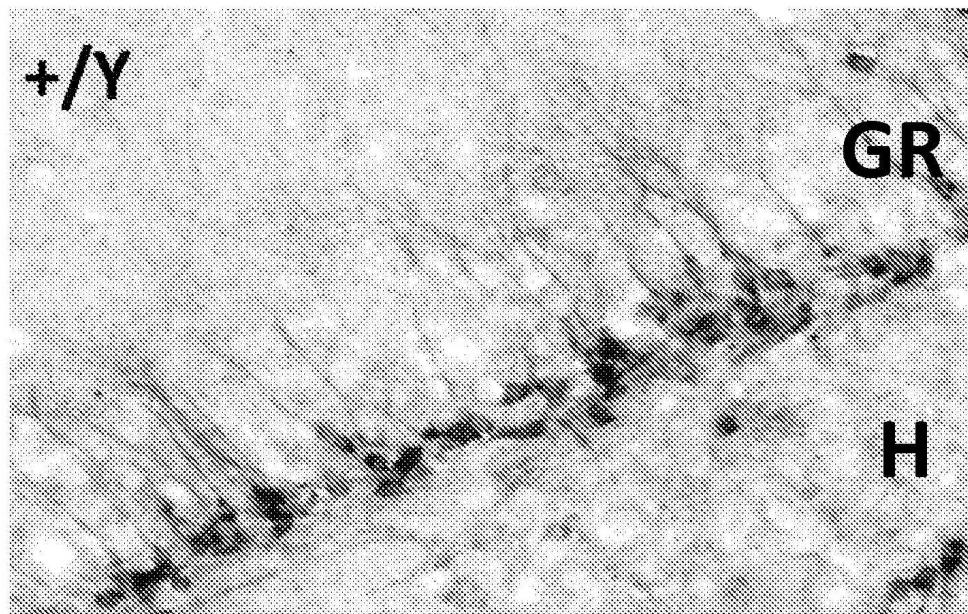


Fig. 13A

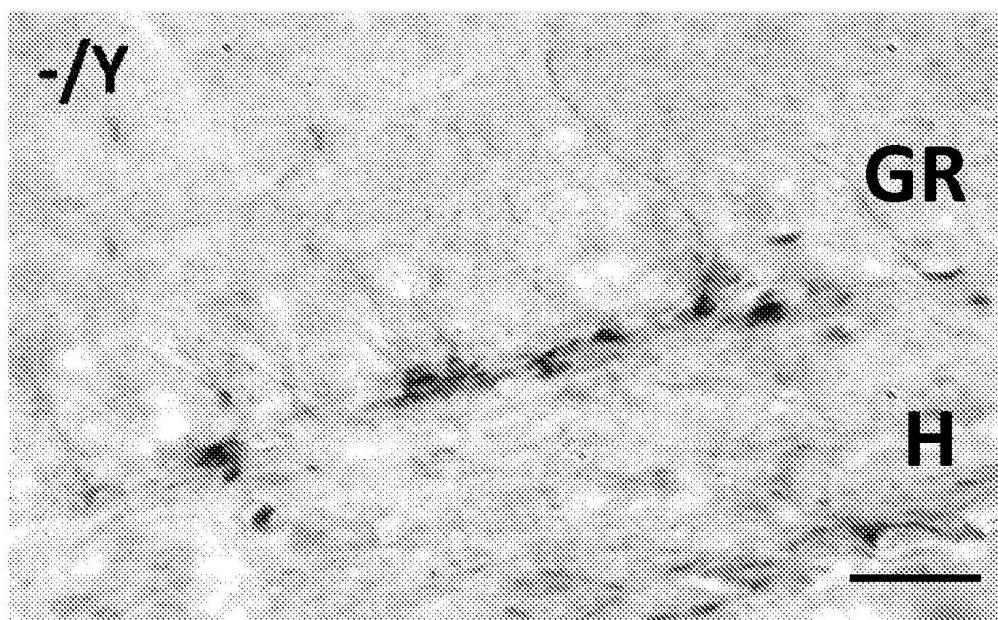


Fig. 13B

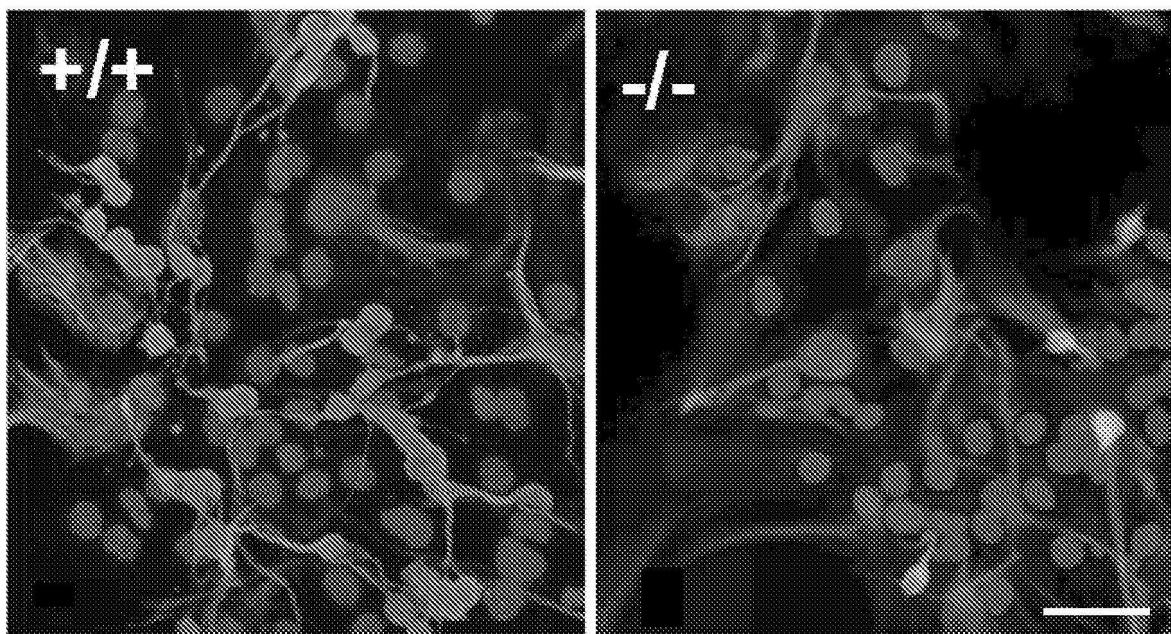


Fig. 14A

Fig. 14B

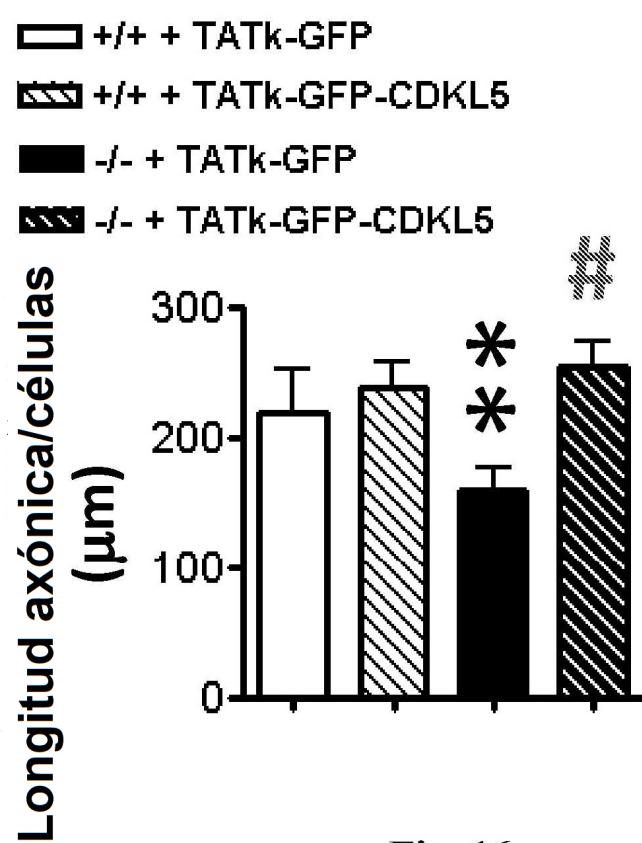
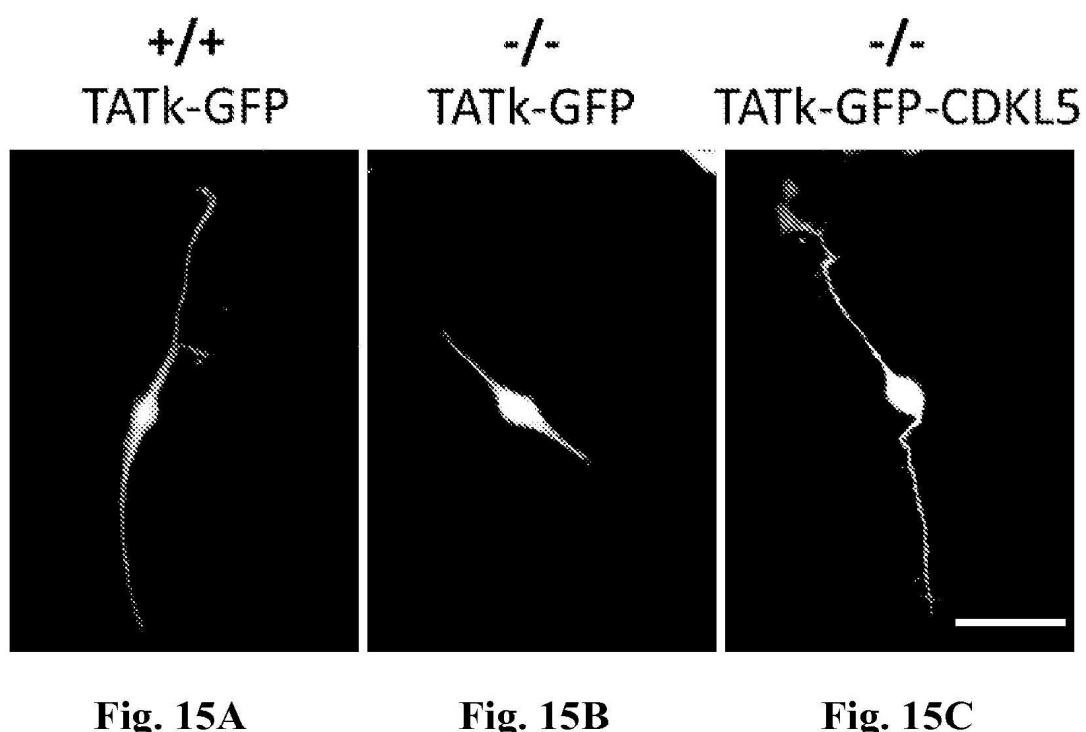


Fig. 16

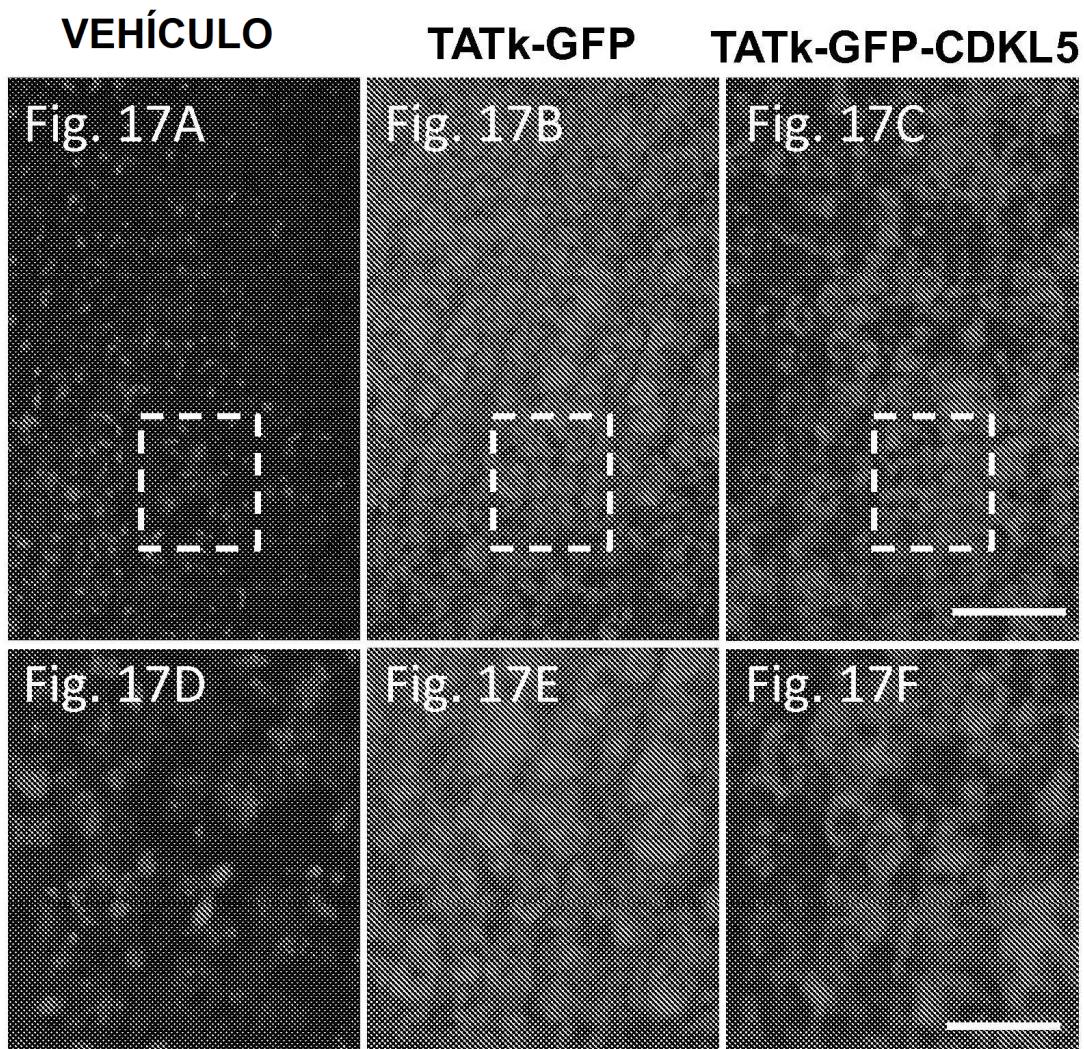


Fig. 17A-F

VEHÍCULO

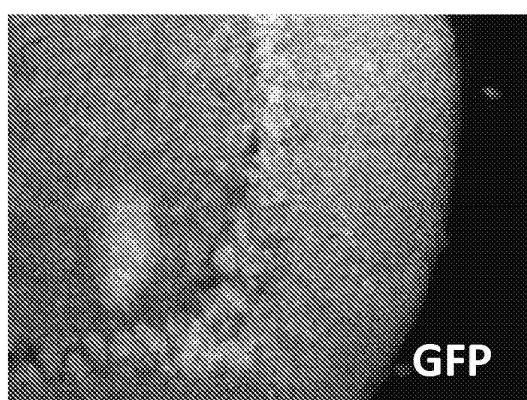


Fig. 18A

PL

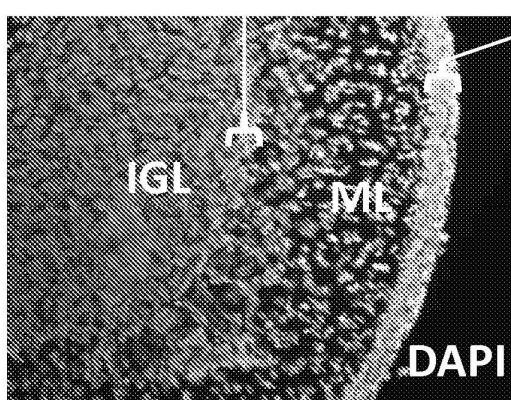


Fig. 18B

TATk-GFP-CDKL5

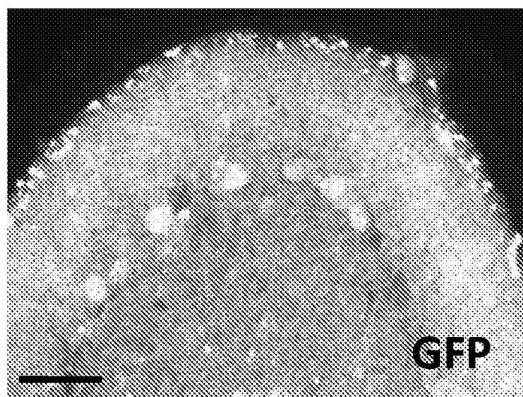


Fig. 18C

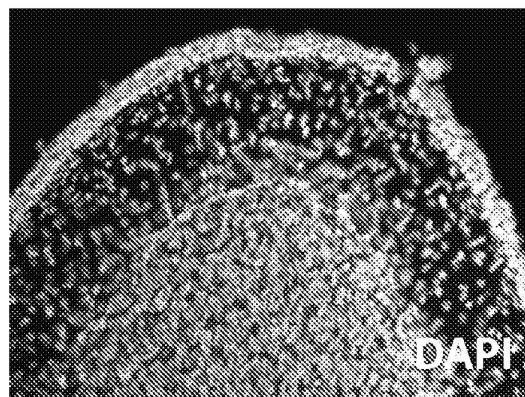
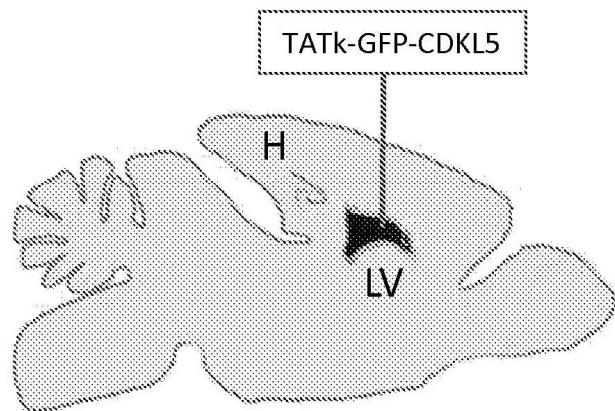


Fig. 18D

INYECCIÓN INTRAVENTRICULAR



LV: Ventrículo lateral H: Hipocampo

Fig. 19

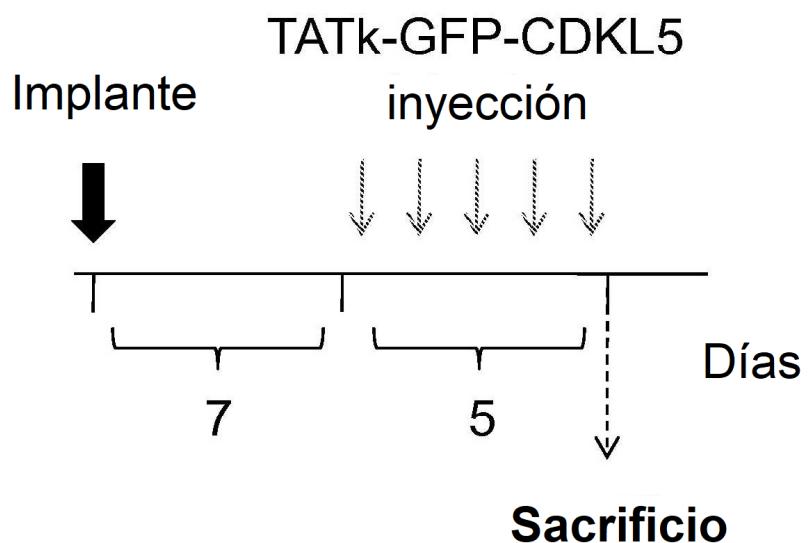


Fig. 20

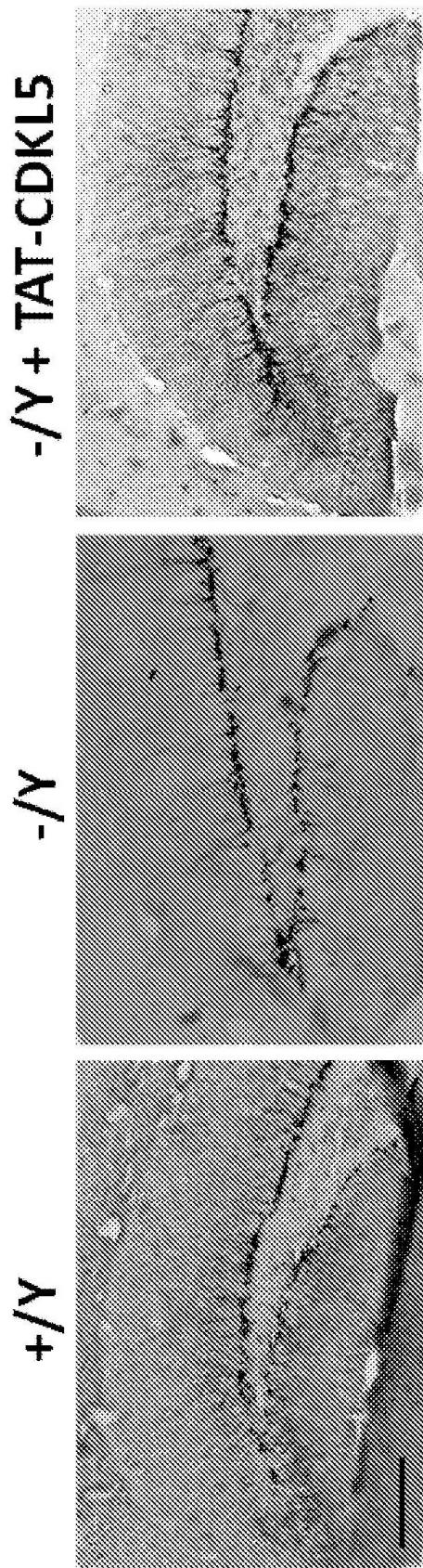


Fig. 21A

Fig. 21B

Fig. 21C

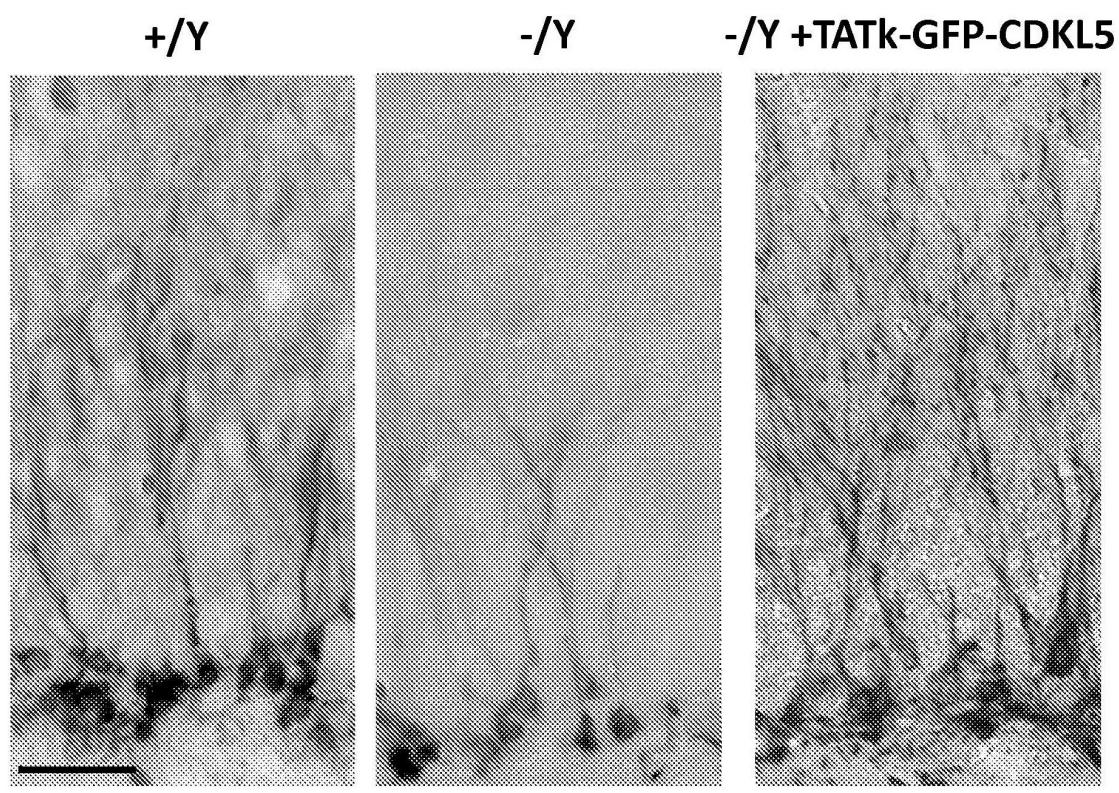
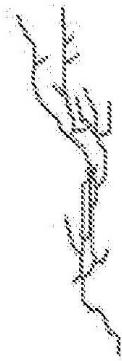


Fig. 22A

Fig. 22B

Fig. 22C

+/Y



-/Y



-/Y + TATk-GFP-CDKL5

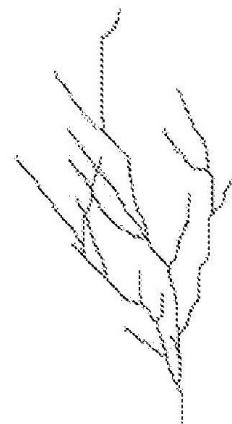
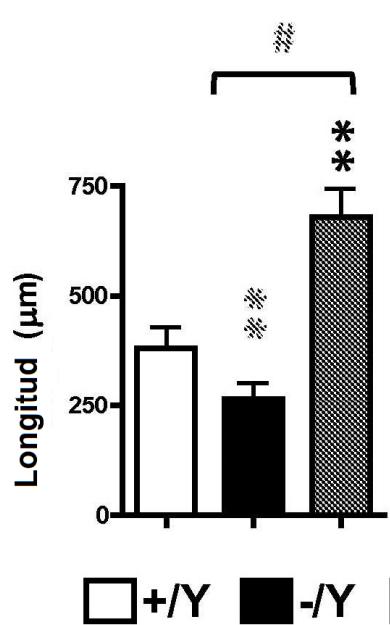


Fig. 23A

Fig. 23B

Fig. 23C

Longitud total



Número de segmentos

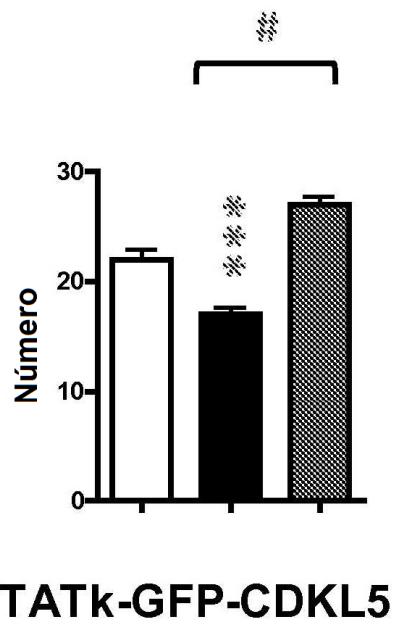


Fig. 24A

Fig. 24B

+/Y -/Y -/Y + TATk-GFP-CDKL5

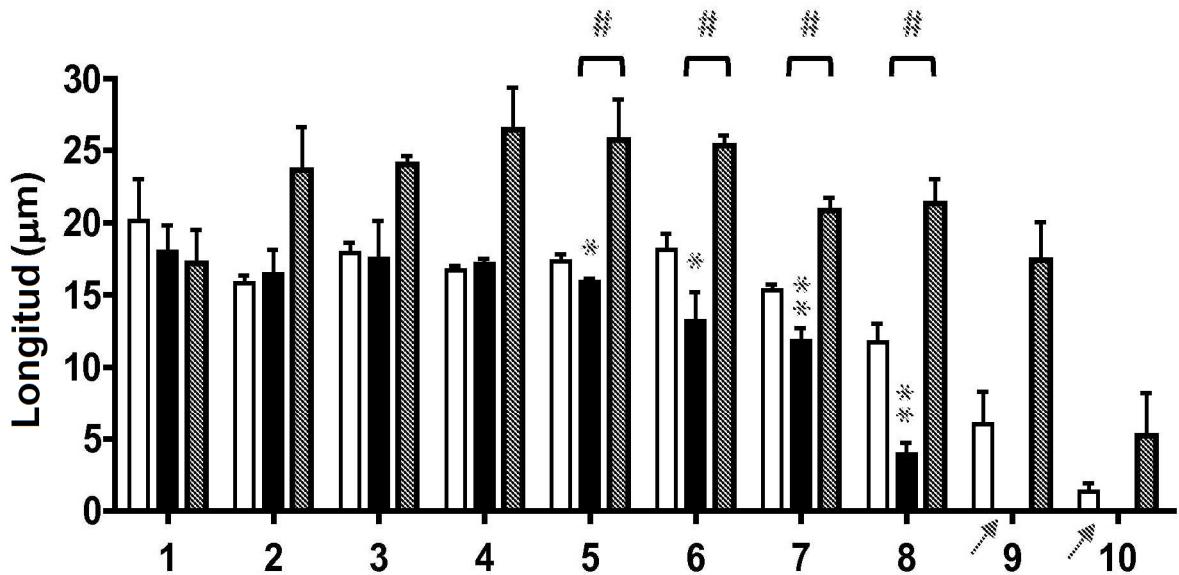


Fig. 25A

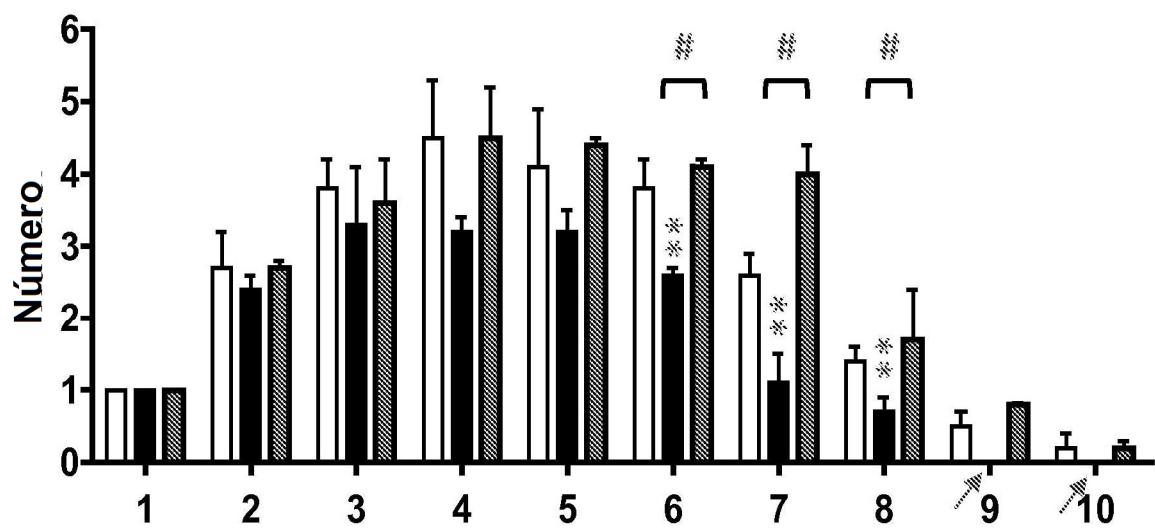


Fig. 25B

□+/Y ■-/Y ▨-/Y + TATk-GFP-CDKL5

Células positivas para Caspasa 3 escindida

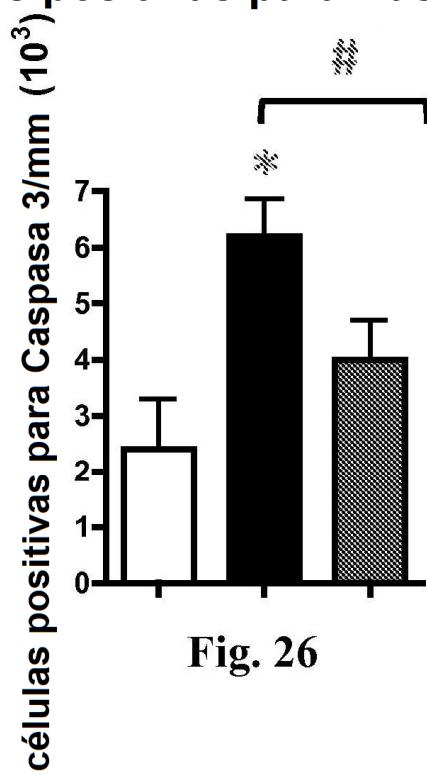


Fig. 26

Células positivas para DCX

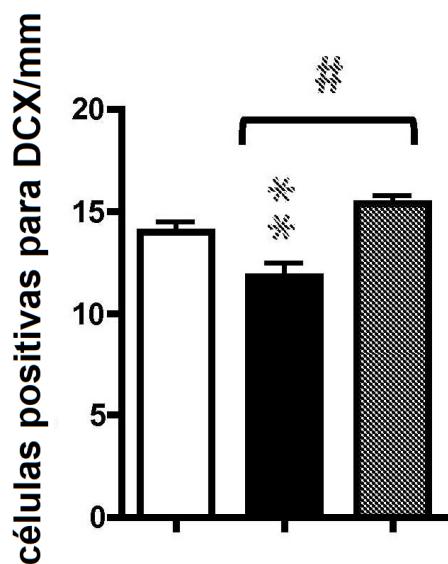


Fig. 27

SYN

+/Y

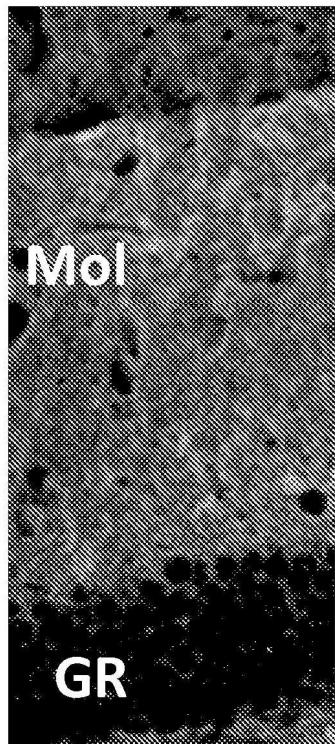


Fig. 28A

-/Y

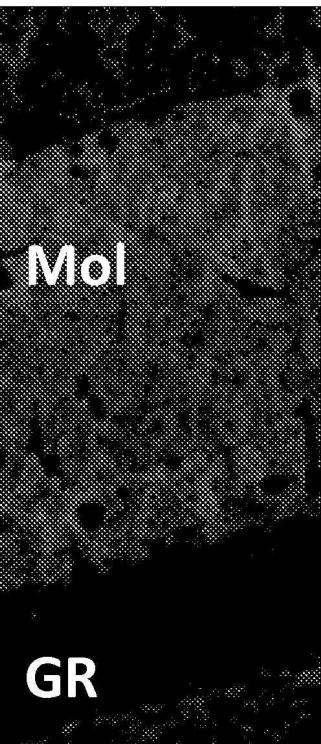


Fig. 28B

-/Y + TATk-GFP-CDKL5

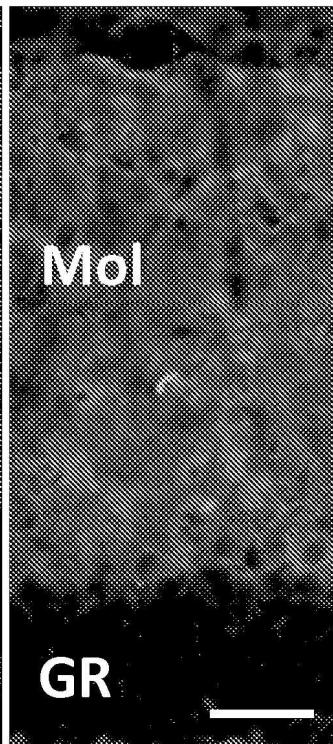


Fig. 28C

P-AKT

+/ γ

-/ γ

-/ γ + TATk-GFP-CDKL5

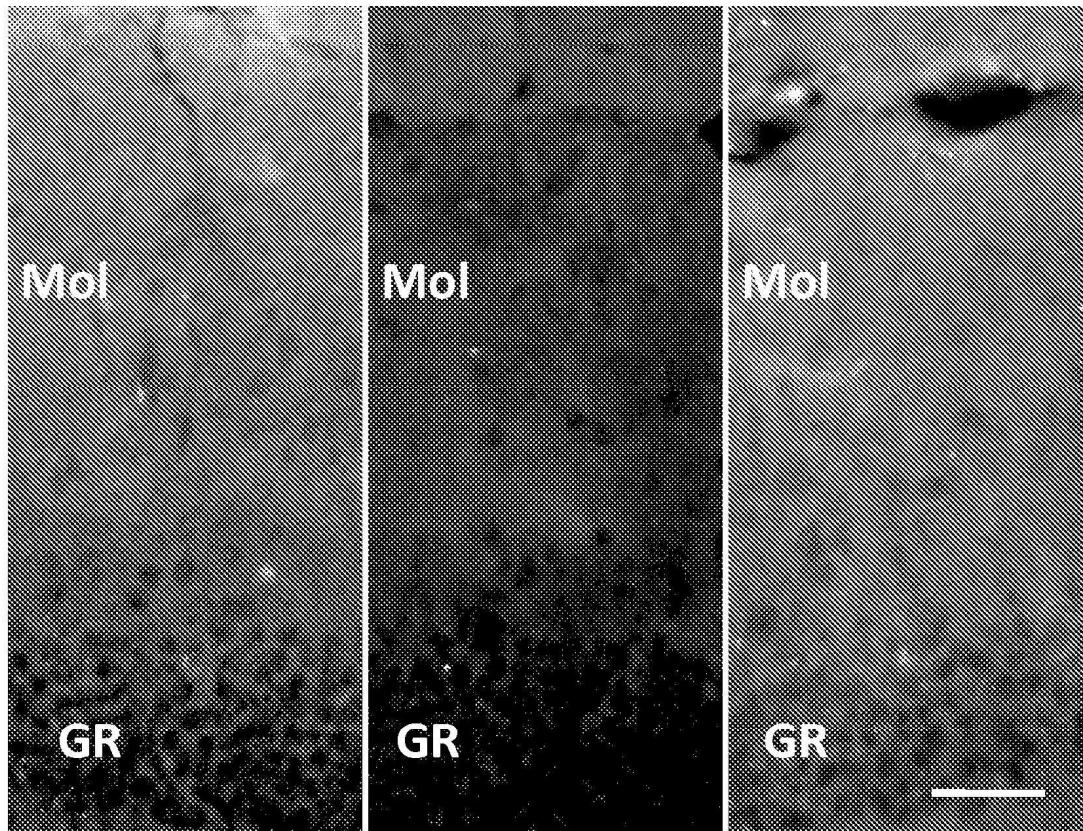


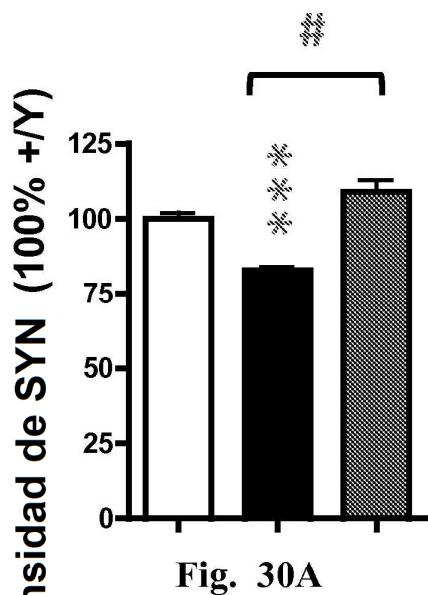
Fig. 29A

Fig. 29B

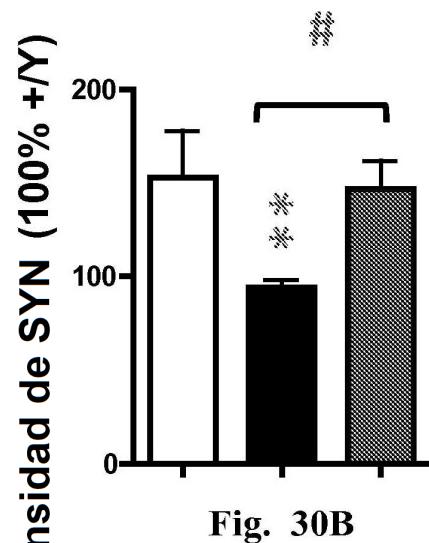
Fig. 29C

□ +/Y ■ -/Y ■ -/Y + TATk-GFP-CDKL5

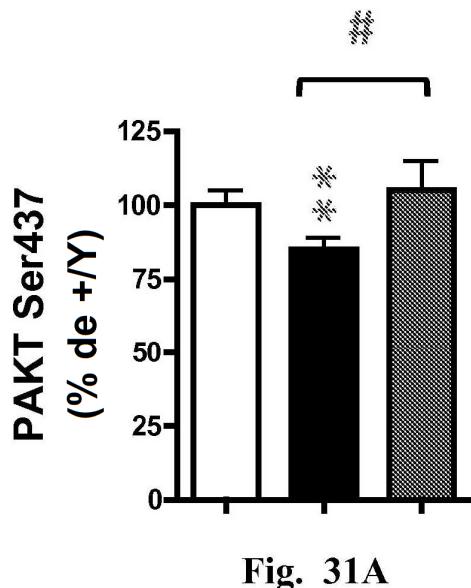
Hipocampo (capa molecular)



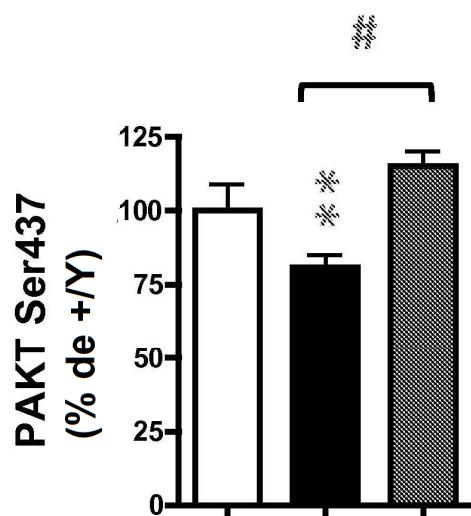
Corteza (capa III)



Hipocampo (capa molecular)



Corteza (capa V)



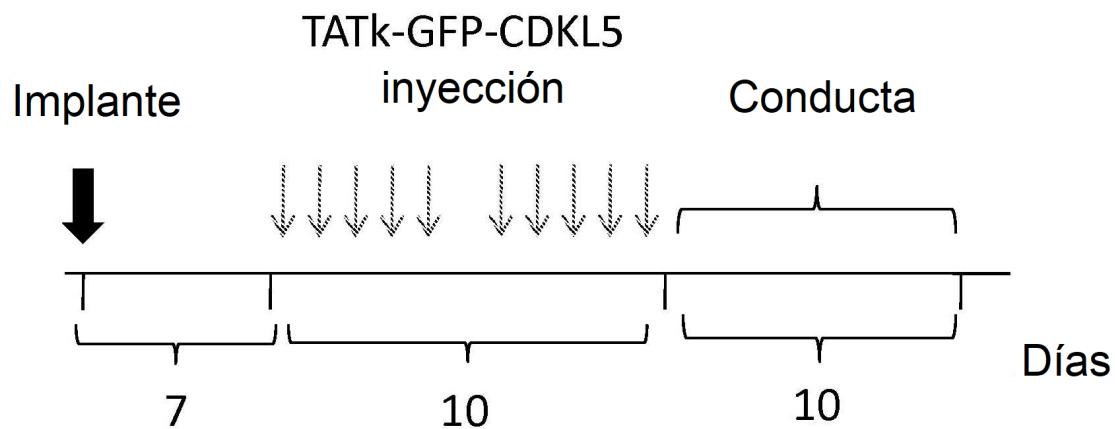
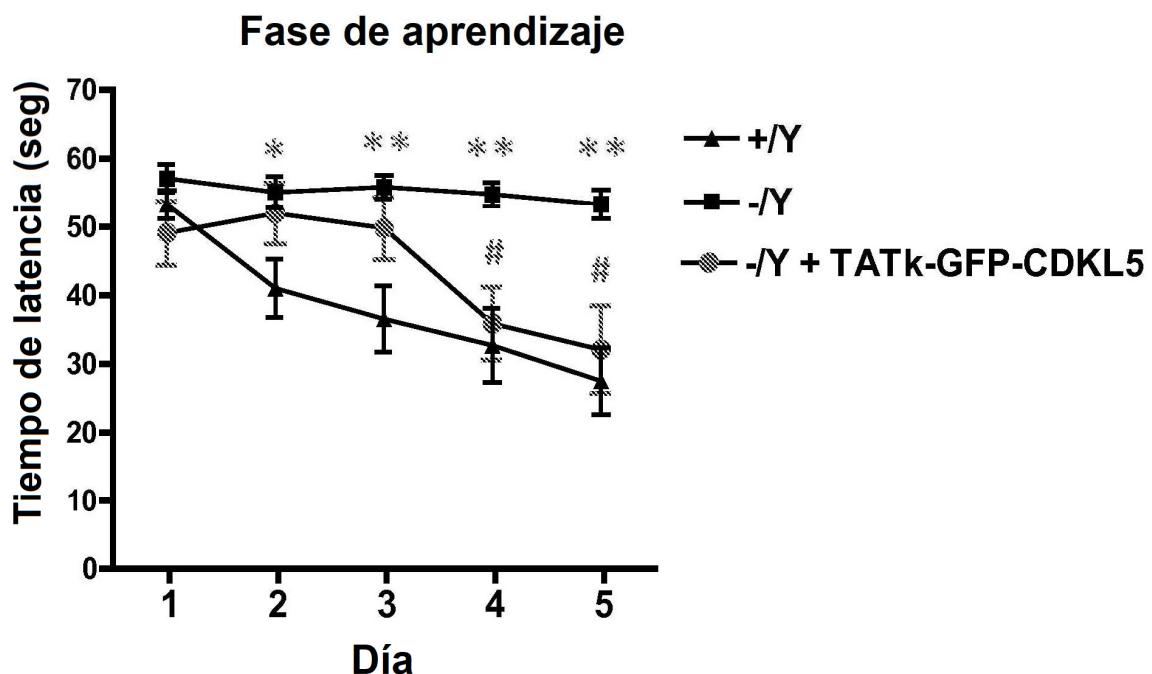
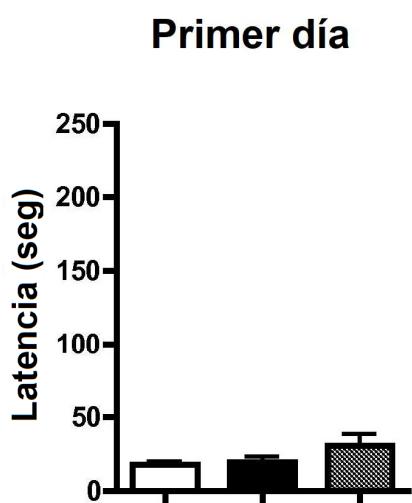
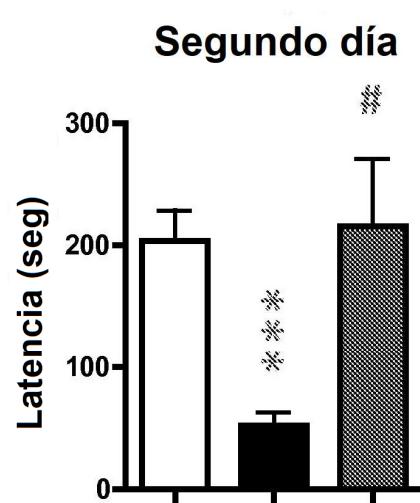


Fig. 32

Prueba de laberinto de agua de Morris**Fig. 33****Prueba de evitación pasiva**

□ +/Y ■ -/Y ▨ -/Y + TATk-GFP-CDKL5

**Fig. 34A****Fig. 34B**

Prueba de agarre de extremidad posterior

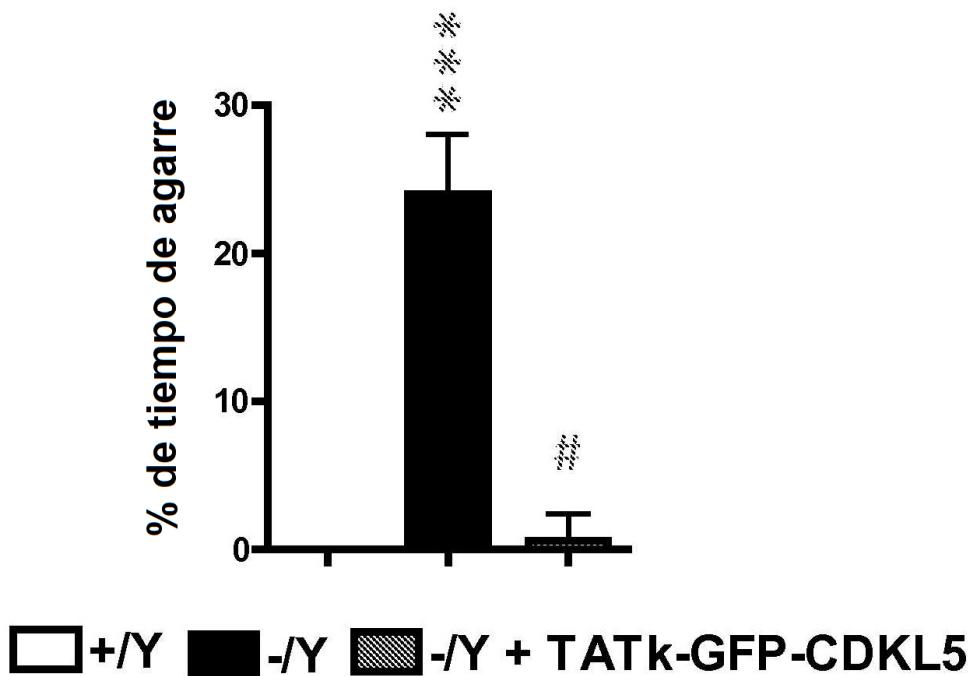


Fig. 35A

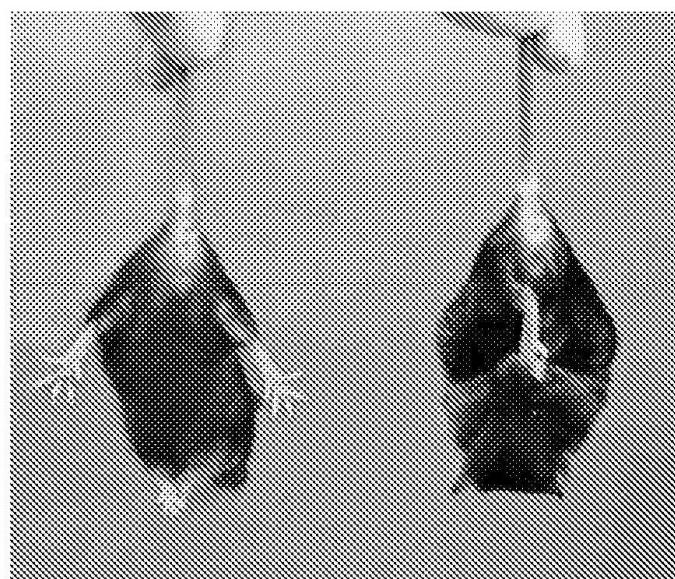


Fig. 35B

Pesos corporales de grupos experimentales

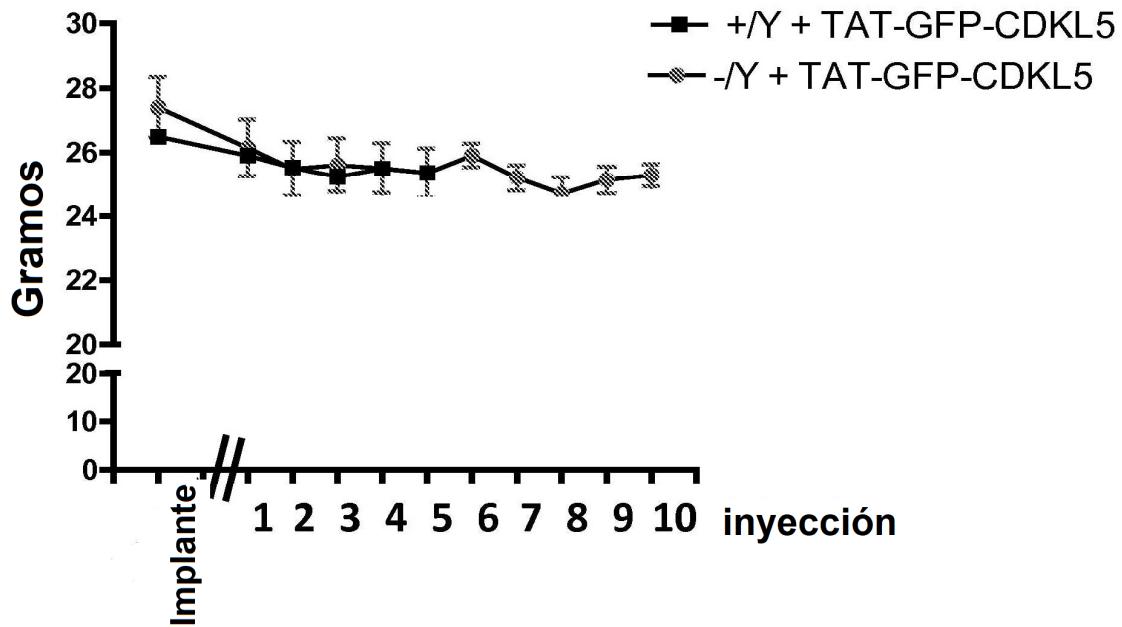


Fig. 36