



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 981 970**

⑮ Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)

A01K 67/027 (2014.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.04.2018 PCT/US2018/025940**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2018 WO18187363**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2018 E 18781685 (5)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2024 EP 3607073**

⑮ Título: **Expresión transgénica selectiva de tejidos**

⑩ Prioridad:

03.04.2017 US 201762480998 P

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.10.2024

⑮ Titular/es:

ENCODED THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
341 Oyster Point Boulevard
South San Francisco, CA 94080, US

⑮ Inventor/es:

TAGLIATELA, STEPHANIE;
YOUNG, ANDREW;
CHEN, SZU-YING;
RAMAMOORTHI, KARTIK y
OBERKOFLER, DAVID

⑮ Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 981 970 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

Expresión transgénica selectiva de tejidos

5 ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN

10 [0001] La terapia génica ha sido reconocida desde hace mucho tiempo por su enorme potencial en la forma en que abordamos y tratamos las enfermedades humanas. En lugar de depender de medicamentos o cirugía, los pacientes, especialmente aquellos con factores genéticos subyacentes, pueden ser tratados atacando directamente la causa subyacente. Además, al atacar la causa genética subyacente, la terapia génica tiene el potencial de curar eficazmente a los pacientes o proporcionar un tratamiento sostenido durante un período de tiempo más largo. Sin embargo, a pesar de esto, las aplicaciones clínicas de la terapia génica aún requieren mejoras en varios aspectos. Un área de preocupación son los efectos fuera del objetivo. Un enfoque atractivo para abordar los efectos no deseados es dirigir la expresión génica de la terapia génica a los tipos de células o tejidos de interés, o los tipos de células o tejidos objetivo. Como tal, existe la necesidad de identificar elementos y métodos de uso de los mismos para dirigir la terapia génica o la expresión génica a un tejido o tipo de célula de interés.

20 [0002] El documento WO 2012/087983 se refiere a ARN largos no codificantes (ARNInc) asociados a Polycomb, bibliotecas y fragmentos de esos ARNnc, ácidos nucleicos inhibidores y métodos y composiciones para dirigirse a ARNInc. El documento WO 2007/078599 se refiere a composiciones, kits, ensamblajes, bibliotecas, matrices y métodos de alto rendimiento para la caracterización estructural y funcional a gran escala de elementos reguladores de la expresión génica en un genoma de un organismo, especialmente en un genoma humano.

RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

25 [0003] La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

30 [0004] Existe una necesidad considerable de dirigir la terapia génica y la expresión génica/transgénica de la misma al tejido y/o tipo de célula deseado *in vivo*, lo que puede disminuir los efectos fuera del objetivo, aumentar la eficacia terapéutica en el tejido y/o tipo de célula objetivo y aumentar la seguridad y la tolerancia del paciente al reducir la dosis efectiva necesaria para lograr la eficacia.

35 [0005] En este documento, se proporcionan composiciones y métodos para la expresión selectiva de un transgén en un tejido o tipo de célula objetivo sobre uno o más tipos de células o tejidos no objetivo. Las composiciones y métodos para la expresión selectiva de un transgén comprenden uno o más elementos reguladores (ER) que, cuando se unen operativamente a un transgén (por ejemplo, una subunidad de canal iónico o un regulador de neurotransmisor, o una proteína de unión a sintaxina), pueden facilitar o dar como resultado en la expresión selectiva o preferencial del transgén en un tejido o tipo de célula objetivo (por ejemplo, neuronas de parvalbúmina (PV)) en comparación con uno o más tipos de células no objetivo (por ejemplo, células no PV). Los ER pueden ser secuencias que no ocurren naturalmente. Las 40 energías renovables pueden ser elementos reguladores de origen humano. Los ER pueden comprender una secuencia de una especie no humana, como un mono, un perro, un conejo o un ratón. En algunos casos, las composiciones descritas en el presente documento se administran en una célula *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* usando un vector viral y/o partículas virales, tales como virus adenoasociados (AAV) o lentivirus. En algunos casos, las composiciones descritas en el presente documento se administran en una célula como terapia génica. También se contemplan en el presente documento 45 composiciones para uso en el tratamiento de una afección o trastorno neurológico asociado con un defecto genético en el SNC. En algunos casos, el tipo de célula o tejido relevante afectado por el defecto genético es una célula PV. En algunos casos, la afección o enfermedad neurológica es el síndrome de Dravet, la enfermedad de Alzheimer, la epilepsia y/o las convulsiones. En algunos casos, la afección o enfermedad neurológica es un trastorno psiquiátrico (por ejemplo, esquizofrenia, trastorno obsesivo compulsivo, adicción, depresión, ansiedad, psicosis); un trastorno del espectro autista (p. ej., síndrome de X frágil, síndrome de Rett); epilepsia (p. ej., encefalopatía traumática crónica, epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus (GEFS+), encefalopatía epiléptica, epilepsia del lóbulo temporal, epilepsia focal, esclerosis tuberosa); o neurodegeneración (p. ej., enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson). En algunos casos, la 50 afección o enfermedad neurológica es cualquier afección o enfermedad relacionada con convulsiones y/o epilepsia en la que están implicadas las neuronas PV.

55 [0006] La presente invención se refiere a un casete de ácido nucleico que comprende un elemento regulador unido operativamente a un transgén que da como resultado la expresión selectiva en neuronas PV en el SNC sobre una o más células no PV en el SNC. El elemento regulador comprende una secuencia con al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 30. En algunos casos, la identidad de secuencia se determina usando BLAST. En algunos 60 casos, el elemento regulador da como resultado una expresión selectiva del transgén en neuronas PV que es mayor que la expresión del mismo transgén cuando está operativamente unido a un elemento regulador no selectivo, según se mide mediante un ensayo de colocalización. En algunos casos, el elemento regulador no selectivo es un promotor constitutivo. En algunos casos, el elemento regulador no selectivo es cualquiera de CAG, EF1a, SV40, CMV, UBC, PGK y CBA. En algunos casos, el elemento regulador da como resultado la expresión selectiva del transgén en neuronas PV a un nivel que es al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, 65 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 30 veces, al menos 35 veces, al menos 40 veces, al menos 45 veces, al menos 50 veces, al menos 55 veces, al menos 60 veces, al menos 65 veces, al menos 70 veces, al menos 75 veces, al menos 80 veces, al menos 85 veces, al menos 90 veces, al menos 95 veces, al menos 100 veces, al menos 105 veces, al menos 110 veces, al menos 115 veces, al menos 120 veces, al menos 125 veces, al menos 130 veces, al menos 135 veces, al menos 140 veces, al menos 145 veces, al menos 150 veces, al menos 155 veces, al menos 160 veces, al menos 165 veces, al menos 170 veces, al menos 175 veces, al menos 180 veces, al menos 185 veces, al menos 190 veces, al menos 195 veces, al menos 200 veces, al menos 205 veces, al menos 210 veces, al menos 215 veces, al menos 220 veces, al menos 225 veces, al menos 230 veces, al menos 235 veces, al menos 240 veces, al menos 245 veces, al menos 250 veces, al menos 255 veces, al menos 260 veces, al menos 265 veces, al menos 270 veces, al menos 275 veces, al menos 280 veces, al menos 285 veces, al menos 290 veces, al menos 295 veces, al menos 300 veces, al menos 305 veces, al menos 310 veces, al menos 315 veces, al menos 320 veces, al menos 325 veces, al menos 330 veces, al menos 335 veces, al menos 340 veces, al menos 345 veces, al menos 350 veces, al menos 355 veces, al menos 360 veces, al menos 365 veces, al menos 370 veces, al menos 375 veces, al menos 380 veces, al menos 385 veces, al menos 390 veces, al menos 395 veces, al menos 400 veces, al menos 405 veces, al menos 410 veces, al menos 415 veces, al menos 420 veces, al menos 425 veces, al menos 430 veces, al menos 435 veces, al menos 440 veces, al menos 445 veces, al menos 450 veces, al menos 455 veces, al menos 460 veces, al menos 465 veces, al menos 470 veces, al menos 475 veces, al menos 480 veces, al menos 485 veces, al menos 490 veces, al menos 495 veces, al menos 500 veces, al menos 505 veces, al menos 510 veces, al menos 515 veces, al menos 520 veces, al menos 525 veces, al menos 530 veces, al menos 535 veces, al menos 540 veces, al menos 545 veces, al menos 550 veces, al menos 555 veces, al menos 560 veces, al menos 565 veces, al menos 570 veces, al menos 575 veces, al menos 580 veces, al menos 585 veces, al menos 590 veces, al menos 595 veces, al menos 600 veces, al menos 605 veces, al menos 610 veces, al menos 615 veces, al menos 620 veces, al menos 625 veces, al menos 630 veces, al menos 635 veces, al menos 640 veces, al menos 645 veces, al menos 650 veces, al menos 655 veces, al menos 660 veces, al menos 665 veces, al menos 670 veces, al menos 675 veces, al menos 680 veces, al menos 685 veces, al menos 690 veces, al menos 695 veces, al menos 700 veces, al menos 705 veces, al menos 710 veces, al menos 715 veces, al menos 720 veces, al menos 725 veces, al menos 730 veces, al menos 735 veces, al menos 740 veces, al menos 745 veces, al menos 750 veces, al menos 755 veces, al menos 760 veces, al menos 765 veces, al menos 770 veces, al menos 775 veces, al menos 780 veces, al menos 785 veces, al menos 790 veces, al menos 795 veces, al menos 800 veces, al menos 805 veces, al menos 810 veces, al menos 815 veces, al menos 820 veces, al menos 825 veces, al menos 830 veces, al menos 835 veces, al menos 840 veces, al menos 845 veces, al menos 850 veces, al menos 855 veces, al menos 860 veces, al menos 865 veces, al menos 870 veces, al menos 875 veces, al menos 880 veces, al menos 885 veces, al menos 890 veces, al menos 895 veces, al menos 900 veces, al menos 905 veces, al menos 910 veces, al menos 915 veces, al menos 920 veces, al menos 925 veces, al menos 930 veces, al menos 935 veces, al menos 940 veces, al menos 945 veces, al menos 950 veces, al menos 955 veces, al menos 960 veces, al menos 965 veces, al menos 970 veces, al menos 975 veces, al menos 980 veces, al menos 985 veces, al menos 990 veces, al menos 995 veces, al menos 1000 veces, al menos 1005 veces, al menos 1010 veces, al menos 1015 veces, al menos 1020 veces, al menos 1025 veces, al menos 1030 veces, al menos 1035 veces, al menos 1040 veces, al menos 1045 veces, al menos 1050 veces, al menos 1055 veces, al menos 1060 veces, al menos 1065 veces, al menos 1070 veces, al menos 1075 veces, al menos 1080 veces, al menos 1085 veces, al menos 1090 veces, al menos 1095 veces, al menos 1100 veces, al menos 1105 veces, al menos 1110 veces, al menos 1115 veces, al menos 1120 veces, al menos 1125 veces, al menos 1130 veces, al menos 1135 veces, al menos 1140 veces, al menos 1145 veces, al menos 1150 veces, al menos 1155 veces, al menos 1160 veces, al menos 1165 veces, al menos 1170 veces, al menos 1175 veces, al menos 1180 veces, al menos 1185 veces, al menos 1190 veces, al menos 1195 veces, al menos 1200 veces, al menos 1205 veces, al menos 1210 veces, al menos 1215 veces, al menos 1220 veces, al menos 1225 veces, al menos 1230 veces, al menos 1235 veces, al menos 1240 veces, al menos 1245 veces, al menos 1250 veces, al menos 1255 veces, al menos 1260 veces, al menos 1265 veces, al menos 1270 veces, al menos 1275 veces, al menos 1280 veces, al menos 1285 veces, al menos 1290 veces, al menos 1295 veces, al menos 1300 veces, al menos 1305 veces, al menos 1310 veces, al menos 1315 veces, al menos 1320 veces, al menos 1325 veces, al menos 1330 veces, al menos 1335 veces, al menos 1340 veces, al menos 1345 veces, al menos 1350 veces, al menos 1355 veces, al menos 1360 veces, al menos 1365 veces, al menos 1370 veces, al menos 1375 veces, al menos 1380 veces, al menos 1385 veces, al menos 1390 veces, al menos 1395 veces, al menos 1400 veces, al menos 1405 veces, al menos 1410 veces, al menos 1415 veces, al menos 1420 veces, al menos 1425 veces, al menos 1430 veces, al menos 1435 veces, al menos 1440 veces, al menos 1445 veces, al menos 1450 veces, al menos 1455 veces, al menos 1460 veces, al menos 1465 veces, al menos 1470 veces, al menos 1475 veces, al menos 1480 veces, al menos 1485 veces, al menos 1490 veces, al menos 1495 veces, al menos 1500 veces, al menos 1505 veces, al menos 1510 veces, al menos 1515 veces, al menos 1520 veces, al menos 1525 veces, al menos 1530 veces, al menos 1535 veces, al menos 1540 veces, al menos 1545 veces, al menos 1550 veces, al menos 1555 veces, al menos 1560 veces, al menos 1565 veces, al menos 1570 veces, al menos 1575 veces, al menos 1580 veces, al menos 1585 veces, al menos 1590 veces, al menos 1595 veces, al menos 1600 veces, al menos 1605 veces, al menos 1610 veces, al menos 1615 veces, al menos 1620 veces, al menos 1625 veces, al menos 1630 veces, al menos 1635 veces, al menos 1640 veces, al menos 1645 veces, al menos 1650 veces, al menos 1655 veces, al menos 1660 veces, al menos 1665 veces, al menos 1670 veces, al menos 1675 veces, al menos 1680 veces, al menos 1685 veces, al menos 1690 veces, al menos 1695 veces, al menos 1700 veces, al menos 1705 veces, al menos 1710 veces, al menos 1715 veces, al menos 1720 veces, al menos 1725 veces, al menos 1730 veces, al menos 1735 veces, al menos 1740 veces, al menos 1745 veces, al menos 1750 veces, al menos 1755 veces, al menos 1760 veces, al menos 1765 veces, al menos 1770 veces, al menos 1775 veces, al menos 1780 veces, al menos 1785 veces, al menos 1790 veces, al menos 1795 veces, al menos 1800 veces, al menos 1805 veces, al menos 1810 veces, al menos 1815 veces, al menos 1820 veces, al menos 1825 veces, al menos 1830 veces, al menos 1835 veces, al menos 1840 veces, al menos 1845 veces, al menos 1850 veces, al menos 1855 veces, al menos 1860 veces, al menos 1865 veces, al menos 1870 veces, al menos 1875 veces, al menos 1880 veces, al menos 1885 veces, al menos 1890 veces, al menos 1895 veces, al menos 1900 veces, al menos 1905 veces, al menos 1910 veces, al menos 1915 veces, al menos 1920 veces, al menos 1925 veces, al menos 1930 veces, al menos 1935 veces, al menos 1940 veces, al menos 1945 veces, al menos 1950 veces, al menos 1955 veces, al menos 1960 veces, al menos 1965 veces, al menos 1970 veces, al menos 1975 veces, al menos 1980 veces, al menos 1985 veces, al menos 1990 veces, al menos 1995 veces, al menos 2000 veces, al menos 2005 veces, al menos 2010 veces, al menos 2015 veces, al menos 2020 veces, al menos 2025 veces, al menos 2030 veces, al menos 2035 veces, al menos 2040 veces, al menos 2045 veces, al menos 2050 veces, al menos 2055 veces, al menos 2060 veces, al menos 2065 veces, al menos 2070 veces, al menos 2075 veces, al menos 2080 veces, al menos 2085 veces, al menos 2090 veces, al menos 2095 veces, al menos 2100 veces, al menos 2105 veces, al menos 2110 veces, al menos 2115 veces, al menos 2120 veces, al menos 2125 veces, al menos 2130 veces, al menos 2135 veces, al menos 2140 veces, al menos 2145 veces, al menos 2150 veces, al menos 2155 veces, al menos 2160 veces, al menos 2165 veces, al menos 2170 veces, al menos 2175 veces, al menos 2180 veces, al menos 2185 veces, al menos 2190 veces, al menos 2195 veces, al menos 2200 veces, al menos 2205 veces, al menos 2210 veces, al menos 2215 veces, al menos 2220 veces, al menos 2225 veces, al menos 2230 veces, al menos 2235 veces, al menos 2240 veces, al menos 2245 veces, al menos 2250 veces, al menos 2255 veces, al menos 2260 veces, al menos 2265 veces, al menos 2270 veces, al menos 2275 veces, al menos 2280 veces, al menos 2285 veces, al menos 2290 veces, al menos 2295 veces, al menos 2300 veces, al menos 2305 veces, al menos 2310 veces, al menos 2315 veces, al menos 2320 veces, al menos 2325 veces, al menos 2330 veces, al menos 2335 veces, al menos 2340 veces, al menos 2345 veces, al menos 2350 veces, al menos 2355 veces, al menos 2360 veces, al menos 2365 veces, al menos 2370 veces, al menos 2375 veces, al menos 2380 veces, al menos 2385 veces, al menos 2390 veces, al menos 2395 veces, al menos 2400 veces, al menos 2405 veces, al menos 2410 veces, al menos 2415 veces, al menos 2420 veces, al menos 2425 veces, al menos 2430 veces, al menos 2435 veces, al menos 2440 veces, al menos 2445 veces, al menos 2450 veces, al menos 2455 veces, al menos 2460 veces, al menos 2465 veces, al menos 2470 veces, al menos 2475 veces, al menos 2480 veces, al menos 2485 veces, al menos 2490 veces, al menos 2495 veces, al menos 2500 veces, al menos 2505 veces, al menos 2510 veces, al menos 2515 veces, al menos 2520 veces, al menos 2525 veces, al menos 2530 veces, al menos 2535 veces, al menos 2540 veces, al menos 2545 veces, al menos 2550 veces, al menos 2555 veces, al menos 2560 veces, al menos 2565 veces, al menos 2570 veces, al menos 2575 veces, al menos 2580 veces, al menos 2585 veces, al menos 2590 veces, al menos 2595 veces, al menos 2600 veces, al menos 2605 veces, al menos 2610 veces, al menos 2615 veces, al menos 2620 veces, al menos 2625 veces, al menos 2630 veces, al menos 2635 veces, al menos 2640 veces, al menos 2645 veces, al menos 2650 veces, al menos 2655 veces, al menos 2660 veces, al menos 2665 veces, al menos 2670 veces, al menos 2675 veces, al menos 2680 veces, al menos 2685 veces, al menos 2690 veces, al menos 2695 veces, al menos 2700 veces, al menos 2705 veces, al menos 2710 veces, al menos 2715 veces, al menos 2720 veces, al menos 2725 veces, al menos 2730 veces, al menos 2735 veces, al menos 2740 veces, al menos 2745 veces, al menos 2750 veces, al menos 2755 veces, al menos 2760 veces, al menos 2765 veces, al menos 2770 veces, al menos 2775 veces, al menos 2780 veces, al menos 2785 veces, al menos 2790 veces, al menos 2795 veces, al menos 2800 veces, al menos 2805 veces, al menos 2810 veces, al menos 2815 veces, al menos 2820 veces, al menos 2825 veces, al menos 2830 veces, al menos 2835 veces, al menos 2840 veces, al menos 2845 veces, al menos 2850 veces, al menos 2855 veces, al menos 2860 veces, al menos 2865 veces, al menos 2870 veces, al menos 2875 veces, al menos 2880 veces, al menos 2885 veces, al menos 2890 veces, al menos 2895 veces, al menos 2900 veces, al menos 2905 veces, al menos 2910 veces, al menos 2915 veces, al menos 2920 veces, al menos 2925 veces, al menos 2930 veces, al menos 2935 veces, al menos 2940 veces, al menos 2945 veces, al menos 2950 veces, al menos 2955 veces, al menos 2960 veces, al menos 2965 veces, al menos 2970 veces, al menos 2975 veces, al menos 2980 veces, al menos 2985 veces, al menos 2990 veces, al menos 2995 veces, al menos 3000 veces, al menos 3005 veces, al menos 3010 veces, al menos 3015 veces, al menos 3020 veces, al menos 3025 veces, al menos 3030 veces, al menos 3035 veces, al menos 3040 veces, al menos 3045 veces, al menos 3050 veces, al menos 3055 veces, al menos 3060 veces, al menos 3065 veces, al menos 3070 veces, al menos 3075 veces, al menos 3080 veces, al menos 3085 veces, al menos 3090 veces, al menos 3095 veces, al menos 3100 veces, al menos 3105 veces, al menos 3110 veces, al menos 3115 veces, al menos 3120 veces, al menos 3125 veces, al menos 3130 veces, al menos 3135 veces, al menos 3140 veces, al menos 3145 veces, al menos 3150 veces, al menos 3155 veces, al menos 3160 veces, al menos 3165 veces, al menos 3170 veces, al menos 3175 veces, al menos 3180 veces, al menos 3185 veces, al menos 3190 veces, al menos 3195 veces, al menos 3200 veces, al menos 3205 veces, al menos 3210 veces, al menos 3215 veces, al menos 3220 veces, al menos 3225 veces, al menos 3230 veces, al menos 3235 veces, al menos 3240 veces, al menos 3245 veces, al menos 3250 veces, al menos 3255 veces, al menos 3260 veces, al menos 3265 veces, al menos 3270 veces, al menos 3275 veces, al menos 3280 veces, al menos 3285 veces, al menos 3290 veces, al menos 3295 veces, al menos 3300 veces, al menos 3305 veces, al menos 3310 veces, al menos 3315 veces, al menos 3320 veces, al menos 3325 veces, al menos 3330 veces, al menos 3335 veces, al menos 3340 veces, al menos 3345 veces, al menos 3350 veces, al menos 3355 veces, al menos 3360 veces, al menos 3365 veces, al menos 3370 veces, al menos 3375 veces, al menos 3380 veces, al menos 3385 veces, al menos 3390 veces, al menos 3395 veces, al menos 3400 veces, al menos 3405 veces, al menos 3410 veces, al menos 3415 veces, al menos 3420 veces, al menos 3425 veces, al menos 3430 veces, al menos 3435 veces, al menos 3440 veces, al menos 3445 veces, al menos 3450 veces, al menos 3455 veces, al menos 3460 veces, al menos 3465 veces, al menos 3470 veces, al menos 3475 veces, al menos 3480 veces, al menos 3485 veces, al menos 3490 veces, al menos 3495 veces, al menos 3500 veces, al menos 3505 veces, al menos 3510 veces, al menos 3515 veces, al menos 3520 veces, al menos 3525 veces, al menos 3530 veces, al menos 3535 veces, al menos 3540 veces, al menos 3545 veces, al menos 3550 veces, al menos 3555 veces, al menos 3560 veces, al menos 3565 veces, al menos 3570 veces, al menos 3575 veces, al menos 3580 veces, al menos 3585 veces, al menos 3590 veces, al menos 3595 veces, al menos 3600 veces, al menos 3605 veces, al menos 3610 veces, al menos 3615 veces, al menos 3620 veces, al menos 3625 veces, al menos 3630 veces, al menos 3635 veces, al menos 3640 veces, al menos 3645 veces, al menos 3650 veces, al menos 3655 veces, al menos 3660 veces, al menos 3665 veces, al menos 3670 veces, al menos 3675 veces, al menos 3680 veces, al menos 3685 veces, al menos 3690 veces, al menos 3695 veces, al menos 3700 veces, al menos 3705 veces, al menos 3710 veces, al menos 3715 veces, al menos 3720 veces, al menos 3725 veces, al menos 3730 veces, al menos 3735 veces, al menos 3740 veces, al menos 3745 veces, al menos 3750 veces, al menos 3755 veces, al menos 3760 veces, al menos 3765 veces, al menos 3770 veces, al menos 3775 veces, al menos 3780 veces, al menos 3785 veces, al menos 3790 veces, al menos 3795 veces, al menos 3800 veces, al menos 3805 veces, al menos 3810 veces, al menos 3815 veces, al menos 3820 veces, al menos 3825 veces, al menos 3830 veces, al menos 3835 veces, al menos 3840 veces, al menos 3845 veces, al menos 3850 veces, al menos 3855 veces, al menos 3860 veces, al menos 3865 veces, al menos 3870 veces, al menos 3875 veces, al menos 3880 veces, al menos 3885 veces, al menos 3890 veces, al menos 3895 veces, al menos 3900 veces, al menos 3905 veces, al menos 3910 veces, al menos 3915 veces, al menos 3920 veces, al menos 3925 veces, al menos 3930 veces, al menos 3935 veces, al menos 3940 veces, al menos 3945 veces, al menos 3950 veces, al menos 3955 veces, al menos 3960 veces, al menos 3965 veces, al menos 3970 veces, al menos 3975 veces, al menos 3980 veces, al menos 3985 veces, al menos 3990 veces, al menos 3995 veces, al menos 4000 veces, al menos 4005 veces, al menos 4010 veces, al menos 4015 veces, al menos 4020 veces, al menos 4025 veces, al menos 4030 veces, al menos 4035 veces, al menos 4040 veces, al menos 4045 veces, al menos 4050 veces, al menos 4055 veces, al menos 4060 veces, al menos 4065 veces, al menos 4070 veces, al menos 4075 veces, al menos 4080 veces, al menos 4085 veces, al menos 4090 veces, al menos 4095 veces, al menos 4100 veces, al menos 4105 veces, al menos 4110 veces, al menos 4115 veces, al menos 4120 veces, al menos 4125 veces, al menos 4130 veces, al menos 4135 veces, al menos 4140 veces, al menos 4145 veces, al menos 4150 veces, al menos 4155 veces, al menos 4160 veces, al menos 4165 veces, al menos 4170 veces, al menos 4175 veces, al menos 4180 veces, al menos 4185 veces, al menos 4190 veces, al menos 4195 veces, al menos 4200 veces, al menos 4205 veces, al menos 4210 veces, al menos 4215 veces, al menos 4220 veces, al menos 4225 veces, al menos 4230 veces, al menos 4235 veces, al menos 4240 veces, al menos 4245 veces, al menos 4250 veces, al menos 4255 veces, al menos 4260 veces, al menos 4265 veces, al menos 4270 veces, al menos 4275 veces, al menos 4280 veces, al menos 4285 veces, al menos 4290 veces, al menos 4295 veces, al menos 4300 veces, al menos 4305 veces, al menos 4310 veces, al menos 4315 veces, al menos 4320 veces, al menos 4325 veces, al menos 4330 veces, al menos 4335 veces, al menos 4340 veces, al menos 4345 veces, al menos 4350 veces, al menos 4355 veces, al menos 4360 veces, al menos 4365 veces, al menos 4370 veces, al menos 4375 veces, al menos 4380 veces, al menos 4385 veces, al menos 4390 veces, al menos 4395 veces, al menos 4400 veces, al menos 4405 veces, al menos 4410 veces, al menos 4415 veces, al menos 4420 veces, al menos 4425 veces, al menos 4430 veces, al menos 4435 veces, al menos 4440 veces, al menos 4445 veces, al menos 4450 veces, al menos 4455 veces, al menos 4460 veces, al menos 4465 veces, al menos 4470 veces, al menos 4475 veces, al menos 4480 veces, al menos 4485 veces, al menos 4490 veces, al menos 4495 veces, al menos 4500 veces, al menos 4505 veces, al menos 4510 veces, al menos 4515 veces, al menos 4520 veces, al menos 4525 veces, al menos 4530 veces, al menos 4535 veces, al menos 4540 veces, al menos 4545 veces, al menos 4550 veces, al menos 4555 veces, al menos 4560 veces, al menos 4565 veces, al menos 4570 veces, al menos 4575 veces, al menos 4580 veces, al menos 4585 veces, al menos 4590 veces, al menos 4595 veces, al menos 4600 veces, al menos 4605 veces, al menos 4610 veces, al menos 4615 veces, al menos 4620 veces, al menos 4625 veces, al menos 4630 veces, al menos 4635 veces, al menos 4640 veces, al menos 4645 veces, al menos 4650 veces, al menos 4655 veces, al menos 4660 veces, al menos 4665 veces, al menos 4670 veces, al menos 4675 veces, al menos 4680 veces, al menos 4685 veces, al menos 4690 veces, al menos 4695 veces, al menos 4700 veces, al menos 4705 veces, al menos 4710 veces, al menos 4715 veces, al menos 4720 veces, al menos 4725 veces, al menos 4730 veces, al menos 4735 veces, al menos 4740 veces, al menos 4745 veces, al menos 4750 veces, al menos 4755 veces, al menos 4760 veces, al menos 4765 veces, al menos 4770 veces, al menos 4775 veces, al menos 4780 veces, al menos 4785 veces, al menos 4790 veces, al menos 4795 veces, al menos 4800 veces, al menos 4805 veces, al menos 4810 veces, al menos 4815 veces, al menos 4820 veces, al menos 4825 veces, al menos 4830 veces, al menos 4835 veces, al menos 4840 veces, al menos 4845 veces, al menos 4850 veces, al menos 4855 veces, al menos 4860 veces, al menos 4865 veces, al menos 4870 veces, al menos 4875 veces, al menos 4880 veces, al menos 4885 veces, al menos 4890 veces, al menos 4895 veces, al menos 4900 veces, al menos 4905 veces, al menos 4910 veces, al menos 4915 veces, al menos 4920 veces, al menos 4925 veces, al menos 4930 veces, al menos 4935 veces, al menos 4940 veces, al menos 4945 veces, al menos 4950 veces, al menos 4955 veces, al menos 4960 veces, al menos 4965 veces, al menos 4970 veces, al menos 4975 veces, al menos 4980 veces, al menos 4985 veces, al menos 4990 veces, al menos 4995 veces, al menos 5000 veces, al menos 5005 veces, al menos 5010 veces, al menos 5015 veces, al menos 5020 veces, al menos 5025 veces, al menos 5030 veces, al menos 5035 veces, al menos 5040 veces, al menos 5045 veces, al menos 5050 veces, al menos 5055 veces, al menos 5060 veces, al menos 5065 veces, al menos 5070 veces, al menos 5075 veces, al menos 5080 veces, al menos 5085 veces, al menos 5090 veces, al menos 5095 veces, al menos 5100 veces, al menos 5105 veces, al menos 5110 veces, al menos 5115 veces, al menos 5120 veces, al menos 5125 veces, al menos 5130 veces, al menos 5135 veces, al menos 5140 veces, al menos 5145 veces, al menos 5150 veces, al menos 5155 veces, al menos 5160 veces, al menos 5165 veces, al menos 5170 veces, al menos 5175 veces, al menos 5180 veces, al menos 5185 veces, al menos 5190 veces, al menos 5195 veces, al menos 5200 veces, al menos 5205 veces, al menos 5210 veces, al menos 5215 veces, al menos 52

5 veces en comparación con la expresión selectiva del transgén en neuronas PV cuando se une operativamente a un elemento regulador selectivo, medido mediante el ensayo de colocalización. En algunos casos, el elemento regulador da como resultado una expresión selectiva en neuronas PV que es al menos 2 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % mayor que la expresión en neuronas PV cuando el transgén está operativamente unido a un elemento regulador no selectivo. En algunos casos, el elemento regulador da lugar a la expresión selectiva en neuronas PV que es aproximadamente 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 5,5 veces, 6 veces, 6,5 veces, 7 veces, 7,5 veces, 8 veces, 8,5 veces, 9 veces, 9,5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 10 30 veces, 40 veces, 50 veces o 100 veces mayor de lo esperado para la distribución natural de las neuronas PV en el SNC. En algunos casos, el ensayo de colocalización es un ensayo inmunohistoquímico. En algunos casos, el ensayo inmunohistoquímico comprende un anticuerpo anti-PV. En algunos casos, el ensayo de colocalización se realiza como se muestra en el Ejemplo 5 a continuación. En algunos casos, el transgén codifica una subunidad de canal iónico, un regulador de neurotransmisor, un dominio de unión al ADN, una proteína de edición de genes o una variante o fragmento funcional del mismo. En algunos casos, la subunidad del canal iónico es una subunidad alfa o una subunidad beta de un canal iónico de sodio o una subunidad de un canal iónico de potasio. En algunos casos, el transgén comprende cualquiera de (i) SEQ ID NO: 37-43; (ii) un fragmento funcional del mismo; o (iii) una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con (i) o (ii). En algunos casos, la identidad de la secuencia se determina mediante BLAST. En algunos casos, el transgén comprende (i) SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1 o KV3.3; (ii) un fragmento funcional del mismo; o (iii) una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con (i) o (ii). En algunos casos, el transgén es un regulador de neurotransmisor que comprende (i) STXBP1, (ii) un fragmento funcional del mismo o (iii) una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con (i) o (ii). En algunos casos, el transgén comprende una proteína de unión al ADN que modula la expresión de un gen endógeno. En algunos casos, el gen endógeno es SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3 o STXBP1. En algunos casos, el transgén comprende una proteína de unión a ADN que comprende un dominio de unión a ADN de una proteína de unión a ADN o una proteína de escisión de ADN (por ejemplo, una nucleasa, una enzima de restricción, una recombinasa, etc.) en donde el dominio de escisión de ADN o dominio de nucleasa se ha desactivado, por ejemplo, una Cas desactivada por nucleasa (dCas), una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción desactivada o una proteína con dedos de zinc desactivada por nucleasa. En algunos casos, el transgén comprende un dominio de unión al ADN unido a un dominio modulador de la transcripción (por ejemplo, un dominio activador o represor de la transcripción). En algunos casos, la proteína de edición de genes es una proteína Cas. En algunos casos, los elementos reguladores combinados tienen un tamaño inferior a 2,5 kb, menos de 2 kb, menos de 1,5 kb, menos de 1 kb o menos de 500 pb. En algunos casos, las células no PV comprenden uno o más tipos de células no PV en el SNC. En algunos casos, las células no PV comprenden una o más neuronas excitadoras, neuronas dopaminérgicas, astrocitos, microglía y neuronas motoras. En algunos casos, el casete de ácido nucleico es una construcción lineal. En algunos casos, el casete de ácido nucleico es un vector. En algunos casos, el vector es un plásmido. En algunos casos, el vector es un vector viral. En algunos casos, el vector viral es un vector de virus adenoasociado (AAV). En algunos casos, el vector de AAV es AAV1, AAV8, AAV9, scAAV1, scAAV8 o scAAV9. En algunos casos, el vector viral es un vector lentiviral.

20 40 [0007] En un aspecto, los elementos reguladores de cualquiera de los cassetes de ácido nucleico divulgados en el presente documento contienen menos de 600 pb de secuencia contigua dentro de 10 kb del sitio de inicio de la transcripción de GAD2, GAD1, SYN1, NKX2.1, DLX1, DLX5/6, SST, PV y/o VIP.

25 45 [0008] En un aspecto, el casete de ácido nucleico divulgado en el presente documento se usa en un método para tratar un trastorno o afección neurológica en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los cassetes de ácido nucleico divulgados en el presente documento. En algunos casos, el trastorno o afección neurológica es un trastorno psiquiátrico (por ejemplo, esquizofrenia, trastorno obsesivo compulsivo, adicción, depresión, ansiedad, psicosis); un trastorno del espectro autista (p. ej., síndrome de X frágil, síndrome de Rett); epilepsia (p. ej., encefalopatía traumática crónica, epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus (GEFS+), encefalopatía epiléptica, epilepsia del lóbulo temporal, epilepsia focal, esclerosis tuberosa); o neurodegeneración (p. ej., enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson). En algunos casos, el trastorno o afección neurológica es el síndrome de Dravet o la enfermedad de Alzheimer. En algunos casos, la afección o enfermedad neurológica es cualquier afección o enfermedad relacionada con convulsiones y/o epilepsia en la que están implicadas las neuronas PV.

30 55 [0009] A veces, un método para aumentar la expresión selectiva de un transgén en neuronas PV en el SNC comprende poner en contacto una célula con un casete de ácido nucleico descrito en el presente documento.

35 60 [0010] A veces, un método para dirigir la expresión de cualquier transgén a neuronas PV en el SNC comprende vincular operativamente uno o más elementos reguladores selectivos de neuronas PV a un transgén. En algunos casos, cada uno de los elementos reguladores comprende (i) una secuencia de SEQ ID NO: 1-32, (ii) un fragmento funcional o una combinación de los mismos, o (iii) una secuencia con al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con (i) o (ii). En algunos casos, la identidad de la secuencia se determina mediante BLAST. En algunos casos, los elementos reguladores dan como resultado una expresión selectiva del transgén en neuronas PV que es mayor que la expresión del mismo transgén cuando se une operativamente a un elemento regulador

no selectivo, según se mide mediante un ensayo de colocalización. En algunos casos, el ensayo inmunohistoquímico comprende un anticuerpo antiPV (por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 5 a continuación). En algunos casos, el elemento regulador no selectivo es un promotor constitutivo. En algunos casos, el elemento regulador no selectivo es cualquiera de CAG, EF1a, SV40, CMV, UBC, PGK y CBA. En algunos casos, los elementos reguladores dan como resultado la expresión selectiva del transgén en neuronas PV a un nivel que es al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces en comparación con un elemento regulador no selectivo cuando está unido operativamente al transgén, según se mide mediante un ensayo de colocalización. En algunos casos, los elementos reguladores dan como resultado una expresión selectiva en las neuronas PV que es de al menos el 2 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % mayor que la expresión en neuronas PV cuando el transgén está operativamente unido a un elemento regulador no selectivo. En algunos casos, los elementos reguladores dan como resultado una expresión selectiva en las neuronas PV que es aproximadamente 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 5,5 veces, 6 veces, 6,5 veces, 7 veces, 7,5 veces, 8 veces, 8,5 veces, 9 veces, 9,5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces o 100 veces mayor de lo esperado para la distribución natural de PV neuronas en el SNC. En algunos casos, el transgén es cualquiera de SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, STXBP1, una proteína de unión a ADN, una proteína de edición de genes o un fragmento funcional de la misma. En algunos casos, los elementos reguladores y el transgén se encuentran en un AAV. En algunos casos, el AAV es AAV1, AAV8, AAV9, scAAV1, scAAV8 o scAAV9.

[0011] A veces, un método para tratar una afección o trastorno neurológico en un sujeto que lo necesita comprende poner en contacto una célula con un casete de ácido nucleico que comprende: uno o más elementos reguladores unidos operativamente a un transgén que dan como resultado la expresión selectiva del transgén en Neuronas PV sobre una o más células no PV en el SNC. En algunos casos, cada uno de los elementos reguladores comprende (i) una secuencia de SEQ ID NO: 1-32, (ii) un fragmento funcional o una combinación de los mismos, o (iii) una secuencia con al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con (i) o (ii). En algunos casos, la identidad de la secuencia se determina mediante BLAST. En algunos casos, el transgén es una subunidad de canal iónico dependiente de voltaje, o una variante o un fragmento funcional del mismo. En algunos casos, la subunidad es una subunidad beta de un canal iónico de sodio. En algunos casos, la subunidad es una subunidad alfa de un canal iónico de sodio. En algunos casos, la subunidad es de un canal iónico de potasio. En algunos casos, el transgén es cualquiera de (i) SCN1A, SCN1B, SCN2B, KV3.1 o KV3.3; (ii) un fragmento funcional del mismo; o (iii) una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con (i) o (ii). En algunos casos, el transgén es una proteína de unión al ADN. En algunos casos, la proteína de unión al ADN modula un gen endógeno. En algunos casos, el gen endógeno es SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3 o STXBP1. En algunos casos, el transgén es una proteína de unión a ADN que comprende un dominio de unión a ADN de una proteína de unión a ADN o una proteína de escisión de ADN (por ejemplo, una nucleasa, una enzima de restricción, una recombinasa, etc.) en donde el dominio de escisión de ADN o dominio de nucleasa se ha desactivado, por ejemplo, una Cas desactivada por nucleasa (dCas), una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción desactivada o una proteína con dedos de zinc desactivada por nucleasa. En algunos casos, el transgén comprende un dominio de unión al ADN unido a un dominio modulador de la transcripción (por ejemplo, un dominio activador o represor de la transcripción). En algunos casos, el transgén es una proteína de edición de genes. En algunos casos, la proteína de edición de genes es una proteína Cas, por ejemplo, Cas9. En algunos casos, la afección o trastorno neurológico está asociado con una haploinsuficiencia o una mutación en cualquiera de SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3 o STXBP1. En algunos casos, la afección o trastorno neurológico es epilepsia, neurodegeneración, tauopatía o hipoexcitabilidad neuronal. En algunos casos, la condición o trastorno neurológico es el síndrome de Dravet. En algunos casos, la condición o trastorno neurológico es la enfermedad de Alzheimer. En algunos casos, la afección o enfermedad neurológica es un trastorno psiquiátrico (por ejemplo, esquizofrenia, trastorno obsesivo compulsivo, adicción, depresión, ansiedad, psicosis); un trastorno del espectro autista (p. ej., síndrome de X frágil, síndrome de Rett); epilepsia (p. ej., encefalopatía traumática crónica, epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus (GEFS+), encefalopatía epiléptica, epilepsia del lóbulo temporal, epilepsia focal, esclerosis tuberosa); o neurodegeneración (p. ej., enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson). En algunos casos, la afección o enfermedad neurológica es cualquier afección o enfermedad relacionada con convulsiones y/o epilepsia en la que están implicadas neuronas PV. En algunos casos, los elementos reguladores de esta divulgación dan como resultado una expresión selectiva del transgén en neuronas PV que es mayor que la expresión del mismo transgén cuando se une operativamente a un elemento regulador no selectivo, según se mide mediante un ensayo de colocalización. En algunos casos, el elemento regulador no selectivo es un promotor constitutivo. En algunos casos, el elemento regulador no selectivo es cualquiera de CAG, EF1a, SV40, CMV, UBC, PGK y CBA. En algunos casos, los elementos reguladores dan como resultado una expresión selectiva en neuronas PV a un nivel que es al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces en comparación con un elemento regulador no selectivo cuando está unido operativamente al transgén, según se mide mediante un ensayo de colocalización. En algunos casos, los elementos reguladores dan como resultado una expresión selectiva en las neuronas PV que es de al menos el 2 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos

- 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % mayor que la expresión en neuronas PV cuando el transgén está operativamente unido a un elemento regulador no selectivo. En algunos casos, los elementos reguladores dan como resultado una expresión selectiva en las neuronas PV que es aproximadamente 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 5,5 veces, 6 veces, 6,5 veces, 7 veces, 7,5 veces, 8 veces, 8,5 veces, 9 veces, 9,5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces o 100 veces mayor de lo esperado para la distribución natural de PV neuronas en el SNC. En algunos casos, el casete de ácido nucleico está en un AAV. En algunos casos, el AAV es AAV1, AAV8, AAV9, scAAV1, scAAV8 o scAAV9.
- 5 10 [0012] A veces, un método para tratar el síndrome de Dravet comprende poner en contacto una célula con un AAV que comprende un transgén, en donde el transgén es cualquiera de (i) SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, o una proteína de unión a ADN, (ii) un fragmento funcional del mismo, o (iii) una secuencia que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de secuencia identidad con (i) o (ii). En algunos casos, la identidad de secuencia se mide utilizando BLAST. En algunos casos, la proteína de unión al ADN modula un gen endógeno. En algunos casos, la proteína de unión al ADN es un modulador transcripcional. En algunos casos, el transgén es una proteína de unión a ADN que comprende un dominio de unión a ADN de una proteína de unión a ADN o una proteína de escisión de ADN (por ejemplo, una nucleasa, una enzima de restricción, una recombinasa, etc.) en donde el dominio de escisión de ADN o dominio de nucleasa se ha desactivado, por ejemplo, una Cas desactivada por nucleasa (dCas), una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción desactivada o una proteína con dedos de zinc desactivada por nucleasa. En algunos casos, el dominio de unión al ADN está unido a un dominio modulador de la transcripción (p. ej., un dominio activador o represor de la transcripción). En algunos casos, el transgén comprende una proteína de edición de genes, por ejemplo, una proteína Cas, Cas9. En algunos casos, el gen endógeno es SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B o SCN2B. En algunos casos, el AAV comprende además uno o más elementos reguladores selectivos de neuronas PV o uno o más elementos reguladores descritos en el presente documento unidos operativamente al transgén. En algunos casos, cada uno de los elementos reguladores comprende independientemente (i) una secuencia de SEQ ID NOs: 1-32, (ii) un fragmento funcional o una combinación de los mismos, o (iii) una secuencia con al menos un 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos al menos 99 % de identidad de secuencia con (i) o (ii).
- 15 20 25 30 [0013] A veces, un método para tratar la enfermedad de Alzheimer comprende poner en contacto una célula con un AAV que comprende un transgén, en el que el transgén es cualquiera de (i) SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, STXBP1, o una proteína de unión al ADN; (ii) un fragmento funcional del mismo; o (iii) una secuencia que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con (i) o (ii). En algunos casos, la identidad de secuencia se mide utilizando BLAST. En algunos casos, la proteína de unión al ADN modula un gen endógeno. En algunos casos, el gen endógeno es SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3 o STXBP1. En algunos casos, el transgén es una proteína de unión al ADN que comprende un modulador transcripcional. En algunos casos, el transgén es una proteína de unión a ADN que comprende un dominio de unión a ADN de una proteína de unión a ADN o una proteína de escisión de ADN (por ejemplo, una nucleasa, una enzima de restricción, una recombinasa, etc.) en donde el dominio de escisión de ADN o dominio de nucleasa se ha desactivado, por ejemplo, una Cas desactivada por nucleasa (dCas), una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción desactivada o una proteína con dedos de zinc desactivada por nucleasa. En algunos casos, el dominio de unión al ADN está unido a un dominio modulador de la transcripción (p. ej., un dominio activador o represor de la transcripción). En algunos casos, el transgén comprende una proteína de edición de genes, por ejemplo, una proteína Cas, Cas9. En algunos casos, el AAV comprende además uno o más elementos reguladores selectivos de neuronas PV o uno o más elementos reguladores descritos en el presente documento unidos operativamente al transgén. En algunos casos, cada uno de los elementos reguladores comprende independientemente cada uno de los elementos reguladores comprende independientemente (i) una secuencia de SEQ ID NO: 1-32, (ii) un fragmento funcional o una combinación de los mismos, o (iii) una secuencia con al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de identidad de secuencia con (i) o (ii).
- 35 40 45 50 55

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- [0014] Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que establece formas de realización ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y cuyos dibujos adjuntos:
- 60 **FIG. 1** ilustra la frecuencia de las convulsiones (convulsiones por intervalo de 12 horas) en ratones heterocigotos SCN1A después del tratamiento con un vector AAVDJ recombinante que comprende SCN1B o eGFP operativamente unido a un elemento regulador que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 32. El gráfico ilustra los valores medios en cada día de registro con barras de error que representan el error estándar de la media.
- 65 **FIG. 2** ilustra un alto poder gamma (50-100 Hz) de diferentes ratones: control de tipo salvaje (WT), ratones APP/PS1 transgénicos no tratados (APP/PS1), o ratones APP/PS1 transgénicos tratados con rAAV que

comprende SCN1B unido operativamente a un elemento regulador que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 32 (APP/PS1 + SCN1B).

FIG. 3A ilustra el ensayo de colocalización de inmunofluorescencia de células del SNC de crías después de inyecciones sistémicas neonatales de AAV9 que comprende el transgén eGFP unido operativamente a un elemento regulador que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 8. AAV9 que comprende el transgén eGFP unido operativamente a Se utilizó CAG como control. Las imágenes de la fila inferior ilustran células eGFP+. Las imágenes de la fila central ilustran células PV+, que se tiñeron con un anticuerpo antiPV. Las imágenes de la fila superior (fusión) ilustran una superposición de fluorescencia de PV+, eGFP+ (con células eGFP+ y PV+ representativas que se muestran como células blancas o gris claro indicadas con puntas de flecha) y DAPI+.

FIG. 3B ilustra la cuantificación de estudios de colocalización de inmunofluorescencia ilustrados en la **FIG. 3A**, en donde la expresión selectiva en células PV se expresa como el porcentaje de células eGFP+ que también eran PV+ en comparación con el control CAG, medido mediante el ensayo de colocalización de inmunofluorescencia.

FIG. 4A ilustra el ensayo de colocalización de inmunofluorescencia de células del SNC de ratones adultos después de inyecciones sistémicas de AAV9 que comprende el transgén eGFP unido operativamente a un elemento regulador que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 8. AAV9 que comprende el transgén eGFP unido operativamente a Se utilizó EF1 α como control. Las imágenes de la fila inferior ilustran células eGFP+. Las imágenes de la fila central ilustran células PV+, que se tiñeron con anticuerpos anti-PV. Las imágenes de la fila superior (fusión) ilustran una superposición de fluorescencia PV+ eGFP+ (con células eGFP+ y PV+ representativas, o las células blancas o gris claro, indicadas por puntas de flecha) y DAPI+.

FIG. 4B ilustra la cuantificación de estudios de colocalización de inmunofluorescencia ilustrados en la **FIG. 4A**, en donde la expresión selectiva en células PV se expresa como el porcentaje de células eGFP+ que también eran PV+ en comparación con el control EF1 α , medido mediante el ensayo de colocalización de inmunofluorescencia.

FIGS 5A-5F ilustran el ensayo de colocalización de inmunofluorescencia de células del SNC de ratones adultos después de inyecciones directas en el SNC de AAVDJ que comprende el transgén eGFP unido operativamente a un elemento regulador que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 2-22. Las imágenes de la fila inferior ilustran células eGFP+. Las imágenes de la fila central ilustran células PV que se tiñeron con un anticuerpo anti-PV. Las imágenes de la fila superior (fusión) ilustran una superposición de fluorescencia de PV+, eGFP+ (con células eGFP+ y PV+ representativas, o las células blancas o gris claro, indicadas con puntas de flecha) y DAPI+.

FIG. 5A ilustra el ensayo de colocalización de inmunofluorescencia realizado con AAVDJ que comprende una de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 unida operativamente a eGFP. **FIG. 5B** ilustra el ensayo de colocalización de inmunofluorescencia realizado con AAVDJ que comprende una de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 9 unida operativamente a eGFP. **FIG. 5C** ilustra el ensayo de colocalización de inmunofluorescencia realizado con AAVDJ que comprende una de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13 unida operativamente a eGFP. **FIG. 5D** ilustra el ensayo de colocalización de inmunofluorescencia realizado con AAVDJ que comprende una de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17 unida operativamente a eGFP. **FIG. 5E** ilustra el ensayo de colocalización de inmunofluorescencia realizado con AAVDJ que comprende una de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21 unida operativamente a eGFP. **FIG. 5F** ilustra el ensayo de colocalización de inmunofluorescencia realizado con AAVDJ que comprende SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 34 unidas operativamente a eGFP, en donde SEQ ID NO: 34 es un elemento regulador no selectivo previamente caracterizado y se usó como control para comparación.

FIG. 6 ilustra la cuantificación de estudios de colocalización de inmunofluorescencia ilustrados en las **FIG. 5A-5F**, en las que la expresión selectiva en células PV se expresa como el porcentaje de células eGFP+ que también eran PV+ en comparación con la SEQ ID NO: 34, medida mediante el ensayo de colocalización de inmunofluorescencia.

FIG. 7 ilustra un esquema de un ejemplo de un casete de expresión que contiene ER de esta divulgación, por ejemplo, un potenciador, un promotor y elementos de estabilidad. Los ER pueden ubicarse aguas arriba y/o aguas abajo de un transgén en un casete de expresión, que puede ser un plásmido, un vector o un vector viral.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DIVULGACIÓN

[0015] La presente divulgación contempla composiciones y métodos para usar dichas composiciones en terapia génica para tratar una enfermedad o afección asociada con el sistema nervioso central (SNC), por ejemplo, síndrome de Dravet, enfermedad de Alzheimer, epilepsia y/o convulsiones.

[0016] La terapia génica puede reemplazar, modificar, eliminar o agregar un gen o una secuencia de ácido nucleico específico, tal como un casete de expresión, para impartir un efecto terapéutico en una célula. En algunos casos, la terapia génica se utiliza para administrar un casete de expresión en una célula que produce o da como resultado un efecto terapéutico. En algunos casos, se puede usar un virus, tal como AAV, que comprende un vector viral que comprende un casete de expresión para administrar un transgén en una célula. El casete de expresión puede contener un transgén que proporciona un efecto terapéutico cuando se expresa en una célula.

- 5 [0017] Un desafío en la terapia génica es garantizar que el transgén se exprese en un tipo de célula de interés apropiado, o el tipo de célula objetivo, para efectuar o dirigir la expresión del gen. Los métodos tradicionales para dirigir la terapia génica a menudo se han basado en métodos y/o vehículos de administración (por ejemplo, variando los virus usados o las secuencias de la cápsida de los virus). Además de dirigirse, o expresar selectivamente, un casete de expresión en el tipo de célula objetivo sobre uno o más tipos de células no objetivo, otro desafío en el campo es aumentar la expresión génica, especialmente cuando el gen es grande, en un tipo de célula objetivo o tejido para ejercer un efecto terapéutico.
- 10 [0018] La presente divulgación proporciona una pluralidad de elementos reguladores, que son secuencias de nucleótidos no codificantes, que pueden unirse operativamente a cualquier transgén para aumentar o mejorar la selectividad de la expresión del transgén en el SNC, por ejemplo, en neuronas PV. Al aumentar la selectividad de la expresión génica usando uno o más elementos reguladores descritos en el presente documento, se puede mejorar la eficacia de una terapia génica, disminuir la dosis eficaz necesaria para dar como resultado un efecto terapéutico, minimizar los efectos adversos o efectos fuera del objetivo y/o aumentar seguridad y/o tolerancia del paciente.
- 15 [0019] En un aspecto, uno o más elementos reguladores pueden unirse operativamente a cualquier transgén en un casete de expresión para modular la expresión génica en una célula, tal como dirigir la expresión del transgén en un tipo de célula o tejido objetivo (por ejemplo, células PV) sobre uno o más tipos de células o tejidos no objetivo (por ejemplo, tipos de células del SNC no PV). En algunos casos, dirigir la expresión del transgén en un tipo de célula o tejido objetivo incluye una mayor expresión génica en el tipo de célula o tejido objetivo. Uno o más elementos reguladores unidos operativamente a un transgén pueden ser parte de un casete de expresión, que puede ser una construcción lineal o circular, un plásmido, un vector, un vector viral, por ejemplo, un vector de un virus adenoasociado (AAV). Dicho casete de expresión puede adaptarse para terapia génica o administración a un sujeto (por ejemplo, un ser humano, un paciente o un mamífero). En algunos casos, vincular operativamente uno o más elementos reguladores a un gen da como resultado la expresión del gen en un tejido objetivo o tipo de célula en el SNC, tal como una neurona de parvalbúmina (PV). En algunos casos, uno o más elementos reguladores (por ejemplo, SEQ ID NO: 1-32, o un fragmento funcional o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma) aumentan la selectividad de la expresión génica en un tejido o tipo de célula objetivo en el SNC, como las neuronas PV. En algunos casos, una terapia génica comprende uno o más elementos reguladores descritos en el presente documento, en donde los elementos reguladores están unidos operativamente a un transgén e impulsan la expresión selectiva del transgén en neuronas PV.
- 20 [0020] En algunos casos, la expresión selectiva de un gen en neuronas PV se usa para tratar una enfermedad o condición asociada con una haploinsuficiencia y/o un defecto genético en un gen endógeno, en donde el defecto genético puede ser una mutación en el gen o desregulación del gen. Tal defecto genético puede dar como resultado un nivel reducido del producto génico y/o un producto génico con función y/o actividad deteriorada. En algunos casos, un casete de expresión comprende un gen, una subunidad, una variante o un fragmento funcional del mismo, en donde la expresión génica del casete de expresión se usa para tratar la enfermedad o afección asociada con el defecto genético, función y/o actividad deteriorada y/o desregulación del gen endógeno. En algunos casos, la enfermedad o condición es síndrome de Dravet, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, neurodegeneración, tauopatía, hipoexcitabilidad neuronal y/o convulsiones.
- 25 [0021] En algunos casos, el transgén es un canal iónico o un regulador de neurotransmisor, una proteína de unión al ADN o una subunidad, variante o fragmento funcional del mismo. En algunos casos, el transgén es una subunidad alfa del canal iónico de sodio, una subunidad beta del canal iónico de sodio o una variante o fragmento funcional de las mismas. En algunos casos, el transgén es un canal iónico de potasio o una subunidad del mismo. En algunos casos, el transgén es SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3, STXBP1, una proteína de unión al ADN (p. ej., una proteína de unión al ADN que modula la expresión de un gen endógeno), o una variante o fragmento funcional del mismo. En algunos casos, el transgén comprende una secuencia que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % identidad de secuencia con cualquiera de SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3, STXBP1, una proteína de unión a ADN, o una variante o fragmento funcional de la misma. En algunos casos, el transgén es una proteína de unión al ADN que modula la expresión de un gen endógeno, tal como cualquiera de SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3 y STXBP1.
- 30 [0022] Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una", "el" y "ella" pretenden incluir también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, en la medida en que los términos "incluido", "incluye", "que tiene", "tiene", "con" o variantes de los mismos se utilizan en la descripción detallada y/o en las reivindicaciones, dichos términos pretenden ser inclusive de manera similar al término "que comprende".
- 35 [0023] El término "aproximadamente" o "alrededor de" significa dentro de un rango de error aceptable para el valor particular determinado por un experto en la técnica, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, la limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de una o más de una desviación estándar, según la práctica en la técnica. Alternativamente, "aproximadamente" puede significar un rango de hasta el 20 %, hasta el 15 %, hasta el 10 %, hasta el 5 % o hasta el 1 %) de un valor dado.
- 40 [0024] Los términos "determinar", "medir", "evaluar", "valorar", "ensayar", "analizar" y sus equivalentes gramaticales se pueden usar indistintamente en el presente documento para referirse a cualquier forma de medición, e incluyen determinar

si un elemento está presente o no (por ejemplo, detección). Estos términos pueden incluir determinaciones tanto cuantitativas como cualitativas. La evaluación puede ser relativa o absoluta.

5 **[0025]** El término "evaluación" se refiere al proceso mediante el cual se transcribe una secuencia de ácido nucleico o un polinucleótido a partir de un molde de ADN (tal como en ARNm u otro transcripto de ARN) y/o el proceso mediante el cual un ARNm transcripto se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Las transcripciones y los polipéptidos codificados pueden denominarse colectivamente "producto genético". Si el polinucleótido deriva de ADN genómico, la expresión puede incluir el corte y empalme del ARNm en una célula eucariota.

10 **[0026]** Como se usa en el presente documento, "enlazado operativamente", "enlace operable", "conectado operativamente" o equivalentes gramaticales de los mismos se refieren a la yuxtaposición de elementos genéticos, por ejemplo, un promotor, un potenciador, una secuencia de poliadenilación, etc., en donde los elementos están en una relación que les permite operar de la manera esperada. Por ejemplo, un elemento regulador, que puede comprender secuencias promotoras y/o potenciadoras, está unido operativamente a una región codificante si el elemento regulador 15 ayuda a iniciar la transcripción de la secuencia codificante. Puede haber residuos intermedios entre el elemento regulador y la región codificante siempre que se mantenga esta relación funcional.

20 **[0027]** Un "vector" como se usa en el presente documento se refiere a una macromolécula o asociación de macromoléculas que comprende o se asocia con un polinucleótido y que puede usarse para mediar la entrega del polinucleótido a una célula. Ejemplos de vectores incluyen plásmidos, vectores virales, liposomas y otros vehículos de administración de genes. El vector generalmente comprende elementos genéticos, por ejemplo, elementos reguladores, 25 unidos operativamente a un gen para facilitar la expresión del gen en una objetivo. La combinación de elementos reguladores y un gen o genes a los que están unidos operativamente para la expresión se denomina "casete de expresión".

30 **[0028]** El término "AAV" es una abreviatura de virus adenoasociado y puede usarse para referirse al virus mismo o a un derivado del mismo. El término cubre todos los serotipos, subtipos y formas tanto naturales como recombinantes, excepto cuando se requiera lo contrario. La abreviatura "rAAV" se refiere a virus adenoasociado recombinante, también denominado vector AAV recombinante (o "vector rAAV"). El término "VAA" incluye VAA1, VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9, VAA10, VAA11, VAA12, rh10 y sus híbridos, VAA aviar, VAA bovino, VAA canino, VAA equino, VAA de primates, VAA no primate y VAA ovino. Las secuencias genómicas de diversos serotipos de AAV, así como las secuencias de las repeticiones terminales nativas (TR), proteínas Rep y subunidades de la cápsida se conocen en la técnica. Estas secuencias se pueden encontrar en la literatura o en bases de datos públicas como GenBank. Un "vector rAAV" como se usa en el presente documento se refiere a un vector de AAV que comprende una secuencia de polinucleótidos que no es de origen de AAV (es decir, un polinucleótido heterólogo de AAV), típicamente una secuencia de interés para la transformación genética de una célula. En general, el polinucleótido heterólogo está flanqueado por al menos una, y generalmente por dos, secuencias de repetición terminal invertida (ITR) de AAV. El término vector rAAV abarca tanto partículas de vector rAAV como plásmidos de vector rAAV. Un vector rAAV puede ser monocatenario (ssAAV) o autocomplementario (scAAV). Un "virus AAV" o "partícula viral de AAV" o "partícula de vector de rAAV" se refiere a una partícula viral compuesta por al menos una proteína de la cápside de AAV y un vector de polinucleótido de rAAV encapsulado. Si la partícula comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, un polinucleótido distinto de un genoma de AAV de tipo salvaje tal como un transgén que se administrará a una célula de mamífero), normalmente se denomina "partícula de vector de rAAV" o simplemente "vector de rAAV". Por lo tanto, la producción de una partícula de rAAV incluye necesariamente la producción de un vector de rAAV, ya que dicho vector está contenido dentro de una partícula de rAAV.

45 **[0029]** Como se usan en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento", "terapia" y similares se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado, que incluye, entre otros, aliviar, retrasar o ralentizar la progresión, reduciendo los efectos o síntomas, prevenir la aparición, inhibir, mejorar la aparición de una enfermedad o trastorno, obtener un resultado beneficioso o deseado con respecto a una enfermedad, trastorno o condición médica, tal como un beneficio terapéutico y/o un beneficio profiláctico. "Tratamiento", como se utiliza en el presente documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad ocurra en un sujeto que puede estar predisposto a la enfermedad o en riesgo de adquirir la enfermedad pero aún no se le ha diagnosticado que la padece; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad. Un beneficio terapéutico incluye la erradicación o mejora del trastorno subyacente que se está tratando. Además, se logra un beneficio terapéutico con la erradicación o mejora de uno o más de los síntomas fisiológicos asociados con el trastorno subyacente de modo que se observe una mejora en el sujeto, a pesar de que el sujeto todavía pueda estar afectado por el trastorno subyacente. En algunos casos, para beneficio profiláctico, las composiciones se administran a un sujeto con riesgo de desarrollar una enfermedad particular, o a un sujeto que informa uno o más de los síntomas fisiológicos de una enfermedad, incluso aunque no se haya realizado un diagnóstico de esta enfermedad. Los métodos de la presente divulgación se pueden usar con cualquier mamífero. En algunos casos, el tratamiento puede resultar en una disminución o el cese de los síntomas (p. ej., una reducción en la frecuencia o duración de las convulsiones). Un efecto profiláctico incluye retrasar o eliminar la aparición de una enfermedad o afección, retrasar o eliminar la aparición de síntomas de una enfermedad o afección, ralentizar, detener o revertir la progresión de una enfermedad o afección, o cualquier combinación de las mismas.

60 **[0030]** El término "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a esa cantidad de una composición descrita en el presente documento que es suficiente para afectar la aplicación prevista, incluyendo, entre otros, el

- tratamiento de enfermedades, como se define a continuación. La cantidad terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo de la aplicación del tratamiento prevista (in vivo), o del sujeto y la enfermedad que se está tratando, por ejemplo, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la forma de administración y similares, que puede ser determinado fácilmente por un experto en la técnica. El término también se aplica a una dosis que inducirá una respuesta particular en una célula objetivo. La dosis específica variará dependiendo de la composición particular elegida, el régimen de dosificación a seguir, si se administra en combinación con otros compuestos, el momento de la administración, el tejido al que se administra y el sistema físico de administración en el que se transporta.
- 5 [0031] Un "fragmento" de una secuencia de nucleótidos o péptido se refiere a una secuencia que es menor que la que se cree que es la secuencia de "longitud completa".
- 10 [0032] Una "variante" de una molécula se refiere a variaciones alélicas de tales secuencias, es decir, una secuencia sustancialmente similar en estructura y actividad biológica a la molécula completa o a un fragmento de la misma.
- 15 [0033] Se pretende que el término "fragmento funcional" incluya los "fragmentos", "variantes", "análogos" o "derivados químicos" de una molécula.
- 20 [0034] Un "fragmento funcional" de una secuencia de ADN o proteína posee al menos un fragmento biológicamente activo de la secuencia, que se refiere a un fragmento que conserva una actividad biológica (ya sea funcional o estructural) que es sustancialmente similar a una actividad biológica de la secuencia completa de ADN o proteína. Una actividad biológica de una secuencia de ADN puede ser su capacidad para influir en la expresión de una manera que se sabe que se atribuye a la secuencia completa. Por ejemplo, un fragmento funcional de un elemento regulador conservará la capacidad de influir en la transcripción como el ER completo.
- 25 [0035] Los términos "sujeto" e "individuo" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. "Sujeto" se refiere a un animal, tal como un mamífero, por ejemplo un ser humano. Los métodos descritos en el presente documento pueden ser útiles en terapéutica humana, aplicaciones veterinarias y/o estudios preclínicos en modelos animales de una enfermedad o afección. En algunos casos, el sujeto es un mamífero y, en algunos casos, el sujeto es un ser humano.
- 30 [0036] El término "in vivo" se refiere a un evento que tiene lugar en el cuerpo de un sujeto.
- 35 [0037] El término "in vitro" se refiere a un evento que tiene lugar fuera del cuerpo de un sujeto. Por ejemplo, un estudio in vitro El ensayo abarca cualquier ensayo realizado fuera de un sujeto. Los ensayos in vitro abarcan ensayos basados en células en los que se emplean células vivas o muertas. Los ensayos in vitro también abarcan un ensayo sin células en el que no se emplean células intactas.
- 40 [0038] Las comparaciones de secuencias, tales como con el fin de evaluar identidades, mutaciones o cuando una o más posiciones de una secuencia de prueba caen con respecto a una o más posiciones especificadas de una secuencia de referencia, se pueden realizar mediante cualquier algoritmo de alineación adecuado, incluyendo pero no limitado al algoritmo Needleman-Wunsch (ver, por ejemplo, el alineador de agujas EMBOSS disponible en www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/, opcionalmente con configuración predeterminada), el algoritmo BLAST (ver, por ejemplo, el herramienta de alineación BLAST disponible en blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, opcionalmente con configuración predeterminada) y el algoritmo Smith-Waterman (consulte, por ejemplo, el alineador EMBOSS Water disponible en www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/, opcionalmente con configuración predeterminada). La alineación óptima se puede evaluar utilizando cualquier parámetro adecuado de un algoritmo elegido, incluidos los parámetros predeterminados.
- 45 [0039] En general, "identidad de secuencia" u "homología de secuencia", que se pueden usar indistintamente, se refieren a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o de aminoácido a aminoácido de dos polinucleótidos o secuencias de polipéptidos, respectivamente. Normalmente, las técnicas para determinar la identidad de la secuencia incluyen determinar la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido y/o determinar la secuencia de aminoácidos codificada por el mismo, y comparar estas secuencias con una segunda secuencia de nucleótidos o aminoácidos. Se pueden comparar dos o más secuencias (polinucleótidos o aminoácidos) determinando su "porcentaje de identidad", también denominado "porcentaje de homología". El porcentaje de identidad con una secuencia de referencia (p. ej., secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos), que puede ser una secuencia dentro de una molécula más larga (p. ej., polinucleótido o polipéptido), se puede calcular como el número de coincidencias exactas entre dos secuencias óptimamente alineadas dividido por la longitud de la secuencia de referencia y multiplicada por 100. El porcentaje de identidad también se puede determinar, por ejemplo, comparando información de secuencia utilizando el programa informático avanzado BLAST, incluida la versión 2.2.9, disponible en los Institutos Nacionales de Salud. El programa BLAST se basa en el método de alineación de Karlin y Altschul, Proc. Nacional. Acad. Sci. EE. UU. 87:2264-2268 (1990) y como se analiza en Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990); Karlin y Altschul, Proc. Nacional. Acad. Sci. EE. UU. 90:5873-5877 (1993); y Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997). Brevemente, el programa BLAST define identidad como el número de símbolos alineados idénticos (es decir, nucleótidos o aminoácidos), dividido por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. El programa se puede utilizar para determinar el porcentaje de identidad en toda la longitud de las secuencias que se comparan. Se proporcionan parámetros predeterminados para

5 optimizar las búsquedas con secuencias de consulta cortas, por ejemplo, con el programa blastp. El programa también permite el uso de un filtro SEG para enmascarar segmentos de las secuencias de consulta según lo determinado por el programa SEG de Wootton y Federhen, Computers and Chemistry 17: 149-163 (1993). Los rangos de grados deseados de identidad de secuencia son aproximadamente del 80 % al 100 % y valores enteros entre ellos. Normalmente, el porcentaje de identidades entre una secuencia divulgada y una secuencia reivindicada es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 %. En general, una coincidencia exacta indica una identidad del 100 % en toda la longitud de la secuencia de referencia. En algunos casos, la referencia al porcentaje de identidad de secuencia se refiere a la identidad de secuencia medida usando BLAST (Herramienta de búsqueda de alineación local básica). En otros casos, ClustalW se puede utilizar para el alineamiento de secuencias múltiples.

10 [0040] A menos que se indique lo contrario, todos los términos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que tendrían para un experto en la técnica y la práctica de la presente invención emplearán técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y tecnología de ADN recombinante, que están dentro del conocimiento de los expertos en la técnica.

15 **Elementos regulatorios**

20 [0041] Los elementos reguladores son secuencias de ácidos nucleicos o elementos genéticos que son capaces de influir (por ejemplo, aumentar o disminuir) la expresión de un gen y/o conferir la expresión selectiva de un gen (por ejemplo, un gen indicador tal como eGFP, un transgén, o un gen terapéutico) en un tejido particular o tipo de célula de interés. En algunos casos, un elemento regulador puede ser un transgén, un intrón, un promotor, un potenciador, UTR, un aislante, un represor, una secuencia de repetición terminal invertida (ITR), una secuencia de repetición terminal larga (LTR), un elemento de estabilidad, un elemento postraduccional, elemento de respuesta, o una secuencia poliA, o una combinación de los 25 mismos. En algunos casos, el elemento regulador es un promotor o un potenciador, o una combinación de los mismos. En algunos casos, el elemento regulador deriva de una secuencia humana.

30 [0042] En algunos casos, el tipo de célula de interés es una neurona PV. Los elementos reguladores pueden funcionar a nivel de ADN y/o ARN. Los elementos reguladores pueden funcionar para modular la selectividad de la expresión génica en un tipo de célula de interés. Los elementos reguladores pueden funcionar para modular la expresión génica en la fase transcripcional, la fase potranscripcional o en la fase traduccional de la expresión génica. Los elementos reguladores incluyen, entre otros, secuencias promotoras, potenciadoras, represoras, silenciadoras y aislantes. A nivel de ARN, la regulación puede ocurrir a nivel de traducción (p. ej., elementos de estabilidad que estabilizan el ARNm para la traducción), escisión de ARN, empalme de ARN y/o terminación transcripcional. En algunos casos, los elementos reguladores pueden reclutar factores transcripcionales en una región codificante que aumentan la selectividad de la expresión génica en un tipo de célula de interés. En algunos casos, los elementos reguladores pueden aumentar la velocidad a la que se producen los transcritos de ARN, aumentar la estabilidad del ARN producido y/o aumentar la velocidad de síntesis de proteínas a partir de los transcritos de ARN. En algunos casos, los elementos reguladores pueden prevenir la degradación del ARN y/o aumentar su estabilidad para facilitar la síntesis de proteínas. En algunos casos, los elementos reguladores suprimen los procesos de transcripción y/o traducción en tipos de células no objetivo. En algunos casos, los tipos de células no objetivo incluyen, entre otros, neuronas excitadoras, tipos de células del SNC no PV y tipos de células del SNC no neuronales.

40 [0043] Se pueden usar varios ensayos que incluyen, entre otros, hipersensibilidad a la ADNasa, ATAC-Seq y ChIP-Seq para identificar supuestos elementos reguladores no codificantes (ER). La reacción enzimática en cada uno de estos ensayos se dirige preferentemente a estados de cromatina abiertos/accesibles, un estado que se cree que predice elementos reguladores. Para descubrir elementos reguladores selectivos de tipo celular, se puede analizar la secuencia de cromatina abierta para el tipo de célula objetivo de interés (p. ej., neuronas de parvalbúmina) y compararla con secuencias de cromatina abierta para tipos de células no objetivo (p. ej., neuronas excitadoras). Se pueden aplicar filtros adicionales para refinar aún más la selección de objetivos, incluida la proximidad a un gen selectivo de tipo celular, la conservación de especies y/o motivos de secuencia, como los sitios de unión de factores de transcripción. Las secuencias de ADN que se identifican de forma única en el tipo de célula objetivo se pueden sintetizar y clonar en un vector de expresión. La selectividad de un elemento regulador se puede determinar utilizando métodos inmunohistoquímicos para cuantificar la colocalización con proteínas selectivas de tipo celular conocidas.

45 [0044] Por ejemplo, un método para aislar un elemento regulador selectivo de tipo celular incluye aislar núcleos de un tejido cerebral o tipo de célula de interés de un modelo animal, lo que se puede lograr mediante el uso de un método de purificación por afinidad que aísla el tejido o célula tipo de interés (por ejemplo, usar perlas recubiertas con un anticuerpo anti-PV para aislar neuronas PV), usar cebado natural de alto rendimiento y síntesis de ADN para generar un conjunto de secuencias de regiones de cromatina abiertas en los núcleos, secuenciar el conjunto de secuencias para identificar secuencias putativas que impulsan la expresión génica en el tejido o tipo de célula de interés y verificar la expresión selectiva en un sistema indicador en una línea celular *in vitro* y/o en un modelo animal.

50 [0045] Otro método para identificar elementos reguladores candidatos que sean selectivos en un tejido o tipo de célula de interés incluye el uso de ratón knockin R26-CAG-LSL-Sun1-sGFP-Myc para recolectar el tejido o tipo de célula de interés, aislando los núcleos GFP+/Myc+ de los neocórteces de ratón de esta cepa mediante purificación por afinidad, por ejemplo, usando anticuerpos anti-GFP o anti-Myc y perlas magnéticas recubiertas de proteína G para aislar núcleos de la

neocorteza. El ARN nuclear de núcleos purificados o núcleos neocorticales completos se puede convertir en ADNc y amplificar con el Nugen Ovation RNA-seq System V2 (Nugen 7102), seguido de la secuenciación con Illumina HISEQ® 2500. El ADN genómico de núcleos purificados se puede fragmentar y utilizar para crear bibliotecas MmethylC-seq, que se pueden secuenciar utilizando Illumina HISEQ® 2000. Para generar una biblioteca ATAC-seq, los núcleos unidos a perlas se transponen utilizando la transposasa Tn5 (Illumina FC-121-1030). Después de 9 a 12 ciclos de amplificación por PCR, las bibliotecas se secuencian utilizando un Illumina HISEQ® 2500. Para generar una biblioteca ChIP-seq, los núcleos de las neuronas excitadoras se pueden digerir en mononucleosomas usando nucleasa microcíclica, seguido de la extracción con sal de cromatina y ChIP nativo y construcción de bibliotecas, que se puede secuenciar en un Illumina HISEQ® 2500. Después de secuenciar estas bibliotecas, las secuencias se mapean para identificar, por ejemplo, la correlación en la hipometilación específica del tipo de célula en regiones ricas en CG, modificaciones de histonas y sitios de unión de factores transcripcionales y patrones asociados con factores transcripcionales altamente expresados. Las características y correlaciones superpuestas de múltiples ensayos y/o bibliotecas descritas anteriormente proporcionan evidencia para identificar secuencias candidatas dentro de tales regiones genómicas como elementos reguladores potenciales asociados con la expresión selectiva y/o la alta expresión en las células aisladas del neocórtex. Por ejemplo, una región genómica caracterizada por una fuerte superposición entre la hipometilación detectada en la biblioteca methylCseq, el ensayo ChIP y un enriquecimiento en los motivos de unión del factor de transcripción en la misma región proporciona datos convergentes que indican que la región genómica contiene una secuencia de un supuesto elemento regulador selectivo para el tejido o tipo de célula aislada. Como otro ejemplo, para identificar elementos reguladores selectivos de neuronas PV candidatas, se pueden aislar neuronas PV y purificar núcleos de las células PV aisladas de modo que las secuencias genómicas que se identifican como activas en múltiples ensayos de secuenciación descritos anteriormente tengan una alta probabilidad de ser células PV. Elementos reguladores selectivos, por ejemplo, una región genómica que se identifica como activa en un ensayo ATAC-seq (correspondiente a regiones de cromatina abierta), activa en RNAseq (indicativa de expresión génica activa y patrones bajos de metilación del ADN en la región), y activa en el ensayo metilC-seq (que genera mapas de metiloma con resolución de base única a partir de un tipo de célula de interés).
25

[0046] Una vez que las regiones genómicas candidatas se identifican como selectivamente activas en un tipo de célula de interés, las secuencias dentro de la región pueden generarse usando métodos de PCR y probarse en ensayos adicionales *in vitro* y/o *in vivo* para validar la selectividad del tipo de tejido o célula de las secuencias. Dichos ensayos de validación incluyen un ensayo de colocalización inmunohistoquímica, en el que se usa un anticuerpo o cualquier marcador detectable para marcar el tipo de célula de interés y un segundo marcador detectable, por ejemplo, un transgén fluorescente, está operativamente unido a los elementos reguladores putativos. Los casetes de expresión que comprenden dichos elementos se administran a las células *in vitro* y/o *in vivo*. La expresión selectiva impulsada por uno o más elementos reguladores putativos se puede validar midiendo la superposición entre el tipo de célula de interés (medida por la señal detectable o la fluorescencia de su marcador marcado, por ejemplo, un anticuerpo anti-PV) y el segundo marcador detectable correspondiente a la expresión del transgén (por ejemplo, eGFP o RFP) operativamente vinculado a los elementos reguladores. Una superposición en las señales de ambos marcadores detectables indica selectividad del tipo celular en el tipo de célula marcada si la cantidad de superposición observada es mayor que la superposición observada cuando los elementos reguladores se reemplazan con un control, como CAG, EF1α, un promotor constitutivo. (por ejemplo, SV40, CMV, UBC, PGK y CBA), un elemento regulador no selectivo, o un elemento regulador no selectivo previamente caracterizado. Varias cepas de ratón adaptadas para expresar un marcador detectable en un tipo de célula de interés permiten la validación de la selectividad del tipo de célula de un elemento regulador *in vivo*. Por ejemplo, se pueden usar varias líneas de ratón que expresan Cre en un tipo de célula particular porque la expresión de Cre selectiva por tipo de célula puede impulsar expresión inducida por Cre de una proteína fluorescente, como RFP, en un tipo de célula de interés. El etiquetado de dicho tipo de célula de interés *in vivo* permite determinar el nivel de expresión selectiva del tipo de célula que está asociado con un elemento regulador putativo unido operativamente a un transgén fluorescente o indicador en el mismo ratón. De manera similar al ensayo de colocalización, una superposición de las señales de ambos marcadores que excede la superposición detectada para CAG, EF1α, un promotor constitutivo (p. ej., SV40, CMV, UBC, PGK y CBA) o un elemento regulador no selectivo es indicativo de la selectividad del tipo de célula para los elementos reguladores probados. En algunos casos, la cepa de ratón utilizada es el ratón B6 PV-Cre (Jackson Laboratory), que es un ratón B6 PVCre knock-in que expresa la recombinasa Cre en neuronas que expresan parvalbúmina (p. ej., interneuronas en el cerebro y neuronas sensoriales aferentes propioceptivas en los ganglios de la raíz dorsal), sin alterar la expresión endógena de Pvalb.
30
35
40
45
50

[0047] Tras la validación de la selectividad del tipo celular de un elemento regulador para un tipo celular particular, las secuencias de dichos elementos reguladores pueden variarse usando diversos métodos de mutagénesis, por ejemplo, métodos de PCR propensos a errores, para mejorar su selectividad. En algunos casos, se pueden combinar dos o más elementos reguladores que tienen selectividad celular. En algunos casos, los elementos reguladores combinados exhiben una selectividad de tipo celular mejorada para impulsar la expresión génica en el tipo de célula de interés. En algunos casos, dichos elementos reguladores se truncan en una o más bases a la vez para determinar la cantidad mínima de secuencia que conserva su selectividad de tipo celular. Los elementos reguladores más pequeños que conservan la selectividad del tipo celular son útiles para realizar una terapia génica que comprenda un transgén grande, o cuando la capacidad de clonación de un vector o plásmido está limitada en vista del tamaño de un transgén que se desea administrar mediante terapia génica.
55
60

[0048] La presente divulgación proporciona una pluralidad de secuencias de nucleótidos que son elementos reguladores. En algunos casos, uno o más de los elementos reguladores descritos en el presente documento dan como resultado una

mayor selectividad en la expresión génica en una célula de paralbúmina. En algunos casos, los elementos reguladores aquí descritos son selectivos para las células fotovoltaicas. En algunos casos, los elementos reguladores selectivos de las células PV están asociados con la expresión genética selectiva en las células PV más que con la expresión en tipos de células del SNC no PV. En algunos casos, los elementos reguladores selectivos de las células PV se asocian con una expresión genética reducida en tipos de células del SNC no PV.

5

[0049] Los ejemplos no limitantes de elementos reguladores incluyen las SEQ ID NO: 1-32, como se proporciona en la TABLA 1 a continuación.

10

TABLA 1: Lista de secuencias de ácidos nucleicos divulgadas en el presente documento.

SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico	Fuente/ubicación genómica
1	GGAGGAAGCCATCAACTAAACTACAATGACTGTAAGATAACAAA ATTGGGAATGGTAACATATTGAAAGTTCTGTTGACATAAAGAA TCATGATATTAAATGCCCATGGAAATGAAAGGGCGATCAACACT ATGGTTGAAAAGGGGAAATTGAGAGCACAGATGIGTTCGT GTGGCAGTGCTGCTAGCAATACTCAGAGAAGAGAGAGA ACAATGAAATCTGATPGGCCCAAGTGTGAGGCCAGATGAGGTT CAGCTGCCAACCTTCACATCTTATGAAAGTCATTTAACG ACAACATACTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACAGAGTCCTG CTCTGTTGCCAGGACAGTGCAGTAGTGCACATCTCGCT CACTGCAGCTCCACCTCTAGGCPAAACCGTCTCTCGATC AGCCTCCAAGTAAGCTGAAATTACAGGAGTGGCCCAACATGCC CAGCTAATTTTGTTATTTAATAGATACGGGGTTTACCCATAT CACCCAGGCTGGCTCGAACCTCTGGCTCAAGTGTATCCACCTG CTCTGGGCTCCAAAGTGTGGGATTATAGGCCAGGCCACTAT GCCCAACCCGACCAACCTTTTTAAATAAAATTAAAAATT GGTATTTCACATATACTAGT	Humano; hg19: chr2: 171621900 - 171622580
2	AGTTTGGACAAGAACTATACTTCTAGCTTCTCTGGCTCCAC CTTGCAGAGAAATGCAAGCTTCATTAATCTCATGAGCCAAACCTTC ATCATCTTCTTCATATACTCTGTTGGCTCTCTCATGAGTA TAACACACACAGAAGGAGCACTAACACAGGCTGTTGTTTCTC TTATTATCATAGCTGTTGTTAGACATGTCATTCTGTTCTGTT GCTTCATGCTAAAGGAGTCTCAGGATAATGAGAAACTGTACAG CGAGGCACTAGGAAACATGGGTTGAAATTCCACAGTACTAT TGTTCAGCTGTTGACCTTGGGCAAGTCACATCCCTTCTGAG GCTTCGATTCCCCAAAGCTATAAAAGAAGCACTCTTAAACCTTT TTAGGTCTAGACTCAAGCCCCAGGCACACTCTCAGGGAGACTCAT GAGAGTACAGATCAATTCCATAGAAAAACCATAGTTATATC CAGAGGCTTCTGTAAG	Ratón; mm 10:chr 2: 36053858-36054359
3	GGTCCAGTTAGAGGCAGAGCATTTGGGTTCTCCAGTCAGGA GCTTCTCTCTCCGCTCTTAQTTCTCTCTCTTTAAAAAAAT GGGTGATAGTATAAGAAAGGAAGCTCTGGGCTGGGGACCAGGG CCCTGGGATCCCCGCTCCAGGCCACCTCGCTCCGACCCCTCCAG GGACAAAGCTCCCCCAACCCCGTCTTCTCAGGCTCCACTAGA AGAGATGGGGAGCCCTGGGCTCAGGGCTCTGGAAACAGGAC AGTCAGCCCAAGCCAGCCAAGCGCGCGGACGTCCTCACCG CAAGCAATTGCAAGGTACCCGGGAAAGCCCCCGAACGCTGTGG GCGGGGCTTCCGGAGTGGCGTGGTTGTTCTGGGACTTGTGACTCC GCCCTTGCGGGGACCCCGCTGAGGGCGCTCCAAGGATGAA GCTGCTCTGGGGCTGCGCTCGGACCTGAGGCTCTGATTTGGCG GAGGTCTCAGGGCCCTTCTGCGCCACAGGTTATGAGGGCA GTTGGGGAGGACAACAAACCCGGACGGCGACAGGCTOCAGAAG CTGGCGGACATGACGGGCTCAGTCAGGTCATCAGGTGG GGCTCCGGGGCTCGGCCCTCAGGCTAGGGTGAACCTTACGGGA AGCGCTGAAGCTCGTAGTGGTACGGATGGTGGCGCGTGCACGT GGCCGCCCCCTCCAGTGTGGGCTAAGGACCCAGTCGGCACG GGTGACCCCTTCTGATTACTGAGAGTGCAGAGGCTGT	Ratón; cr2: 36,09 1,144-36,091,966

65

(Continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico	Fuente/ubicación genómica	
5			
10			
15			
20	4	TGGTGGGAAGACATGTCCAGGGAAAGAAATGGCCTCCAGAGGCC TGAGGTGGGAATGCTGGAGGTGGAGAGAGGAACAACGTGACT GAAAATGAGCTTCCACTGTGGCTTAGTGGCTATAACCAAGTCTA GAGTATAGGGTAGGAGAAAGATTAGGAAAGCGATGGGCTGAGA ATGATGTGGCTGTGACTTTGTAAACCCAAAGCACCTGGAC TAAACCCATGAAACAGTGTGGTGCCACCAAAGACTATAATGAG CTCAGGGAAACAGAAATTCTGTCAGGGATGGGATTTTTTTTTTT TTCTGCTAACTGCACTGCTGGGTGATGCTTGTACAAACCAATCCT GGAAAGTAAGAGGCCAAGGGCAGCTGGGACGGTGAGAGGAGCC TGATGGGAAACCAGGCCAACGAGGGCAGCAGAGGGGATGAAAG GGATGTGGTGCACTCAGAGACTCACTTCATTAGCTGGAGGGACT GCTGGATAGGGCTGTGAAAGGTTCTGGTATCTGAGTTGGCGGGCTG GGTAGGTGGCTGTGCTTGTGAAACAGTGTGCAAGAGGAA AACAGGGTTAACGGCTAGGACAGTCACAGGTGAGTCAGCCTCA CAAGAGCAACCTTCCCCTAGTGTGAGA	Ratón; cr2: 36,09 5,396-36,096,028
25	5	GGAGGTCTCTTTGCCCCCGTCCAACAAGAGAAATGCAAGGCT GTATCTCAATTCTCTGAGGCCCTCTCTGTTATTATAGAAGAAAAGT AGGGAAAGCCATAACGCCCTCTGAGCTTCAGTGTCTCTGCT CTGCAAATGAGGCTGGGGAGGCTGGGGGGGGGGGTGAAAGAG GCCCGCGCCAAGCCGACCCCCCACCTCTGCCCTCTCCCAAGGTC ACAACCTCATCTGGACCTGCGGTOCTCGAGTCTCCGTGTGT CGCACATCGCTGAGGCCAGCAGAATAGCTGCTACATCAAGAAC AGGAGATCTACTGCAAGATGGACTACTCTAGGTAGGCAGGCC CATCCCGCCAGCAAGGGCTGGAGCATGAAACGCCCTTGACACAGC GTGCTTAGGCCACTTGTGCTGCTGTGCTCTCCAATTCTGAGC CTGCTGTTAGAGTCACAAACGCGGCTCAGCCCAACTGGCC GCCCTCTACTCAGCACGTCTAACAGAAAGGGAGGCCAGTCT CAGCCTGAGTTGGCGGGGATCTGCTCGGGCTCTCCGATC TGACAGGGCGCTGGCAACGGGTCTGGTCTCCTCTGCTTCT TGGCCCCGAGCACCAGTGTGTTGTGAGCTCTGATGTCCGAG GCTCTGCCCCGGATCA	Ratón; mm 10:chr 2: 36102524- 36103193
30	6	CTCTGGCTACCTCTTATCTTGGCATTCACGACAAATTCTAATTG CAGGTAGTTGTGTTGTTGCTGGCTGTTTTTTTCTCCCTCAGAGG CTTGGGATGCAAGGAACTAAGCGATTACTCTCAAGAGGCCACGG GTCAGTGCAAGGGAGAGGGGGAGAGAGAGAGGGAAAAAAACCA ATCCAAATTCAAATTTGCTTCATTAGAGAGACACCGCTTGTG GGAAGGGCTTAAATGCCCACTACAAAGTTAGGACTCATGTT AGCCGGGTTATATAACAGGCAGGGGGAGGCCGCTGGGCTCTG ACAGCTCCGAGCCAGTTCAACGACGCCGCTGCGCTGCTTCT CCCCCTCCCCAGGTGATGCCCTAGCCAGGGCTCGGCTGCAA GCGACCCTCCAGGTGCTGCAAGGGAGGCCGCTGGGCTGCGA GAGTCTTTCGGCTCTGCTTCTGGGCCCCGAGTCCCCAACAGC ACAGGCCAGGGCTCTGGCTAGCCCTCCGGCTACCAACCTTA CCCCCTGCGCTGGAAATGCGCAATAGGAGGCCCTCTGTTGAG CTTGGTTTCTGQCCCTGGAATGTAAGCTTGGCTGCTTCTG ACCCAGGATGCGCTGTTGTTAAAGTGGGGGGCGCTCCCTCTC TCCAATAGGTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT ATCCCTGGCACATTGGGTTGTCAGTCTGGTGGCGAGGAACCA GATTCACCTGAGTACTGGCTAACGGCTTCTGGCTGCTTCT CCCCATTCTGGGCTAGTCAGACGCCAGAGGGCTTGGCAGGGCTC TGGACAAGGACGAAGGTAGAGCTCCCTGCTGCTCTCGTGGCG ACCGCTGCTGCTGCTGCCCCCTGCTGCTCTCGTGGCG TGGCGCGAAGATACTGCTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG ACCGGTATCTGCTCAAGGTGAGTCAGGGTAGGTGAGCTGCTG CCCCACGGGTGTGGTTGCAAGCCCAAGAGCTGT	Ratón; mm 10:chr 2 : 36103286- 36104328
40			
45			
50			
55			

(Continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico	Fuente/ubicación genómica
5		
10	7 CAAAGACTTTAAAAGTTAGATAAAATAAAACAAACATTGACGGCTTTCATCACATCTAGACTATAATCCAAAGATCTATATGGTCCC AAACGACTTACACTTAACCTACCCGCTCCCAATATGGCTTCTTCCC CCATCAGTCATGTCCTCAGCCATAGTGGCTCCCTGCTTCTTGG GGTACAAGGGACAACACTCCCTGAGAGGTTCCATTAGCTGCTGTT GCCAGAAGATQCTCTTGAGGCCACACCATCCTGCTCATTTCTCTT CACGCTCAGTGATTAAAGAGGCCATGCTTQGCCCTCCGCTCAAAA TTACATCCCTGCCGCTTCCACTCTTQCCCTCTTATTTCTAAAT AGAACTAACCTACCAACTACCCAAACATTCTATATAATGGATATC TGTCTCTGTTAAATAATATAATGTTGACTCAAGAAAGAACGTTG TCACTGCCCCTGCTACCAAGACTTTAACACAGTGCTATCGTG CACATGCTCAGTGAATIG	Ratón; mm 10: chr 2: 36114311-36114817
15		
20	8 TCAACAGGGGACACTGGAAAGAAGGATGGGGACAGAGGCC GAGAGGACTGTTACACATTAGAGAAACATCAGTGACTGTC GCTTGGGGTAGACTGCACAAAAGCCCTGAGGCAGCACAGGCA GGATCCAGTCTGCTGGCTCCAGGAAGCTAACCGCTCTCAGACAG AGCACAAAGCACCGAGACATGTCCTCAAGGCTTGTAGAGA GGTCAAGAGGACACGTACAGGCCCCAGAGATCAAACCTCAACCT CACCAAGCTTGGCAGCAAGCCTTACCAACCCACCCCCACCCCA CCCACCTGCAACCGGCCCTCTCCCTCCCCATQGCTCTCCATG QCTATCTCACTTGGCCCTAAATGTTAAGGATGACACTGGCTG CTGAGTGGAAATGAGACAGCAGAAGTCACAGTAGATTTAGG AAAGCCAGAGAAAAAGGCTTGTCTGTTTAAAGAAAGCCAAGG GACAAGCTAAGATAGGGCCAAGTAAT	Ratón; mm 10: chr 1 5: 7817910 9-78179610
25		
30	9 AAATAGAACTGTGAGATAGGGAGAGGGGGCAGGAAGGACA AGAGACCCCTGTCATTTGATCCCCACCTGTCCTGCTCTG GAQGGTACCCATQAGGGCCAAGCCACAGCCCTTAAGGTGGACAT	Ratón; mm 10: chr 1 5: 7819534
35		
40	10 TGTCTGGCTCTGCTCACTGCCCCCTCAGCAGCCCCAGAGGCC AGGAGACAGGGCTCAGCTCACAGAGATGTTAAACTG AGGCCCTAGTGAATGTTGAGGGCCAGGGCATGCCCTGGTGGGA TGTGACCTGGGCTCTCTCGCACGGGCTCTCCCCGAAGCCGA GCTGAGCATTTGGAGTTGAAATGTTCCGTACTTACGAAATCTG CTCCCTATTCGGCGGACTCCGATAGCTCCGCTTATGC TGCACTAGATAAGATGGAGCAGGGAGAGGACACGGCACTACTT ATGTAACCGGCTCTGAAAAATGGAGCAGCGGTCAAGGGCGGA ACAAGACGCTCTCTCTACCGCATCCCTCTCTCCGCTAAG GCTGCACTGGAGTCAGAGGCAGGGCTTCCCAATCTGCTTG ATCACTAACGCAAGCCAGCCTCCAGCCTCCGTAGCCCTCTATG QCTGAGACCCGGCTCTAGTTCCCCACTTACATCCCAGGGATC AGAGCTGTGAGGATGAAATGGATAAGGTAGCTGGAACCGTC TGGCAGAGAGGAGCTCTCAGGACTGTTGATGCTGTGGCTGCC TGGCTTGACCCCAAGTGACCCCCCTCTCATCTGCAAGCAGGA GAA	7-78196134
45		
50		
55	10 TCTATAGAAATGTGCCCCAGCCTGTTCCACACTTGATAACGC AAAGAAATGATACACACAAQAGAGGGATGAGGGTAGCATCCAGCC TGCTTCCCTGTGCTGCGGGGCTACAGCCACATCTCCCCAGTCC ATCTCAGACCGCTCACAGAGCTTCGCGGAATGTTAGCTTGTTC TCTGTCAGACAGGGAGACAGAGCCTGGGAAGCTAGGTGCT TGCTTCTTGTGCCCCACTGAGTCTTAGCTGGACTTGACACCCACAT GCCCTACAGCCGGGCGCACTTGCAATTGTCACCCAGGCCAGTG ATGATGGCTCTGCTTGTGCTTGTGCTTGTGCAACTACAGCTCCA GCACCTGTCGCCCCGGGTTTCACTCCCTTGTGAGTGAACACGGTAGIT ACTGGGGTGTGAGGGATGAGGCTTCTGCTCTGCTCTGCTGGCAA GTCCCTAGCGGGCTGCTGCGGGGGGTGGGGCTGTTGAGGGAG TGGTGTGAGTGAAGTATGACAG	Ratón; mm 10: chr 1 5: 7819630 5-78196806
60		

(Continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico	Fuente/ubicación genómica	
5			
10	11	TCTCCAGTGGAGAAACAGATGCTGTAACCTGGGCCACAGTAT AAAGAGAGGCCAGACATTGAACTGTCACACACAGAAGGCCGGCA CACTGGAACCTGGCAGTCCAGCTGGGAACAAGGGTAGAGGCTG AGGCCACTAAGTCACCTGAGGAGAGACATAGGAGCTAAAGC AGCTGAAGGGTGTCAOGACAGCTGGGGGCTGTGAAGTGGGCCTC ATGCCAGAGCTATGAACTGAGGGCTGTAGCCTAGGAGCTT GGAAGGCCAGCTGGCAAGCTGTGGCCAAAGACGCTGACTCACC AGGAGGGGGCAGCTGGAGGCCAGGCACTCTAAAGGTTCCAGGA AGGCAGCAGCTTCCAGGCTCAGCTAGGGAGAGACAGTGTGACA GCAAGTTGTCAOGCAACTGAGCTACTGCGCAGCTGGGAAGCT GTCCCTGGTCCCCAGTATCATCATCACCCAGACGCTGGCCAC CTGCCCTAGGTCCCACACAGTGTACCTCCCATCTTAACACAAAC ACATGACCAGAGAGA	Ratón; mm 10: chr 1 5: 7820523 4- 78205766
15			
20	12	GTCACCCCTCCCCCAAACAAACCCCTPCTCTCTGTTGAGAAA TTACAGGCATGAAAGATATAAAATCGGGATGCTTGTACTTGGGAA TATAAAATCACTAAAGCTTGGGCGAGGGGTGGCGACCTTGT GACCTGCTTGTGGCTGGCCAGTAAATCTCTGTTGCTCCAGGGGAGA AGAAAAGGCTGTGGCTCTGCTCACAAAGCTGCAGAAAACCA TTCTTAAAGCCAAAAGCCTTCAGAGAGAGCAGACATCCC CAGGCTGCTGGCTCAGCAAGTCACTGCTGCTCAATCTCAGGAAG TGAGGATAAGAGCAGTGTGCTGGAGAGTGCTCTGCTGAGCTG AGGTTCTGAAACATTAAGCGGGAGCATGGACCGGGCT CAGGAGGGGTGTGAACATCCCTAGGCAGAGGAGCTAGCTTC CTGGGAAAAGATACTAGGTTAACGCACACACATGTCTCTGGAA TAAGATAATCTTCTGATCACACACTATAACACACACAAAAGCT GCTC	Ratón; mm 10: chr 1 5: 7822484 1- 78225364
25			
30	13	GCCCTCTAGGCCACCTGACCAAGGCTCCCTCAGTCCCCCTTCC CACACCTCCCACACTCAGCCCCCTCTCCCCCCCCCGACCCCTGC AGGATTATCTCTGCTCTGCTGACTCAGCCCTGGGAGGCCACCT GGGCAGCAGGGGCCAAGGGTGTCTCTAGAAGGGACCTGGAGTCC ACGCTGGGCCAAGCTGCCCTTCTCTCTCTGCTCTGGCTCTG CTTGCGGTTCTGCTGAATGTGGTTATTTCTCTGCTGGCTCTTACA GAGAAATGCTGCTGCTAATTTTATGTGGAOCTCTGAGGCAGTGTA ATTGGAAGCCAGACACCCCTGTCAGCAGTGGGCTCCGCTCTGA GCTGCCATGCTCTCTGCTCTCTCCGCTCCGCTCTCATTTCA TOCAGCCACCTGTOCCAGGGAGAGGAGGAGTCACCCAGGCCCT CAGTCCGCCCCCTTAAATAAAAGGCCTCCGTTGCTCGGCACACA TACCAAGCAGCCGCTGGTGCCTAATCT	Ratón; mm 10: chr 1 5: 7824134 8- 78241856
35			
40	14	GTGTCTCTCCCTTCCCCCTTGGACCCCCGAGACAAGCCAATAAA ATACTCGGCAGGGTGGCTTCTCTCTCTTGTGCCAGTAATAAA CAGACTCAGAGCAAGTTAACGGCTGCTGGCTCAAGGTCTAGGCTG GGATCAGTGACAGAGGCCAGAAGAGAAACCTGAGACTCTTGT GAGCCAAGCTGGAGAGGACAGAAAGGAATGCGCTTACTCCATG CATGACCCCTGCTGCCAGCTTGTCTCTCTCTAAGGGACCATGAAAC GATATGTGCACACCGCTCATACGTATGTGCAACACTGCAAGAG GAGGCATCCCAGTGTACACCTATGAGACGCACAGAGAAACATAT ATGTAGCCATAGGCTAGAAATCTTCTCTCTAGGTCTGCCCT TCTGCA	Ratón; mm 10: chr 9: 10734092 8- 107341325
45			
50			
55			

(Continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico	Fuente/ubicación genómica
5		
10		
15	15 GGACCACTCAQTGTACACGGAAATGTAGAATTTGAGTCCTGCCATTG GTCTTCCCTCAAAGTCTTGAGGCTTGGACTGATATTGGGAGC ATCTGGGCAGAGAAGGCCACAAAGACAGGGTGGTTTTCTACA CTGGGACATACTCGTGGCATGACACAGGGCTGTCCCCAACCT CCCTGTCACTTCTCTCTGCCCGCTAGAGGGATGGGGGGT GGACATATGCTGCTATTGGCAGATAATCACATGTTAAGAGGTGG GGGGGGGCTCAAGAGGCAGGGCTAGGAGCATCCCATTGGGG AGAAGTTCTGGTTTCTTGCTGCCCTAGCTGCTATAAAATACGTT AAGACTTGAGCAACTGGAAAGCTCTAGTAATTAGGATGAC AAAAGCTGTAATTAACTCCAGCATCTCAGTGTGAGAGCATT AAGATGTAATTAAAGATGTTACACAAAGAGATTGGAGCTGTG ACACTTGGGCTGAAAACCCCAGGAAGGGACACAAATGGGTGAG GTGAGGATCTGGGGAGGCTGGGGACAGTCAGTGGATCCCA GCTATGAGATGCGAGGCCACCCAGCTGTTCTCTTGGAAAATG TTTGGCTGGGGGTTGGGGTGGGGCATCACACTTGATATGGA GATGGGGCAACAAAGCTGCAATATCTGGGGTGGAGGGTCA AGTGGATGGTGGAGATCATGTCAGGAAGAGGGCTCGA TCCCCAAAATCATGGTACATATGGTGTCTGGGGTACAGG AGCTATGTAACAAACAAAGTAA	Ratón; mm 10:chr 9: 10734922 7- 107350036
20		
25	16 TCTGCAGAAAGCTGCCATTCCACCAATTAAACCTGTGACTCCAG GCCTTAAGCTGTTGAAGGTCGAOTCCAGAAGGGCTATATG CAACTGCTAGGGAGAGTCTCCACTCCAGGGCCAAGAGGAGT CCCCGGCTGAGGTGTTGGGGGGACOTGCACTGGGCGCT GGGACACGGCTGGGCTCAGGACTCC	Ratón; mm 10: chr 9: 10739943 8- 107399639
30	17 TGCCCTCAGTTCTCGCTAGAAAGCCGGTCTAGGGTACATG CCCTGATTCTTCTGTTGCTGAAATTAAACACACATA	Ratón; mm 10:cap 9
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		

(Continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico	Fuente/ubicación genómica
5		
10		
15	18	Ratón; mm 10: chr 9: 10744482 5-107445746
20		
25		
30	19	Ratón; mm 10:chr 9: 10745208 0-107452718
35		
40		
45	20	Ratón; mm 10:chr 9: 10747041 4-107471129
50		
55		
60	21	Ratón; mm 10:chr 9: 10748488 7-107485033

(Continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico	Fuente/ubicación genómica
5		
10	22 CCTACCTGCGGCCAACATCTGGGGGCCATCCTGGGCCAGCG CCAGCGTGGTGGTGAAGGCACIUTGCGCCGTTGGTACTCTGTTCTC TACCTGCTTTCCTTTCGCTGTGGACACCGGGCTGCCCTGGCCGTAC CCCAGGCTACCTTTTCCCACCCAACCTCTGGATCTGGACCCCTGG CCACCCACGGGCTCATGGAACAGCACGTGTGGACGTGGCCAT TAGCTPGGCCACAGTGGTGTGGCCGGCGATTACTGGAGCCCC TCTGGGGAGCCCTGGAGCTGCTCATCTTCTCTC	Ratón; mm 10:chr 9: 10753449 0- 107534786
15	23 AAACGGACGGGCTCCGCTQAACCAAGTGAGGGCCCCAGACOTGC GCATAAATAAACCCCTGCGTGTGCTGACCCACCTGGGGAGAGGGGG AGGACCCACGGTAAAT	Humano; hg 19: chr2: 17167 2063- 171672163
20	24 GGAGCGAGCGCATAGCAAAAGGGACGCCGGTCTTTCTCTG CCGGTGGCACTGGGTAOCTGTGGCCAGGTGTGGTACTTTGATGG GGCCAGGGCTGG	Humano; hg 19: chr2: 17167 2697- 171672797
25	25 GCTCAAGGAAGCGTCGCAGGGTACAGATCTGGGGAACCCCG GGGAAAAGCACTGAGGCAAAACGCCGCTCGTCTCTACAATA TATGGGAGGGGGAGG	Humano; hg 19: chr2: 17167 2918- 171673018
30	26 TTQAGTACGTTCTGGATTACTCATAGACCTTTTTTCTCTC CGGGCGCAAAACCGTGAAGCTGGATTATAATCGCCCTATAAAG CTCCAGAGGCCTCAGGCACCTGCAAGAGGAGCCCCGCCCTCC GCCGACTAGCTGCCCCCGCGAGCAACGGCTCTGTGATTCCCCG CCGATCCGGTCCCCGCTCCCCACTCTGCCCCCGCTACCCCG AGCCGTGCAGCCGCTCTCGAATCTCTCTCTCTGGCGCTC GCGTGCAGAGGGAACTAGCGAGAACGAGGAAGCAGCTGGAG GTGACGCCGGCAGATTACGCCGTGCAAGGGCCAGGCCAGCG ATCGCTGGCGCTGTGCAAGAGGAAGGCAGGGAGTGCCCGGCTC GCTGTGCAGAGCCGAGGTGGTAAGCTAGCAGCACCACCTGAC TTCCTCAOCGCCAACCGTGGCTTTTCAGCCAGGTCTCTCTCC CCCGCTCTCAACCAACCCCATCCAGCGCCGGCACCCAAACC TCCGAAATGAAGTGTGCTTCTGGCC	Humano; hg 19:cr 2:17167 3150- 171673696
35		
40	27 CAGCACCCGAAGGGCGCTACTAGGAACCGTAACCTGTACTTTTC CAGGGGCCGTAAGTCGACCCGCTGCCCCAGTTGCTGTGCGACTGC GCGCGCGGGCGCTA	Humano; hg19: chr2: 17167 3900- 171674000
45	28 GAGTCAAAAGTGACTGTGGTTCTCTCTGGCCAAGTCGGAGGGAA GAAGTAAAGATAATGGGCCCTTTTCTCCCTCTCACCTTGCTCA CCAAAGTCCCTAOTCCCCGGAGCAGTTAGCCCTTTCTCTCCAG GGAATTAGCGACAGACAACAAACGGGAACCCAGACACCGAACCA GACATGCCGGCCCGTGGCCCGCTCCCC	Humano; hg19: chr2: 17167 4400- 171674600
50	29 GCTCGCTGCCCTTCTCTCCCTCTTGCTCTCCAGAGGCCGGATCTTC AAAGGGGAGCCCTCCGTGCCCCCGGGCTGCTCAAGTCCTCTCCGGTGTG CAGGACCCCCCGGAAGTCCTCTCCCGCACAGCTCTCGCTCTCTTTC CAGCCTGTTCTGCGCCGGACCAAGTCGAGGGACTCTGGACAGTAG AGGCCCGGGACGACCGAGCTG	Humano; hg19: chr2: 17167 4903- 171675101
55		

(Continuación)

5	SEQ ID NO: Secuencia de ácido nucleico	Fuente/ubicación genómica
10	AAACGGACGGGCCCTCCGTAACCAGTGAGGCCCCAGACGTGC	
15	GCATAAATAACCCCTCGTGTCTGACACACUTGGGAGAGGGGG	
20	AGGACCAACGTAATGGAGCGAGCGCATAGCAAAGGGACGC	
25	GGGGTCCCTTCTCTGCCGGTGGCACTGGTAGCTGTGCCAGG	
30	TGTGGTACTTGTAGTGGGCCCAGGGCTGGAGCTCAAGGAAGCG	Humano
35	TCGCAGGGTCACAGATCTGGGGAACCCGGGAAAGCACIG	
40	AGGCAAAACCGCCGCTCGTCTCTACAAATATGGGAGGGGA	
45	GGTTGAGTACGTTCTGGATTACTCATAAAGACCTTTTCTCT	
50	TCCGGGCGCAAAACCGTGGAGCTGGATTATAATCGCCCTATAAA	
55	GCTCCAGAGGCCGGTCAGGACCTGCAAGAGGAGCCCCGCCGTC	
60	CGCCGACTAGCTGCCCGGCCGAGCAACGGCTCGTGTATTC	
65	GCCGATCGGCTCCCGCTCCCACTCTGCCCTACCCG	
	GAGCGCTGCAAGCCGCTCTCGAATCTCTCTCTCTGGCGC	
	TCGCCTGCGAGAGGGAACTAGCGAGAACGAGGAAGCAGCTGG	
	AGGTGACGCCGGGAGATTACGGCTGTCAGGCCGAGCCGAGC	
	GGATCGCTGGGGCTGTCAGAGGAAGGCCGGAGTGCCCGC	
	TCGCCTGCGAGAGGGTAAGCTAGCGACCTGCGCGCGGGCTAGAGT	
	GCAAGGTGACTGTGGTCTCTCTGGCCAAGTCCGAGGGAGAA	
	CGTAAAGATATGGGCCCTTTCTCTCACCTTGTCTCACCAA	
	AGTCCCTAGTCCCCGGAGCAGTTAGCCCTTTCTCCAGGGAA	
	G	

(Continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico	Fuente/ubicación genómica
5		
10		
15		
20		
25		
30		Humano
35		
40		
45		
50		

(Continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico	Fuente/ubicación genómica
5		
10		
15		
20		
25	32	Humano y ratón
30		
35		
40		
45		
50	33	Humano
55	34	Ratón; chr9:107,3 99,268-107,400,06

(Continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico	Fuente/ubicación genómica
5	AGAAAGCCTGCCATTCACCATTTAACCTGTGACTTCCAGGGCTT AAGCCTGTTGAAGCTCGAGTCCCAGAAGGCTCATATGTGCAAC TGCCTAGGGAGAGTTCCCACCGCAGGGCAAGAGGAGTCCCC CGGCTCTGAAGGTGTTGGGGGGGGGGACGTCAGTGGGGCTGGGA CCACGGCTGGGGCTCAGGACTCGCGAGCTTGGATTGGATCGG TTTGCCTGAGCAGTGGCAGGCTCCGGGGTGAACGGGGACG AGGGGGCGCGGGGGCACAGGCGGGCGGTGACCCGGCGGGGG CGCCCGAGGGGGGGGGGGCAAGGGAGGGAGGGAGGGGGGGGG AGGGAGGGAGCGACAGGGGAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GCGGCCGCTATTGAGCCAGGCTCCGGGGGGGGGGGGGGGGGG CGCTGGAGCCAGCCGGGGGGGGAGATCGCTGCGCGAGCCG CAGAGGGCCTGCGGCCAGTGCAGGCCCCGGAGGGGGGGGGGG GAAGGGAGGTGGAGAAGAGGGGGGGTTTCCGCCGCCGCCGG CCCCCCCCACCTCCATCCCCCGCCGCCCGTCCCCCTCCCC GCGGCCGCCATCTTGAATGGAAAC	7
10	GAGTAATTACACAAAGGACTCGCCCCCTGCCATTGGGGAAATCCC AGGGACCGTCGTTAAACTCCCACTAACGTAGAACCCAGAGATC GCTCCGTTCCCGCCCCCTCACCGCCCGCTCTCGCATCACTGA GGTGGAGAAGAGCATGCGTGAAGGCTCCGGTGTCCCCGGTCACTGG CAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTGGGGGGGG GGTGGGCAATTGAAACCGGTGCTTAGAGAAGGTTGGGGGGGG AACTGGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGQCTCCGCTTTTCCCCGA GGGTTGGGGAGAACCGTATAAAGTGCACTGAGTGTCCCCGTGAAC GTTCTTTTCGCAACGGGTTTGGCGCCAGAACACAGGTAAGTGC CGTGTTGGGTTCCCGGGGGCTGGGCTTACGGGTTATGGCC CTTGGCTGCTTGAATTACTTCCACGGCCCTGGCTOCACTACGT GATTCTTGATCCCGAGCTTGGGTTGAAAGTGGGTGGGAGAGTT CGAGGGCTTGCCTTAAGGAGCCCCCTGGGCTCGTGTGCTTGAGTT GAGGCTTGGCTGGGCGCTGGGGCCGGCGTGTGAAATCTGGT GGCACCTTGCGCCCTGTCTGCTGTTGATAAGTCTCTAGCC ATTTAAATTTTGATGACCTGCTGCCACGCTTTTCTGGCAA GATAGCTTGTAAAATGCCGCCAAGATCTGCCACACTGGTATTTC GGTTTGGGGGGCGGGGGGGGACCCCCGGCGTGTGCTCCCCAG CGCACATGTTGCCGAGGGGGGGCTGGGCTCGAGGCCGGCCACCGA GAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCTGTCTGGT GCCCTGGCTCGGCCGCCGGTGTATGCCCGGCCCTGGGGCGCAA GGCTGGCCCGGTGGCACCACTGGGTGAGCGGAAAGATGGCC GCTTCCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTAAAATGGAGGACCGGG CGCTGGGAGAGCGGGGGGGTGAATCACCCACACAAAGGAAA AGGGCTTCCCTCCTCAGCCGTGCTTATGTGACTCCACCGA GTACCGGGCGCCGTCAGGCACCTGATTAGTCTCGAGCTTIT GGAGTACGTGCTCTTAGGTGGGGGGAGGGGTTTATGCGATG GAGTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAG CTTGGCACTTGATGAAATTCTCTGAAATTGCCCTTTTGTAGT TTGGATCTTGGTCAATTCTCAAGCCTCAGACAGTGTCAAAGT TTTTCTTCCATTTCAGGTGTGCTGTA	
15		
20		
25		
30		
35	35	
40		
45		
50		

[0050] En un aspecto, los elementos reguladores descritos en el presente documento son selectivos del tipo de célula. En algunos casos, los elementos reguladores descritos en el presente documento son selectivos para las neuronas PV.

55 En algunos casos, los elementos reguladores aquí descritos son selectivos para las neuronas PV en el SNC. En algunos casos, elementos reguladores selectivos de células fotovoltaicas o cualquier elemento regulador divulgado pueden dar como resultado la expresión genética selectiva en neuronas PV en al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o más tipos de células del SNC no PV.

60 [0051] En algunos casos, uno cualquiera o más de los elementos reguladores descritos en el presente documento están unidos operativamente a un transgén en un casete de expresión para dar como resultado una expresión selectiva en un tipo de célula objetivo, por ejemplo, una neurona PV. En algunos casos, un elemento regulador de cualquiera de las formas de realización del presente documento comprende o consiste en cualquiera de (i) SEQ ID NO: 1-33; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de los mismos; o (iii) una secuencia que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de (i) o (ii). En algunos

casos, un elemento regulatorio comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 1-32. En algunos casos, la identidad de secuencia se mide mediante BLAST.

5 **[0052]** En algunos casos, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, o diez o más de SEQ ID NO: 1-32, o un fragmento funcional o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con el mismo, se combinan para formar un elemento regulador más grande, o se combinan operativamente unido a un gen en un casete de expresión. En algunos casos, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, o diez o más de SEQ ID NO: 1-32, o un fragmento funcional o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con el mismo, se combinan usando una secuencia conectora de 1-50 nucleótidos. En algunos casos, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, o diez o más de SEQ ID NO: 1-32, o un fragmento funcional o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con el mismo, se combinan sin una secuencia conectora. En algunos casos, se utiliza una secuencia de SEQ ID NO: 33 como conector entre dos elementos reguladores cualesquiera. En algunos casos, una secuencia conectora entre dos elementos reguladores cualesquiera comprende la SEQ ID NO: 33 o una secuencia que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 33. En algunos casos, la identidad de secuencia se mide por BLAST.

10 **[0053]** En algunos casos, cuando se combinan o usan dos o más elementos reguladores en un casete de expresión, no es necesario que los elementos reguladores estén adyacentes o unidos en un casete de expresión. Por ejemplo, un elemento regulador puede ubicarse aguas arriba de un transgén, mientras que un segundo elemento regulador y/o 15 elementos reguladores adicionales pueden ubicarse aguas abajo del transgén. En algunos casos, uno o más elementos reguladores pueden ubicarse aguas arriba de un transgén. En algunos casos, uno o más elementos reguladores pueden 20 ubicarse aguas abajo de un transgén.

25 **[0054]** En algunos casos, una cualquiera o más de SEQ ID NO: 1-22, o un fragmento funcional o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma, se puede combinar con una cualquiera o más de SEQ ID NO: 23-30, o un fragmento funcional o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la misma, para formar un elemento regulador más grande. Por ejemplo, un elemento regulador comprende SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 30. Un elemento regulatorio comprende SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 30. Un elemento regulatorio comprende SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 23-29. Un elemento regulador comprende SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 23-29. En algunos casos, un elemento regulador comprende la SEQ ID NO: 30 o una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 23-29, o un fragmento funcional o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 99 % de identidad de secuencia con el mismo.

30 **[0055]** En algunos casos, uno o más elementos reguladores de la presente divulgación dan como resultado la expresión génica selectiva en una célula PV. En algunos casos, los elementos reguladores que muestran actividad o función selectiva en un tipo de célula objetivo también muestran actividad o función mínima en uno o más tipos de células fuera del objetivo, por ejemplo, tipos de células del SNC no PV, neuronas no inhibidoras o excitadoras. neuronas, células no fotovoltaicas.

35 **[0056]** En algunos casos, uno o más elementos reguladores unidos operativamente a un gen modulan la expresión génica en una célula, incluyendo, entre otros, la expresión selectiva en un tipo de célula objetivo sobre tipos de células no objetivo. La expresión selectiva en una célula o tipo de célula objetivo también puede denominarse expresión selectiva de células o expresión selectiva de tipo celular.

40 **[0057]** La expresión selectiva generalmente se refiere a la expresión en una fracción elevada de células del tipo de célula de interés (o el tipo de célula objetivo) en comparación con otras células (o tipo de célula no objetivo). La expresión selectiva también puede verse como una expresión preferencial en una célula objetivo o un tipo de célula objetivo sobre una o más células o tipos de células no objetivo. En algunos casos, la expresión selectiva de uno o más elementos reguladores de esta divulgación se compara con CAG, EF1 α , un promotor constitutivo (por ejemplo, SV40, CMV, UBC, PGK y CBA), o un elemento regulador no selectivo que se conoce, para impulsar la expresión en cualquier célula o tipo de célula sin selectividad. En algunos casos, la expresión selectiva de uno o más elementos reguladores de esta divulgación se compara con CAG, EF1 α , un promotor constitutivo (p. ej., SV40, CMV, UBC, PGK y CBA), un elemento regulador no selectivo o una expresión casete sin los elementos reglamentarios.

45 **[0058]** Los tipos de células no objetivo pueden incluir un subconjunto, subtipo o tipo de células diferente en comparación con la célula objetivo o el tipo de célula objetivo, o todos los tipos de células no objetivo. En algunos casos, uno o más elementos reguladores unidos operativamente a un gen dan como resultado una expresión selectiva en un tipo de célula objetivo sobre al menos un tipo de células no objetivo, o al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, o más de cinco tipos de células no objetivo. En algunos casos, los tipos de células no objetivo se refieren a todos los demás tipos de células sin incluir el tipo de célula objetivo. En algunos casos, los tipos de células no objetivo son todos los demás

- 5 tipos de células dentro de un tejido u órgano relevante sin incluir el tipo de célula objetivo, por ejemplo, todos los tipos de células no objetivo en el SNC, todos los tipos de células no objetivo en el hipocampo. En algunos casos, una célula no objetivo o un tipo de célula no objetivo abarca un subconjunto o subtipo de células que no es la célula objetivo. Por ejemplo, los tipos de células del SNC no PV pueden incluir células GABAérgicas que expresan calretinina y/o somatostatina en lugar de parvalbúmina, o todas las células GABAérgicas que no expresan parvalbúmina. En algunos casos, los tipos de células se distinguen por tener un marcador celular, morfología, fenotipo, genotipo, función y/o cualquier otro medio diferente para clasificar los tipos de células.
- 10 [0059] La selectividad de la expresión impulsada por un elemento regulador en una célula o tipo de célula de interés se puede medir de varias maneras. La selectividad de la expresión génica en un tipo de célula objetivo sobre tipos de células no objetivo se puede medir comparando el número de células objetivo que expresan un nivel detectable de una transcripción de un gen que está operativamente unido a uno o más elementos reguladores con el número total de células que expresan el gen. Dicha medición, detección y cuantificación se puede realizar *in vivo* o *in vitro*.
- 15 [0060] En algunos casos, la selectividad para las neuronas PV se puede determinar usando un ensayo de colocalización. En algunos casos, el ensayo de colocalización se basa en inmunohistoquímica. En algunos casos, se utiliza un gen indicador detectable como transgén para permitir la detección y/o medición de la expresión génica en una célula. En algunos casos, se usa un marcador detectable, por ejemplo, un marcador fluorescente o un anticuerpo, que marca específicamente la célula objetivo, para detectar y/o medir las células objetivo. En algunos casos, un ensayo de colocalización emplea imágenes, por ejemplo, imágenes fluorescentes, para determinar el solapamiento entre diferentes 20 etiquetas fluorescentes, por ejemplo, el solapamiento entre una señal de fluorescencia indicativa de una célula objetivo y otra señal de fluorescencia indicativa de expresión génica. En algunos casos, las etiquetas fluorescentes utilizadas para un ensayo de colocalización incluyen una proteína fluorescente roja (RFP), como un gen indicador *tdTomato*, y una proteína indicadora fluorescente verde, como *eGFP*.
- 25 [0061] En algunos casos, un gen unido operativamente a uno o más elementos reguladores es una proteína fluorescente, p. *eGFP* o *RFP*, donde la expresión del transgén proporciona una señal detectable. En algunos casos, el tejido se tiñe para detectar *eGFP* o la fluorescencia de *eGFP* se detecta directamente mediante un microscopio de fluorescencia. Se 30 puede usar un segundo marcador fluorescente o gen indicador que tenga una fluorescencia o señal detectable diferente para indicar las células objetivo, tal como un anticuerpo que identifica las células objetivo. Por ejemplo, se puede usar un anticuerpo anti-PV que interactúa específicamente con las neuronas PV para producir una señal detectable que se distingue de la fluorescencia utilizada para medir la expresión génica, como una fluorescencia roja o una tinción roja. Así, en un ejemplo en el que *eGFP* es un transgén operativamente unido a uno o más elementos reguladores que impulsan la 35 expresión selectiva en neuronas PV, y en el que las neuronas PV están marcadas con un anticuerpo anti-PV, la selectividad de la expresión génica en células PV se mide como porcentaje de células *eGFP*+ que también son PV+. En dicho ensayo, las células PV+ que también son *eGFP*+ se indican mediante la superposición de ambas señales de fluorescencia, es decir, una superposición de la fluorescencia roja y verde. Dicha medición, análisis y/o detección se puede realizar mediante inspección ocular o mediante una computadora.
- 40 [0062] En algunos casos, también se puede medir la proporción de un tipo de célula de interés (o tipo de célula objetivo) que expresa un transgén en comparación con la proporción de tipos de células no objetivo (u otras células) que expresan el transgén para evaluar la selectividad de uno o más elementos reguladores operativamente vinculados al transgén. De manera similar, la selectividad de expresión también se puede medir comparando el número de células objetivo que expresan un transgén operativamente unido a uno o más elementos reguladores con el número total de todas las células 45 que expresan el transgén. En ambos enfoques, cuanto mayor es el número de células objetivo que expresan el transgén, más selectivos son los elementos reguladores para las células objetivo. En algunos casos, las células objetivo son neuronas fotovoltaicas.
- 50 [0063] En algunos casos, uno o más elementos reguladores descritos en el presente documento dan como resultado una mayor selectividad en la expresión génica en una neurona PV. En algunos casos, uno o más elementos reguladores descritos en el presente documento dan como resultado una mayor selectividad en la expresión génica en neuronas PV en comparación con los tipos de células del SNC no PV. En algunos casos, uno o más elementos reguladores descritos en el presente documento dan como resultado una mayor selectividad en la expresión génica en neuronas PV en comparación con células GABAérgicas no PV, en donde las células GABAérgicas no PV pueden ser una cualquiera o 55 más de las células GABAérgicas que expresan calretinina (CR), somatostatina (SOM), colecistoquinina (CCK), neuropéptido Y (NPY), polipéptido vasointestinal (VIP), colina acetiltransferasa (ChAT) o una combinación de ellos. En algunos casos, uno o más elementos reguladores descritos en el presente documento dan como resultado una mayor selectividad en la expresión génica en neuronas PV en comparación con al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o más de cinco subtipos no PV GABAérgicos. En algunos casos, uno o más elementos reguladores descritos en el presente documento dan como resultado una mayor selectividad en la expresión génica en 60 neuronas PV en comparación con todas las demás células GABAérgicas no PV, o todas las demás células GABAérgicas que no expresan PV, o todas las demás células del SNC que no expresan PV, o todas las demás neuronas que no expresan PV. En algunos casos, uno o más elementos reguladores descritos en el presente documento dan como resultado una mayor selectividad en la expresión génica en neuronas PV en comparación con todas las células no PV en el SNC o todas las neuronas no PV.

- 5 [0064] En algunos casos, uno o más elementos reguladores unidos operativamente a un transgén dan como resultado la expresión selectiva del transgén en células PV, en donde el porcentaje de células PV que expresan el transgén es un porcentaje mayor que la expresión génica en células PV en donde el transgén está operativamente unido a CAG, EF1α, un promotor constitutivo (por ejemplo, SV40, CMV, UBC, PGK y CBA), o un elemento regulador no selectivo, tal como SEQ ID NO: 34, o un fragmento funcional del mismo, o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la misma. En algunos casos, uno o más elementos reguladores dan como resultado una expresión selectiva en las neuronas PV a un nivel que es al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, o al menos 50 veces en comparación con la expresión de un gen unido operativamente a CAG, EF1α, un promotor constitutivo (por ejemplo, SV40, CMV, UBC, PGK y CBA) o un elemento regulador no selectivo tal como SEQ ID NO: 34, o un fragmento funcional del mismo, o una secuencia que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la misma.
- 10 [0065] En algunos aspectos, un elemento regulador es de origen humano o comprende una secuencia que es de origen humano. En algunos casos, un elemento regulador se deriva de ratón o comprende una secuencia que se deriva de ratón. En algunos casos, un elemento regulador comprende una secuencia que no se produce de forma natural. En algunos casos, un elemento regulador no ocurre naturalmente. En algunos casos, uno o más elementos reguladores de origen humano se combinan con otro elemento regulador para generar un elemento regulador que no se produce de forma natural. En algunos casos, un elemento regulador derivado de humanos se combina con un elemento regulador derivado de ratón.
- 15 [0066] El término "derivado humano" como se usa en el presente documento se refiere a secuencias que se encuentran en un genoma humano (o una construcción del genoma humano), o secuencias homólogas al mismo. Una secuencia homóloga puede ser una secuencia que tiene una región con al menos un 80 % de identidad de secuencia (por ejemplo, medida por BLAST) en comparación con una región del genoma humano. Por ejemplo, una secuencia que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de homología a una secuencia humana se considera derivada de humanos. En algunos casos, un elemento regulador contiene una secuencia derivada de humano y una secuencia derivada de no humano de manera que en general el elemento regulador tiene una identidad de secuencia baja con respecto al genoma humano, mientras que una parte del elemento regulador tiene una identidad de secuencia del 100 % (o identidad de secuencia local) a una secuencia del genoma humano.
- 20 [0067] En algunos casos, un elemento regulador de origen humano es una secuencia que es 100 % idéntica a una secuencia humana. En algunos casos, la secuencia de un elemento regulador selectivo de tipo celular es 100 % de origen humano.
- 25 [0068] En otros casos, al menos el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de la secuencia del elemento regulador es de origen humano. Por ejemplo, un elemento regulador puede tener el 50 % de su secuencia derivada de humanos y el 50 % restante no derivada de humanos (por ejemplo, derivada de ratón o totalmente sintética). Por ejemplo, un elemento regulador que se considera 50 % derivado de humano y comprende 300 pb puede tener una identidad de secuencia general del 45 % con una secuencia en el genoma humano, mientras que los pares de bases 1-150 del ER pueden tener un 90 % de identidad (identidad de secuencia local) a una región de tamaño similar del genoma humano.
- 30 [0069] En algunos casos, una secuencia que es homóloga a una secuencia reguladora derivada de ser humano es al menos un 90 % idéntica a una secuencia humana. En algunos casos, un elemento regulador en la presente memoria comprende una secuencia que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 23-31 y 33. En algunos casos, la identidad de secuencia se mide mediante BLAST. Cuando un elemento regulador comprende una secuencia que es homóloga (por ejemplo, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % de identidad de secuencia) a una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 23-29, o un fragmento funcional o combinación de los mismos, dicho elemento regulador da como resultado una mayor expresión de un transgén operativamente unido (cuando un promotor también está presente en el vector o casete de expresión), en comparación con un vector similar sin el elemento regulador. Esta mayor expresión de un transgén se puede observar, por ejemplo, en células HEK293T o CHO.
- 35 [0070] En algunos casos, uno o más elementos reguladores comprenden una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 23-29 combinadas con o utilizadas en combinación con una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 1-22 con o sin una secuencia conectora tal como SEQ ID NO: 33. En algunos casos, dos elementos reguladores cualesquiera de esta divulgación se unen entre sí usando un conector polinucleotídico que comprende de 1 a 50 nucleótidos, tal como SEQ ID NO: 33 o una variante de la misma. En algunos casos, la secuencia conectora es una secuencia derivada de humanos. En algunos casos, la secuencia enlazadora procede de ratón o no se produce de forma natural. En algunos casos, dos elementos reguladores se unen sin un conector o sin ninguna secuencia intermedia. En algunos casos, un conector comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos. En algunos casos, la secuencia conectora es el resultado del sitio de la enzima de restricción, ligación, PCR y/o clonación.

5 [0071] En algunos casos, un elemento regulador derivado de ser humano se combina con un elemento regulador derivado de ratón, tal como SEQ ID NO: 32, que es una combinación de SEQ ID NO: 8 (una secuencia derivada de ratón) y SEQ ID NO: 23-29 (secuencias derivadas de humanos). En algunos casos, los elementos reguladores selectivos de tipo celular se combinan directamente sin una secuencia conectora adicional. En otros casos, los elementos reguladores selectivos de tipo celular se combinan con una o más secuencias enlazadoras cortas que pueden ser artefactos deliberados o de clonación. En algunos casos, una secuencia conectora comprende de 1 a 50 bases. Por ejemplo, SEQ ID NO: 31 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y 23-29 junto con 19 pb adicionales de la secuencia genómica (SEQ ID NO: 33) inmediatamente después de la secuencia de SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 32 también incluye estos 19 pb pero sin la secuencia de SEQ ID NO: 1. En otros ejemplos, los elementos reguladores selectivos de tipo celular combinados pueden incluir secuencias cortas, generalmente de menos de 50 pb, menos de 20 pb, menos de 15 pb o menos de 10 pb, de un plásmido de clonación o de un sitio de reconocimiento de enzima de restricción.

10 15 [0072] En algunos casos, los elementos reguladores pueden derivarse de secuencias de ADN no codificantes. En algunos casos, los elementos reguladores derivados del ADN no codificante están asociados con genes, como secuencias ascendentes, intrones, regiones no traducidas (UTR) 3' y 5' y/o regiones descendentes. En otros casos, elementos regulatorios derivados de las secuencias de ADN no codificantes no están asociadas con un gen. En algunos casos, los elementos reguladores se derivan de secuencias codificantes. En algunos casos, la región genómica de la que se deriva un elemento regulador es distinta de la región genómica de la que se deriva un transgén operativamente unido. En algunos casos, un ER se deriva de una región o ubicación genómica distal con respecto a la región o ubicación genómica de la que se deriva el transgén (tal como una versión natural o endógena del transgén).

20 25 30 35 [0073] En un aspecto, un elemento regulador es cualquier secuencia no codificante que module la expresión génica, por ejemplo, la selectividad de expresión en una célula objetivo. En algunos casos, la célula objetivo es una neurona fotovoltaica. En algunos casos, un elemento regulador deriva de una secuencia genómica aguas arriba de un sitio de inicio de la transcripción, una secuencia 5' UTR, una secuencia exónica, una secuencia intrónica o una secuencia 3' UTR. En algunos casos, un elemento regulador derivado de humanos comprende una secuencia intrónica derivada de humanos. En algunos casos, un elemento regulador comprende un potenciador, y su presencia en un casete de expresión junto con un promotor aumenta la expresión de un transgén operativamente unido en el tipo de célula objetivo (por ejemplo, neuronas PV) en comparación con la expresión del mismo transgén por el promotor sin el potenciador. En algunos casos, un potenciador aumenta la expresión de un transgén operativamente vinculado a través de un mecanismo transcripcional, un mecanismo postranscripcional o ambos. En algunos casos, un elemento regulador comprende una secuencia potenciadora, una secuencia promotora o una combinación de las secuencias potenciadora y promotora. En algunos casos, un elemento regulador comprende uno o más de una secuencia potenciadora derivada de humanos, una secuencia promotora derivada de humanos, una secuencia intrónica derivada de humanos y/o una combinación de las mismas.

40 45 50 [0074] En algunos casos, un elemento regulador comprende una o más de las SEQ ID NO: 1-32, o un fragmento o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos un 99 % de identidad de secuencia con el mismo. En algunos casos, un elemento regulador comprende una o más de las SEQ ID NO: 1-22, o un fragmento o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos un 99 % de identidad de secuencia con el mismo. En algunos casos, un elemento regulador comprende una o más de SEQ ID NO: 23-29, o un fragmento o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos un 99 % de identidad de secuencia con el mismo. En algunos casos, un elemento regulador comprende una o más de las SEQ ID NO: 30-32, o un fragmento o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con el mismo. En algunos casos, un elemento regulador comprende una secuencia de SEQ ID NO: 30-32, o un fragmento o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con el mismo.

55 60 [0075] En algunos casos, un elemento regulador se deriva de secuencias de ADN no humano o de secuencias genómicas tanto humanas como no humanas. En algunos casos, los elementos reguladores selectivos de tipo celular, o partes de los mismos, son homólogos a una secuencia genómica de mamífero. En algunos casos, los elementos regulatorios tienen al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad con una secuencia genómica de mamífero. En algunos casos, un elemento regulador deriva de una secuencia genómica de ratón. En algunos casos, un elemento regulador, o fragmentos del mismo, tiene al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más del 99 % de identidad con una secuencia genómica de ratón o una secuencia genómica de mamífero no humano. En algunos casos, la identidad de secuencia se mide mediante BLAST. En algunos casos, los elementos reguladores pueden comprender cualquiera de las SEQ ID NO: 1-33, o un fragmento o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con el mismo.

65 [0076] En algunos casos, los elementos reguladores selectivos de tipo celular son cortos. En algunos casos, el tamaño de los elementos reguladores es compatible con la capacidad de clonación de un vector, por ejemplo, un vector viral o rAAV, de manera que el tamaño combinado de un transgén y uno o más elementos reguladores no excede la capacidad

- de clonación de un vector. En algunos casos, los elementos reguladores selectivos de tipo celular tienen una longitud de hasta aproximadamente 2050 pb, 2000 pb, 1900 pb, 1800 pb, 1700 pb, 1600 pb, 1500 pb, 1400 pb, 1300 pb, 1200 pb, 1100 pb, 1000 pb, 900 pb, 800 pb, 700 pb, 600 pb, 500 pb, 400 pb, 300 pb, 200 pb o 100 pb. En algunos casos, los elementos reguladores selectivos de tipo celular tienen una longitud total de no más de aproximadamente 20 pb, 30 pb, 40 pb, 50 pb, 60 pb, 70 pb, 80 pb, 90 pb, 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1000 pb, 1010 pb, 1020 pb, 1030 pb, 1040 pb, 1050 pb, 1060 pb, 1070 pb, 1080 pb, 1090 pb, 1100 pb, 1200 pb, 1300 pb, 1600 pb, 1700 pb, 1800 pb, 1900 pb o 2000 pb. En algunos casos, los elementos reguladores selectivos de tipo celular tienen una longitud de aproximadamente 100 pb-1100 pb, 100 pb-1000 pb, 100 pb-900 pb, 200 pb-900 pb, 200 pb-800 pb, 300 pb-600 pb, 400 pb-800 pb, 500 pb-600 pb, o 600 pb -900 pb. En algunos casos, un elemento regulatorio está entre aproximadamente 400-600 pb, 400-600 pb, 400-700 pb, 400-800 pb, 400-900 pb, 400-1000 pb o 400-1500 pb. En algunos casos, un elemento regulatorio está entre aproximadamente 500-600 pb, 500-700 pb, 500-800 pb, 500-900 pb, 500-1000 pb o 500-1500 pb. En algunos casos, se combinan dos o más elementos reguladores para formar un elemento regulador selectivo de tipo celular más grande de 1300-2500 pb, 1300-2060 pb, aproximadamente 1350 pb, aproximadamente 2050 pb o aproximadamente 1880 pb.
- [0077] En algunos casos, se pueden combinar dos o más elementos reguladores selectivos de tipo celular. Por ejemplo, se pueden combinar dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más elementos reguladores selectivos de tipo celular. Por ejemplo, SEQ ID NO: 30 comprende secuencias de siete elementos reguladores, es decir, SEQ ID NO: 23-29, todos los cuales derivan de una secuencia genómica humana. En algunos casos, los elementos reguladores selectivos de tipo celular se refieren a elementos reguladores selectivos de neuronas PV.
- [0078] En algunos casos, un elemento regulador selectivo de tipo celular se repite dos o más veces para crear un elemento regulador combinado que también es selectivo de tipo celular o tiene una propiedad selectiva de tipo celular mejorada. En algunos casos, se combinan dos o más elementos reguladores con diferente selectividad de tipo celular. En algunos casos, un elemento regulador selectivo de tipo celular se combina con un elemento regulador no selectivo, por ejemplo, un elemento potenciador no selectivo que impulsa una alta expresión génica. Por ejemplo, un elemento regulador promotor con alta selectividad para una célula objetivo se puede combinar con un elemento regulador con alta eficiencia de expresión. En algunos casos, uno o más elementos reguladores selectivos del tipo celular se combinan con uno o más elementos reguladores de alta eficiencia. Por ejemplo, una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 1-32, o un fragmento o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos Una identidad de secuencia del 99 % con la misma se puede combinar con un promotor constitutivo, tal como un promotor GAD2, un promotor de sinapsina humana, un promotor minCMV, una caja TATA, un promotor supercore o un promotor EF1a, o una combinación de los mismos.
- [0079] En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona una lista de elementos reguladores que se pueden agregar a cualquier terapia génica para dar como resultado la expresión génica selectiva en un tipo de célula objetivo, tal como una neurona PV sobre uno o más tipos de células no objetivo, tales como células del SNC no PV, incluidas, entre otras, células excitadoras y/o células GABAérgicas no PV.
- [0080] En algunos casos, los elementos reguladores selectivos de tipo celular se pueden combinar con otros elementos reguladores tales como un promotor de alta expresión o una secuencia que aumenta la estabilidad del ARNm. En algunos casos, uno o más elementos reguladores selectivos de tipo celular se combinan con una secuencia humana, no humana o no de mamífero, por ejemplo un promotor hSyn1, un promotor CBA, un promotor CMV, un promotor EF1a, una señal poliA (por ejemplo, señal SV40 poliA), o un elemento regulador postranscripcional tal como elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE).
- [0081] En algunos casos, los elementos reguladores combinados pueden provenir de diferentes especies. Los elementos reguladores combinados pueden provenir de diferentes regiones genómicas dentro de una especie. En algunos casos, los elementos reguladores se derivan de secuencias genómicas distales, por ejemplo, se combinan secuencias que no se asocian normal o naturalmente entre sí o con un tipo de célula de interés. En algunos casos, los elementos reguladores individuales utilizados para formar un elemento regulador combinado pueden provenir de diferentes cromosomas humanos.
- [0082] En un aspecto, un elemento regulador de la divulgación comprende un fragmento funcional de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-32, o una combinación de las mismas, o secuencias que tienen al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 99 % de identidad de secuencia con el mismo. Dicho fragmento funcional puede aumentar la expresión de un transgén en un casete o vector de expresión en comparación con un casete o vector de expresión similar sin el elemento regulador. Dicho fragmento funcional puede funcionar como un potenciador para aumentar la expresión selectiva del tipo celular cuando el fragmento está unido operativamente a un transgén en comparación con un vector o casete similar sin el fragmento funcional. Un fragmento tiene preferiblemente más de 30, 40, 50 o 60 pb de longitud.
- [0083] En algunos casos, un elemento regulador selectivo de células PV o cualquier elemento regulador de esta divulgación comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 1-32, (ii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 1-32, (iii) un fragmento funcional de cualquier secuencia de

- (i) o (ii), o (iv) una combinación de cualquier secuencia de (i), (ii) y/o (iii). En algunos casos, la identidad de secuencia se mide mediante BLAST. En algunos casos, dos o más de las SEQ ID NO: 1-29, o un fragmento funcional o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos al menos un 99 % de identidad de secuencia con las mismas, se usan como elemento regulador para aumentar la expresión transgénica selectivamente en células PV en comparación con células del SNC no PV, o en cualquier tipo de célula objetivo en comparación con el tipo de célula no objetivo. En algunos casos, un fragmento funcional es aquel que da como resultado una expresión selectiva en un tipo de célula objetivo sobre uno o más tipos de células no objetivo.
- 5 [0084] En algunos casos, se pueden usar dos o más copias de un elemento regulador para mejorar la expresión selectiva en una célula objetivo, por ejemplo, dos o más copias de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-29, o un fragmento o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con las mismas.
- 10 [0085] En otros casos, una o más de las SEQ ID NO: 1-32, o un fragmento o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la misma, están operativamente unidos a otro elemento regulador, tal como un promotor o potenciador, para aumentar aún más la expresión selectiva en una célula objetivo. En algunos casos, se puede mejorar cualquier terapia génica añadiendo uno o más elementos reguladores como se describe en el presente documento para mejorar o aumentar la expresión de la terapia génica en una célula objetivo en comparación con células no objetivo. En algunos casos, la célula objetivo son las neuronas PV o las células GABAérgicas que expresan parvalbúmina.
- 15 [0086] En algunos aspectos, uno o más elementos reguladores (por ejemplo, uno cualquiera o más de SEQ ID NO: 1-32, o un fragmento o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma) divulgados en el presente documento muestran selectividad de tipo celular para un tipo de célula objetivo en al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, o más de cinco tipos de células no objetivo. En algunos casos, un elemento regulador impulsa la expresión selectiva o la expresión preferencial en un subtipo de célula objetivo sobre al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o más de cinco subtipos no objetivo, o todos. otros subtipos conocidos de la célula. Por ejemplo, las células GABAérgicas comprenden diferentes subtipos, incluidas las células fotovoltaicas. En 20 algunos casos, el tipo de célula objetivo es una célula PV. En algunos casos, uno o más elementos reguladores son selectivos para células fotovoltaicas sobre al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o más de cinco tipos de células no objetivo. En algunos casos, uno o más elementos reguladores son selectivos para las células fotovoltaicas sobre todos los demás tipos de células del SNC conocidos.
- 25 [0087] En algunos casos, una cualquiera o más de SEQ ID NO: 1-32, o un fragmento o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos un 99 % de identidad de secuencia con el mismo, se puede combinar con una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 1-32, o un fragmento o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con el mismo. En algunos casos, dichos elementos reguladores 30 combinados se unen utilizando un conector de 1 a 50 nucleótidos. En algunos casos, estos elementos regulatorios combinados no están vinculados.
- 35 [0088] En algunos casos, uno o más elementos reguladores descritos en el presente documento, cuando se unen operativamente a cualquier transgén (por ejemplo, un transgén informador o un transgén terapéutico), impulsa la expresión selectiva o la expresión preferencial en al menos un tipo de célula objetivo a un nivel que es estadísticamente significativamente mayor que la expresión impulsada por CAG, EF1a, un promotor constitutivo (por ejemplo, SV40, CMV, UBC, PGK y CBA), o un elemento regulador no selectivo (por ejemplo, SEQ ID NO: 34, o un fragmento del mismo, o una secuencia que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con el mismo) cuando se une operativamente al mismo transgén, o mediante la misma 40 construcción sin los elementos regulatorios. En algunos casos, significa estadísticamente significativamente más alto que los elementos reguladores impulsan la expresión selectiva en el tipo de célula objetivo a un nivel que es al menos 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 veces el nivel de expresión por CAG, EF1a, un promotor constitutivo (p. ej., SV40, CMV, UBC, PGK y CBA), o un elemento regulador no selectivo cuando está operativamente 45 vinculado al mismo transgén, o mediante la misma construcción sin los elementos reguladores. En algunos casos, dicha expresión selectiva de tipo celular se analiza usando un ensayo de colocalización como se describe en el presente documento. En algunos casos, el tipo de célula objetivo es una célula de parvalbúmina. En algunos casos, dicho ensayo de colocalización se realiza utilizando un anticuerpo anti-PV. En algunos casos, dicho ensayo de colocalización se realiza utilizando un ratón PV-Cre como se describe en el presente documento. En algunos casos, el elemento regulador no 50 selectivo es la SEQ ID NO: 34, o un fragmento de la misma, o una secuencia que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con el mismo.
- 55 [0089] Los términos "casete de expresión" y "casete de ácido nucleico" se usan indistintamente para referirse a una molécula de polinucleótido o una secuencia de ácido nucleico. En algunos casos, un casete de expresión comprende uno

Casetes de expresión

- 60 [0089] Los términos "casete de expresión" y "casete de ácido nucleico" se usan indistintamente para referirse a una molécula de polinucleótido o una secuencia de ácido nucleico. En algunos casos, un casete de expresión comprende uno

o más elementos reguladores descritos en el presente documento unidos operativamente a un transgén. En algunos casos, un casete de expresión comprende uno o más elementos reguladores. En algunos casos, un casete de expresión comprende uno o más elementos reguladores selectivos de tipo celular descritos en el presente documento. En algunos casos, un casete de expresión comprende uno o más elementos reguladores selectivos de células PV descritos en el presente documento. En algunos casos, el casete de expresión comprende además un promotor. En algunos casos, un casete de expresión comprende una o más secuencias de SEQ ID NO: 1-32 y/o cualquier combinación de las mismas. En algunos casos, un casete de expresión comprende una o más de las SEQ ID NO: 1-32, (ii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 1-32, (iii) un fragmento funcional de cualquier secuencia de (i) o (ii), o (iv) una combinación de cualquier secuencia de (i), (ii) y/o (iii). En algunos casos, la identidad de secuencia se mide mediante BLAST. En algunos casos, un elemento regulador está situado aguas arriba de un transgén en un casete de expresión. En algunos casos, un elemento regulador está situado aguas abajo de un transgén en un casete de expresión. En algunos casos, un casete de expresión comprende además un promotor, por ejemplo, un promotor hSyn1, un promotor CBA, un promotor CMV, un promotor EF1a, una señal poliA (por ejemplo, señal poliA SV40), o un elemento regulador postranscripcional tal como elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE).

[0090] En algunos aspectos, uno o más elementos reguladores descritos en el presente documento están unidos operativamente a un transgén en un casete de expresión. En algunos casos, una terapia génica comprende un casete de expresión que comprende un transgén operativamente unido a uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, o cinco o más elementos reguladores de la presente divulgación para dar como resultado la expresión selectiva del transgén en un tejido o tipo de célula objetivo, como las neuronas PV. En algunos casos, un casete de expresión comprende uno o más elementos reguladores selectivos de células PV o uno o más elementos reguladores descritos en el presente documento unidos operativamente a un transgén, por ejemplo, un gen indicador, eGFP, SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3, STXBP1, una proteína de unión a ADN, o una variante o un fragmento de la misma, o secuencias que tienen al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos al menos 99 % de identidad de secuencia con el mismo.

[0091] En algunos casos, se adapta un casete de expresión para su administración mediante terapia génica. En algunos casos, un casete de expresión es una construcción lineal o circular. En algunos casos, un casete de expresión es parte de un plásmido, vector, vector viral o rAAV.

[0092] En algunos casos, una terapia génica se administra directamente al SNC de un sujeto que lo necesita o sistemáticamente mediante inyección y/o infusión. En algunos casos, a dicho sujeto se le ha diagnosticado una enfermedad o afección asociada con una haploinsuficiencia o una mutación genética, tal como una haploinsuficiencia o una mutación en cualquiera de los siguientes genes: SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3 o STXBP1. En algunos casos, el sujeto tiene riesgo de padecer o tiene síndrome de Dravet, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, neurodegeneración, tauopatía, hipoexcitabilidad neuronal y/o convulsiones. En algunos casos, dicha terapia génica se administra mediante un virus o un vector viral, como rAAV. En algunos casos, se utiliza un serotipo de AAV con tropismo por las células del SNC y/o capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica, tal como AAV9 o una variante del mismo.

[0093] En algunos casos, uno o más elementos reguladores (por ejemplo, uno o más de SEQ ID NO: 1-32, o un fragmento o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma) operativamente unido a un transgén en un casete de expresión dan como resultado la expresión génica selectiva en células PV en comparación con células del SNC no PV, o en comparación con un elemento de control, tal como un CAG, EF1a, un promotor constitutivo (por ejemplo, SV40, CMV, UBC, PGK y CBA), o un elemento regulador no selectivo (por ejemplo, SEQ ID NO: 34, o un fragmento funcional del mismo, o una secuencia que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la misma). En algunos casos, los elementos reguladores dan como resultado que al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % de todas las células que expresan el transgén sean neuronas PV. En algunos casos, los elementos reguladores dan como resultado una expresión genética selectiva en las neuronas PV que es aproximadamente 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 7,5 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces mayor de lo esperado para la distribución natural de las neuronas PV en el SNC. En algunos casos, un elemento regulador impulsa la expresión selectiva en células PV, en donde el porcentaje de células PV que expresan el transgén es un porcentaje que es al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces o al menos 10 veces mayor que la distribución esperada de células fotovoltaicas en el SNC, o al menos 1-5 %, 5 %-10 %, 10-15 %, 15-20 %, 20-25 %, 25-30 %, 30-35 %, 35-40 %, 40-45 %, 45-50 %, 50-55 %, 55-60 %, 65-70 %, 70-75 %, 75-80 %, 80-85 %, 85-90 % o 90-95 % mayor que la expresión en células PV cuando el transgén está operativamente unido a CAG, EF1a, un promotor constitutivo (p. ej., SV40, CMV, UBC, PGK y CBA), o un elemento regulador no selectivo que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 34, o un fragmento funcional del mismo, o una secuencia que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma, y según se mide en un ensayo de colocalización inmunohistoquímica. En algunos casos, un elemento regulador en un casete de expresión, o el uso de dicho elemento regulador en un casete de expresión, da como resultado la expresión génica selectiva en células PV, o células PV en el

SNC, o neuronas PV, en donde aproximadamente 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de las células que expresan el transgén son positivas para PV.

[0094] En algunos casos, un casete de expresión o una terapia génica comprende uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, o diez o más elementos reguladores como se describe en la **TABLA 1**, por ejemplo, SEQ ID NO: 1-32, o un fragmento funcional o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 99 % de identidad de secuencia con el mismo.

[0095] En algunos casos, uno o más elementos reguladores selectivos de células PV o uno o más elementos reguladores descritos en el presente documento están unidos operativamente a cualquier transgén en un casete de expresión. En algunos casos, el casete de expresión es una terapia génica. En algunos casos, el casete de expresión es parte de un vector o un plásmido, por ejemplo, un vector viral o un vector rAAV. En algunos casos, el casete de expresión es parte de AAV1, AAV8, AAV9 o AAVDJ o una variante o híbrido de los mismos. En algunos casos, el casete de expresión comprende uno o más elementos reguladores selectivos de células PV o uno o más elementos reguladores divulgados en el presente documento unidos operativamente a un transgén, en donde el transgén es SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KAV3.2, KV3.3, STXBP1, proteína de unión a ADN (por ejemplo, modulador transcripcional de un gen endógeno), o una variante o un fragmento funcional de la misma, o una secuencia que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 99 % de identidad de secuencia con el mismo. En algunos casos, dichos elementos reguladores aumentan la expresión selectiva del transgén en las neuronas PV en comparación con los tipos de células del SNC que no son PV. En algunos casos, dichos elementos reguladores aumentan la expresión del transgén de forma selectiva en un tipo de célula objetivo, como una neurona PV. En algunos casos, el tipo de célula objetivo es una célula fotovoltaica.

[0096] Las técnicas contempladas en el presente documento para la terapia génica de células somáticas incluyen la administración a través de un vector viral (por ejemplo, retroviral, adenoviral, AAV, sistemas adenovirales dependientes de ayuda, sistemas adenovirales híbridos, herpes simple, poxvirus, lentivirus y virus de Epstein-Barr), y sistemas no virales, como sistemas físicos (ADN desnudo, bombardeo de ADN, electroporación, hidrodinámica, ultrasonido y magnetofección) y sistemas químicos (lípidos catiónicos, diferentes polímeros catiónicos y polímeros lipídicos).

[0097] La capacidad de clonación de vectores o vectores de expresión virales es un desafío particular para la expresión de transgenes grandes. Por ejemplo, los vectores de AAV suelen tener una capacidad de empaquetado de ~4,8 kb, los lentivirus suelen tener una capacidad de ~8 kb, los adenovirus suelen tener una capacidad de ~7,5 kb y los alfavirus suelen tener una capacidad de ~7,5 kb. Algunos virus pueden tener mayores capacidades de empaquetamiento, por ejemplo el herpesvirus puede tener una capacidad de >30kb y el vaccinia una capacidad de ~25kb. Las ventajas de utilizar AAV para la terapia génica incluyen baja patogenicidad, muy baja frecuencia de integración en el genoma del huésped y la capacidad de infectar células en división y no en división.

[0098] Para abordar las limitaciones de tamaño de ciertos vectores virales o para mejorar la expresión de vectores virales, la presente divulgación contempla el uso de elementos reguladores que son más cortos que 2,5 kb, 2 kb, 1,5 kb, 1 kb, 900 pb, 800 pb, 700 pb, 600 pb, 500 pb, 400 pb, 300 pb, 200 pb, 150 pb o 110 pb, pero al menos 10 pb, 50 pb o 100 pb de longitud. En algunos casos, el tamaño del elemento regulatorio combinado es de aproximadamente 2500 pb, 2000 pb, 1500 pb, 1400 pb, 1300 pb, 1200 pb, 1100 pb o 1000 pb. En algunos casos, cada elemento regulatorio combinado tiene una longitud total de aproximadamente 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1000 pb, 1100 pb, 1200 pb, 1300 pb, 1400 pb, 1600 pb, 1700 pb, 1800 pb, 1900 pb, 2000 pb, 2100 pb, 2200 pb, 2300 pb, 2400 pb o 2500 pb. En algunos casos, el tamaño de un ER combinado tiene una longitud total de aproximadamente 200 pb-3000 pb, 200 pb-2500 pb, 200 pb-2100 pb, 500 pb-2500 pb, 1000 pb-2500 pb, 1500 pb-2500 pb, 1500b-2000 pb o 2000 pb-2500 pb.

[0099] En algunos casos, un elemento regulador de la divulgación es preferiblemente (i) uno que impulsa selectivamente la expresión en un tipo de célula de interés, tal como células PV; (ii) incluye una secuencia derivada de humanos, y (iii) es menor de 2,5 kb, 2 kb, 1,5 kb o 1 kb.

[0100] También se contemplan en este documento cassetes de expresión, que pueden ser una molécula de ácido nucleico circular o lineal. En algunos casos, se administra un casete de expresión a células (por ejemplo, una pluralidad de células o tipos de células diferentes que incluyen células o tipos de células objetivo y/o tipos de células no objetivo) en un vector (por ejemplo, un vector de expresión). Un vector puede ser un vector integrante o no integrante, en referencia a la capacidad del vector para integrar el casete de expresión y/o el transgén en un genoma de una célula. Puede usarse un vector integrante o un vector no integrante para administrar un casete de expresión que contiene un transgén operativamente unido a un elemento regulador. Los ejemplos de vectores incluyen, entre otros, (a) vectores no virales tales como vectores de ácido nucleico que incluyen oligonucleótidos lineales y plásmidos circulares; cromosomas artificiales tales como cromosomas artificiales humanos (HAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC) y cromosomas artificiales bacterianos (BAC o PAC); vectores episomales; transposones (por ejemplo, PiggyBac); y (b) vectores virales tales como vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores adenovirales y vectores AAV. Los virus tienen varias ventajas para la administración de ácidos nucleicos, incluida una alta infectividad y/o tropismo por ciertas células o tejidos objetivo. En algunos casos, se usa un virus para administrar una molécula de ácido nucleico o un casete de expresión

que comprende uno o más elementos reguladores, como se describe en el presente documento, unidos operativamente a un transgén.

- 5 **[0101]** Las características preferidas de los vectores de terapia génica viral o de los vectores de administración de genes incluyen la capacidad de ser reproducibles y de propagarse y purificarse de manera estable a títulos elevados; para mediar en la entrega dirigida (por ejemplo, para entregar el transgén específicamente a un tejido u órgano de interés sin una diseminación generalizada del vector en otros lugares o una entrega fuera del objetivo); y mediar en la entrega de genes y/o la expresión transgénica sin inducir efectos secundarios dañinos o efectos fuera del objetivo. Para evitar posibles efectos secundarios dañinos, se puede lograr una expresión dirigida o una expresión selectiva de tipo de tejido/célula colocando el transgén bajo el control de un elemento regulador selectivo de tipo de célula, por ejemplo, una o más de las SEQ ID NO: 1-32, o un fragmento funcional o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con el mismo, un potenciador, promotor, elemento de estabilidad, UTR, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, pueden diseñarse partículas virales que contienen un vector viral para infectar muchos tipos de células diferentes, pero la expresión del transgén se potencia y/u optimiza en un tipo de célula de interés (por ejemplo, neuronas PV), y la expresión del transgén se reduce y/o se optimiza, o minimizado en otros tipos de células no objetivo (p. ej., células del SNC no fotovoltaicas). La expresión diferencial del transgén en diferentes tipos de células puede controlarse, diseñarse o manipularse usando diferentes factores de transcripción o elementos reguladores que sean selectivos para uno o más tipos de células. En algunos casos, uno o más elementos reguladores, tales como un promotor o potenciador, o una combinación de los mismos, están unidos operativamente a un transgén para impulsar la expresión selectiva del transgén en tejidos o células. En algunos casos, uno o más elementos reguladores usados en una terapia génica o un vector impulsan la expresión génica de una manera selectiva del tipo celular, es decir, confieren expresión génica selectiva en una célula, tipo celular o tejido objetivo, y/o no impulsan la expresión génica selectiva, expresión génica en una o más (p. ej., al menos una, dos, tres o cuatro) células o tipos de células fuera del objetivo. En algunos casos, uno o más elementos reguladores unidos operativamente a un transgén potencian la expresión selectiva del transgén en una célula, tipo de célula o tejido objetivo, mientras que uno o más elementos reguladores suprimen la expresión del transgén en células, tipo de célula, o tejido, o confiere una expresión genética significativamente menor, de minimis o estadísticamente menor en una o más células, tipos de células o tejidos fuera del objetivo.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30 **[0102]** Se han diseñado varios serotipos de AAV, parvovirus no patógeno, con el fin de administrar genes, algunos de los cuales se sabe que tienen tropismo por ciertos tejidos o tipos de células. Los virus utilizados para diversas aplicaciones de terapia génica pueden diseñarse para que tengan una replicación deficiente o tengan baja toxicidad y baja patogenicidad en un sujeto o huésped. Dichos vectores basados en virus se pueden obtener eliminando todas, o algunas, de las regiones codificantes del genoma viral, y dejando intactas aquellas secuencias (por ejemplo, secuencias repetidas terminales invertidas) que son necesarias para funciones tales como empaquetar el genoma del vector en el cápside del virus o la integración del ácido nucleico del vector (p. ej., ADN) en la cromatina del huésped. Un casete de expresión que comprende un transgén, por ejemplo, puede clonarse en un esqueleto viral tal como un esqueleto viral modificado o diseñado que carece de genes virales, y usarse junto con vectores adicionales (por ejemplo, vectores de empaquetamiento), que pueden, por ejemplo, cuando cotransfectados, producen partículas de vectores virales recombinantes. En algunos casos, se prefiere un serotipo de AAV que pueda cruzar la barrera hematoencefálica o infectar células del SNC. En algunos casos, se usa AAV9 o una variante del mismo para administrar un casete de expresión de esta divulgación, que comprende uno o más elementos reguladores selectivos de PV unidos operativamente a un transgén.
- 35
- 40
- 45 **[0103]** Una ventaja de administrar cassetes de expresión de esta divulgación usando terapia génica, por ejemplo, rAAV, como se describe en el presente documento, es que dichas terapias pueden proporcionar efectos terapéuticos más específicos y sostenidos a lo largo del tiempo. Además, las terapias génicas virales se pueden diseñar para que tengan tropismo por un tipo de célula o tejido de interés sobre tipos de células o tejidos no objetivo. Por ejemplo, las terapias génicas virales pueden diseñarse para infectar y administrar una carga útil o un agente terapéutico, por ejemplo, un modulador transcripcional o un transgén, a una o más regiones, tejidos o tipos de células dentro del SNC (por ejemplo, células PV), mientras que tiene efectos mínimos en tejidos o tipos de células fuera del objetivo (por ejemplo, tejidos o tipos de células no pertenecientes al SNC, células del SNC no fotovoltaicas). En algunos casos, se pueden diseñar terapias génicas virales para administrar un transgén a través de la barrera hematoencefálica y/o apuntar a una región o tejido específico dentro del SNC (por ejemplo, hipocampo) o un tipo de célula dentro del SNC, por ejemplo, células PV.
- 50
- 55 **[0104]** En algunos casos, un vector de AAV o una partícula viral de AAV, o virión, usado para administrar uno o más elementos reguladores y un transgén en una célula, tipo de célula o tejido, in vivo o in vitro, es preferiblemente deficiente en replicación. En algunos casos, un virus AAV está diseñado o modificado genéticamente para que pueda replicarse y generar viriones sólo en presencia de factores auxiliares.
- 60 **[0105]** En algunos casos, el casete de expresión está diseñado para su administración mediante un AAV o un AAV recombinante (rAAV). En algunos casos, se administra un casete de expresión usando un lentivirus o un vector lentiviral. En algunos casos, los transgenes más grandes, es decir, genes que exceden la capacidad de clonación del AAV, se administran preferiblemente usando un lentivirus o un vector lentiviral.
- 65

5 [0106] El AAV utilizado en las composiciones y métodos descritos en el presente documento puede ser de cualquier serotipo (por ejemplo, VAA1, VAA2, VAA5, VAA8, VAA9 y VAA9D), incluidos serotipos de VAA híbridos o químéricos. En algunos casos, el AAV se utiliza para administrar y/o expresar un transgén operativamente unido a uno o más elementos reguladores que son selectivos para las neuronas PV en comparación con las células del SNC no PV. En algunos casos, se utiliza un AAV con un alto tropismo por las células del SNC y/o que atraviesa la barrera hematoencefálica. En algunos casos, se utilizan AAV1, AAV8, AAV9 y/o AAV9D para administrar un casete de expresión descrito en el presente documento.

10 [0107] En algunos casos, un casete de expresión comprende uno o más elementos reguladores selectivos de células PV o uno o más elementos reguladores divulgados en el presente documento unidos operativamente a un transgén que se sabe que se expresa insuficientemente *in vivo*, tal como en una enfermedad o afección asociada con haploinsuficiencia en el gen. En algunos casos, el transgén es un canal iónico dependiente de voltaje (por ejemplo, un canal iónico de sodio o un canal iónico de potasio), un regulador de neurotransmisor o una subunidad o fragmento funcional del mismo. En algunos aspectos, el transgén es una proteína de unión a ADN, un canal iónico, un regulador de neurotransmisor o una subunidad del canal iónico o regulador de neurotransmisor. En algunos casos, el transgén es una proteína de unión al ADN que comprende uno o más dedos de zinc. En algunos casos, la proteína de unión al ADN comprende un dominio de Cas9, una proteína de la familia Cas, Cas9 inactivada por nucleasa (o dCas9), una proteína de la familia dCas o un efecto similar a un activador transcripcional (TALE). En algunos casos, el transgén es una proteína de unión a ADN que comprende un dominio de unión a ADN de una proteína de unión a ADN o una proteína de escisión de ADN (por ejemplo, una nucleasa, una enzima de restricción, una recombinasa, etc.) en donde el dominio de escisión de ADN o dominio de nucleasa se ha desactivado, por ejemplo, una Cas desactivada por nucleasa (dCas), una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción desactivada o una proteína con dedos de zinc desactivada por nucleasa. En algunos casos, el dominio de unión al ADN está unido a un dominio modulador de la transcripción (p. ej., un dominio activador o represor de la transcripción). En algunos casos, el transgén comprende una proteína de edición de genes, por ejemplo, una proteína Cas, Cas9.

15 [0108] En algunos aspectos, el transgén es un canal iónico dependiente de voltaje o una subunidad del mismo, tal como SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2 o KV3.3, o un fragmento funcional o variante del mismo. En algunos casos, el transgén es una subunidad alfa de un canal iónico de sodio. En algunos casos, el transgén es una subunidad beta de un canal iónico de sodio. En algunos aspectos, el regulador del neurotransmisor es STXBP1 o un fragmento funcional o variante del mismo.

20 [0109] En algunos aspectos, un casete de expresión se administra como un vector viral, tal como AAV. En algunos aspectos, el AAV es AAV1, AAV8, AAV9, AAV-DJ, scAAV1, scAAV8 o scAAV9. En algunos aspectos, una terapia génica que comprende un casete de expresión de esta divulgación se administra a un sujeto que lo necesita (por ejemplo, un paciente humano, un mamífero, un animal transgénico o un modelo animal). En algunos casos, el sujeto que lo necesita tiene síntomas, ha sido diagnosticado o tiene riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer, síndrome de Dravet, epilepsia, neurodegeneración, tauopatía, hipoexcitabilidad neuronal y/o convulsiones. En algunos casos, el sujeto que lo necesita tiene una expresión genética insuficiente o una mutación en uno o más de SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3 y STXBP1.

25 [0110] En algunos casos, se usa una terapia génica, tal como rAAV9, para administrar un casete de expresión que comprende uno o más elementos reguladores selectivos de células PV o uno o más elementos reguladores descritos en el presente documento unidos operativamente a un transgén, en donde el transgén es SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3, STXBP1, una proteína de unión a ADN, o un fragmento funcional de la misma, o una secuencia que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % secuencia identidad con cualquiera de SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3, STXBP1, una proteína de unión a ADN o un fragmento funcional de la misma. En algunos casos, el transgén comprende una secuencia que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 37-43, o un fragmento funcional de la misma, como se proporciona en la TABLA 2 abajo.

30 [0111] En algunos casos, el transgén es cualquiera de las SEQ ID NO: 36-43, o un fragmento funcional del mismo, o secuencias que tienen al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con el mismo. En algunos casos, uno o más elementos reguladores divulgados en el presente documento están unidos operativamente a cualquiera de las SEQ ID NO: 36-43 en un casete de expresión, o un fragmento funcional del mismo, o secuencias que tienen al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 80 %, al menos 85 % de al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con el mismo.

35

40

45

50

55

60

TABLA 2: Lista de secuencias de aminoácidos divulgadas en el presente documento.

SEQ NO.	ID NO.	Gene	Secuencia de aminoácidos
5	36	eGFP	MVKGEELFTGVVPILVELGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTKE ICTIGKLPVPWPTLVTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYV QERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDPKEDGNILGHKL EYNYNSHNYYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTP GDGPVLLPDNHYLSTOSALSKDPNEKRDHMVLL
10	37	SCN1B	MGTLLALVVGAAALVSSAWGGCVEVDSDEAVYGMTFKILCISCKRRS ETTAETFTIEWTFRQKGTEEFVKILRYENEVLQLEEDERFEGRVVWNG SRGTYKDLQDLSIFITNTVNHSGDYECHVYRLLFDNYEHNTSVVKI HLEVVVDKANRDMASIVSEIMMYVLIVVLTIVLVAEMVYCYKKIAAA TEAAAQENASEYLAITSESKENCTGVQVAE
15	38	SCN2B	MHRDAWLPRPAFSLTGLSLPPSLVPPGRSMEVTVPATLNVLNGSD ARLPCTFNSCYTVNHKQPSLNWTYQECNNCSEEMFLQFRMKIINLKL ERFQDRVEPSGNPSKYDVSVMLRNVQPEDEGIYNCYIMNPPDRHRGH GKHLQVLMEEPPERDSTVAVIVGASVGGFLAVVILVLMVVKCVRRK KEQKLSTDDLKTEEEGKTDGEGNPDDGAK
20	39	SCN1A	MEQTVLVPPGPDSFNFTTRESLAAIERRIAEEKAKNPKPDKKDDENG PKPNSDLEAGKNLPFIYGDIPPEMVSEPLEDLDPYYINKKTFIVLNKGK
25			
30			
35			
40			
45			
50			
55			
60			
65			

(Continuación)

SEQ NO.	ID	Gene	Secuencia de aminoácidos
5			AIFRESATSALYILTPNPLRKIAIKILVHSLFSMLIMCTILTCVFM
10			TMSNPPDWTKNVEYFTFTGIYTFESLIKIHARGFCLEDFTFLRDPWNWLDFV
15			ITFAYVTEFVDLGNVSALRTFRVLRAKLTISVIPGLKTIIVGALIQSVKK
20			LSDVMILTVFCLSVFALIGLQLFMGNLRNKCIQWPPTNASLEEHIEKN
25			ITVNYNGLTLINEVFEFDWKSYIQDSRYHYFLEGFLDALLCGNSSDAG
30			QCPEGYMCVKAGRNPNGYTSFDTFSWAFLSLFRLMTQDFWENLYQ
35			LTLRAAGKTYMIFFLVLFIFGSFYLINLILAVVAMAYEEQNQATLEEA
40			EQKEAEFQQMIEQLKKQQEAAQQAATATASEHSREPSAAGRILSDSSS
45			EASKLSSKSAKERNNRRKKRKQKEQSGGEEKDEDEFQKSESEDSIRRK
50			GFRFSIEGNRLTYEKRYSSPHQSLLSIRGSLFSPRRNSRTSLSFRGRAK
55			DVGSENDFADDEHSTFEDNESRRDSLFPVPRRHGERRNSNLSQTSSR
60			MLAVFPANGKMHSTVDCNGVSLVGGPSVPTSPVGQQLPEVHDKPA
65			TDDNGTTTETEMRKRRSSSFHVSMDFLEDPSQRQRAMSIAILTNTVE

(Continuación)

SEQ NO.	ID NO.	Gene	Secuencia de aminoácidos
5	40	STXBP 1	MAPIGLKA VVG EKIMHD VIKK VKK GEWK VL VVDQL SMRMLSSCC KMT DIMTEG I TIVEDINKR REPLPS LEAV YLITPSEK SVHSLISDFKDPPT AKYRAAHV FFTDSCP D ALF NELV KSRAAKV IKT LTEINIAFLPYE S QV YSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPILERLAEQIATLCA TLKEYPAVRYR GEYKD NALLAQLI QDKL DAYK ADDPTMGEOPDKAR S QLLI LDRGFDP SSPV LHELT FQAMS Y DLLPIE NDVY KYETSGI GEARVKEVLL DEDDDL WIALRH K HIAEV SQEV TRSLKDFSSS KRMNTGEKTTMRDL S QMLKK MPQYQK ELSKYSTHLH LAEDCMKHYQGTVDKL CRV E QDLAM GTDA EGEKIKDPMRAI VPI LLDANVSTYDKI RILLYI FLKNGITEENLNKLIQH AQIPPEDSEI TNMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPERKERI SEQTYQLSRWT PIHKD IMEDTIE DKLDTKHYPI 1STRSSASFSTTAVSARYGHWHK NKA P GEYRSGP RLHIFILGGVSLNEMRCAYEV TQANGKWEVLIGSTHILPTK FLMDLRH P D FRESS RVS FED OAPTME
10	41	Kv3.1	MGQGDESERIVNVGGTRHQ TYRSTLRTLPGTRLAWLAEPDAHSHFD YDPRADEEFFFDRIHPGVFAIHLNYYRTGKLHCPADVCGPLYEEELAFW GIDETDVEPCCWMTYRQHRDAEEALDSPGGAPLDNSADDADADGPG DSGDGEDELEMTRKLALSDSPDGPGFWRRWQPRIWALFEDPYSSR YARYVAFASLFFILV SITTFCLETHEFNP IVNKTEIENVRNGTQV RYY REAETEAFLTYIEGVCV VWF TFEFLMRVIFCPNKVEFIKNSLNII DFV A I LPPY LEVGLSGLSSKA AKDVLGFLRVVRFV RILRIFKLTRHFVGLRVL GHTLR A STNEFL LIIIFL ALGV LIFATM IYYAERIGAQPNDPSASEH THF KNIPIGFWWAVV TMTLGYGDMY PQTWSGMLVGA L CALAGVLTIA MPVPVIVNNFGMYYSLAMAKQKL PKKKKHIPP RPPQLGSPNYCKSV VNSPHI STQSDTCPLA QEEILEINRAGR KPLRGMSI
15	42	Kv3.2	MGKIESN E R VILNVGGTRH E TYRSTLKTLPGTRLALLASSE P QGDCLT AAGDKLQPLPPPLS PPPR PPLSPVPSGCPEGGAGNCSSHGGNGNG SDHPGGGREFFFDRHPGVFAVVLNYYRTGKLHCPADVCGPLFEEELA FWGIDETDVEPCCWMTYRQHRDAEEALDIFETPD LIGD P GDD EDLA AKRLGIEDAAGLQGPDGKSGRWRKLQPRMWA LFEDPYSSRAARFIAF ASLFFILV SITTFCLETHEAFNIVKNKTEPVINGTSPV LQYEIETD P ALTY VEGVCV VWF TFEFLVRIVFSPN KLEFIKNLLNII DFV A I LPF YLEVGLSG LSSKA AKDVLGFLRVVRFV RILRIFKLTRHFVGLRVLGHTLR A STNEF LIIIFL ALGV LIFATM IYYAERIGAQPNDPSASEH TQFKNIPIGFWWA VVTMTLGYGDMY PQTWSGMLVGA L CALAGVLTIA M PVPVIVNNFG MYYSLAMAKQKL P RKRKKHIPP APLASSPTFCKTEL NMACNSTQSDT CLGKENRLLEHNRSVLSGDDSTGSEPLSPPERLPIRRSSTRDKNRRGE TCFLUTTGDTCA SDGGIRKASTLEPMESTAQTKGDTRPEAHWNCAH LLNFGCPTGSSFP T L

55

60

65

(Continuación)

SEQ NO.	ID NO.	Gene	Secuencia de aminoácidos												
5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	43	Kv3.3	MLSSVCVSSFRGRQGASKQQPAPPPQPPESPPPPPLPPQQQQPAQPGPA ASPAGPPAPRGPGDERRAEPCPGLPAAAMGRHGGGGDSGKIVINVGG VRHETYRSTLRTLPGTRLAGLTERPEAAARFDYDPGADEFFDRHPGVF AYVLNYYRTGKLHCPADVCGPLFEEELGFWGQIDETDVEACCWMTYR QHRDAEEALDSFEAPDPAGAANAANAAGAHDGGLDEAGAGGGGL DGAGGELKRLCFQDAGGGAGGGPPGGAGGAGGTWWRRWQPRVWAL FEDPYSSRAARYVAFAFLFFILISITTFCLETHEGFIHISNKTVTQASPIP GAPPENITNVEVETEPFLTYVEGVCVWVFTFELMRITFCPDKVEFLKS SLNIIDCVAILPFYLEVGLSGLSSKAAKDVLGFLRVVRFVRLRIFKLTR HFVGLRVLGHTLRASTNEFLLLIIFLALGVLIFATMIIYAEERIGADPDDI LGSNHTYFKNIPIGFWWAVVTMTTLGYGDMYMPKTWSGMLVGALCA LAGVLTIAMPPVIVNNFGMYYSLAMAKQKLPRKKNKHPRPPQPGS PNYCKPDPPPPPPPHPHGSGGISPPPPITPPSMGTVAGAYPAQPHH PGLLRGAGGLGIMGLPPLPAPGEPCPLAQEEVIEINRADPRPNGDPA AAALAHEDCPAIDQPMSPEDKSPTPGSRGRYSRDRACFLTDYAPS PDGSIRKATGAPPLPPQDWRKPGPPSFLPDLNANAAA WISP

[0112] En algunos casos, uno o más elementos reguladores selectivos de células PV comprenden secuencias de SEQ ID NO: 1-32, un fragmento funcional o una combinación de los mismos, o secuencias que comprenden al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con el mismo. En algunos casos, la identidad de secuencia se mide mediante BLAST. En algunos casos, dicha terapia génica se utiliza para tratar epilepsias, neurodegeneración, tauopatía, hipoexcitabilidad neuronal, síndrome de Dravet y/o enfermedad de Alzheimer. En algunos casos, dicha terapia génica se utiliza para tratar la epilepsia y/o las convulsiones asociadas con el síndrome de Dravet y/o la enfermedad de Alzheimer. En algunos casos, el tratamiento que utiliza una terapia génica descrita en el presente documento da como resultado una reducción de la frecuencia y/o duración de las convulsiones. En algunos casos, el tratamiento utilizando una terapia génica descrita en el presente documento da como resultado una mayor formación de canales iónicos de sodio funcionales, canales iónicos de potasio funcionales o reguladores de neurotransmisores funcionales *in vivo*.

[0113] En algunos casos, los serotipos AAV 1, 8 y/o 9, o un híbrido de los mismos, se pueden usar con los cassetes de expresión descritos en el presente documento para dirigir la expresión selectiva en células PV. En algunos casos, un cassette de expresión diseñado para su administración mediante un AAV comprende una ITR 5', uno o más elementos reguladores selectivos de tipo celular, un potenciador opcional, un promotor mínimo opcional, un transgén, opcionalmente uno o más intrones, un poliA opcional señal y un ITR de 3'. En algunos casos, un cassette de expresión puede contener una 5'ITR, dos ER selectivos de tipo celular, un promotor basal, un transgén, uno o más elementos reguladores de ARN postranscripcional y una 3'ITR.

[0114] Un cassette de expresión AAV ejemplar se ilustra en la FIG. 7. En algunos casos, el cassette de expresión contiene una ITR de AAV 5', un potenciador (p. ej., potenciador selectivo de células PV o uno o más elementos reguladores combinados), un promotor (p. ej., uno o más promotores selectivos de células PV o elementos reguladores), un transgén (p. ej., SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3, STXBP1 o una proteína de unión al ADN), un elemento regulador postranscripcional y una ITR de AAV en 3'. El promotor puede ser selectivo para células PV o un promotor constitutivo. En algunos casos, el transgén es un gen indicador, por ejemplo, una secuencia codificante para eGFP, RFP o un marcador fluorescente. En otros casos, el transgén es una proteína de unión al ADN que modula la expresión genética.

[0115] En algunos casos, el transgén es un transgén terapéutico, por ejemplo, una secuencia codificante para SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3, STXBP1, o una proteína de unión a AND, o un fragmento funcional o una secuencia que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con el mismo. El elemento regulador postranscripcional puede ser cualquier secuencia que influya en la expresión de una proteína a partir de un ARNm o en la estabilidad de un ARN, por ejemplo, un intrón, un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) o un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota. En algunos casos, el elemento regulador postranscripcional es una combinación de dos o más elementos reguladores postranscripcionales.

[0116] El cassette de expresión puede diseñarse para su administración mediante un vector retroviral terapéutico optimizado, por ejemplo, un vector lentiviral. El vector retroviral puede ser un vector lentiviral que comprende una LTR izquierda (5'); secuencias que ayudan al empaquetado y/o la importación nuclear del virus, al menos un elemento

regulador selectivo de tipo celular, opcionalmente un elemento lentiviral de respuesta inversa (RRE); opcionalmente un promotor o porción activa del mismo; un transgén operativamente vinculado a uno o más elementos reguladores; opcionalmente un aislante; y una LTR retroviral derecha (3').

5 **[0117]** En algunos casos, el casete de expresión comprende uno o más elementos reguladores selectivos de tipo celular descritos en el presente documento. En algunos casos, el casete de expresión comprende dos o más elementos reguladores combinados. En algunos ejemplos, el casete de expresión comprende dos o más elementos reguladores que no están combinados, por ejemplo, un promotor aguas arriba del transgén y un potenciador o elemento de estabilidad ubicado aguas abajo del transgén.

10 **[0118]** En algunos casos, el casete de expresión contiene un elemento regulador selectivo de tipo celular putativo que tiene actividad selectiva en un tipo de célula de interés, por ejemplo, un elemento regulador selectivo de células PV putativo. El casete de expresión que contiene el supuesto elemento regulador puede empaquetarse en un vector viral y transfectarse en un modelo animal para evaluar la actividad del supuesto elemento regulador selectivo de tipo celular. En 15 algunos casos, un elemento regulador selectivo de tipo celular putativo se puede evaluar in vitro o ex vivo administrando un vector que contiene el elemento regulador selectivo de tipo celular putativo en una pluralidad de células o tipos de células que incluyen una célula o tipo de célula objetivo, y luego comparar la actividad selectiva del tipo celular del supuesto elemento regulador con un elemento regulador de control, tal como un promotor constitutivo o elemento regulador, o un elemento regulador previamente conocido.

20 **[0119]** En algunos casos, la expresión selectiva se usa para expresar selectivamente un resto terapéutico o un transgén en un tipo de célula de interés (o tipo de tejido de interés), tal como neuronas PV en el SNC. En algunos casos, un vector que comprende un elemento regulador selectivo de tipo celular unido operativamente a un transgén da como resultado una expresión selectiva aumentada del transgén en el tipo de célula de interés en comparación con una o más (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, o cinco) otras células, tipos de células, tejidos o tipos de tejidos, o da como resultado una expresión preferida del transgén en el tipo de célula de interés en comparación con una o más células o tipos de células, por ejemplo, al menos una, dos, tres, cuatro o cinco tipos de células no objetivo.

25 **[0120]** Se puede usar cualquier técnica conocida para administrar los elementos reguladores y un transgén, o composiciones que comprenden elementos reguladores y un transgén, a células de interés (o una célula objetivo o tipo de célula) para conferir o inducir in vitro, in vivo, o expresión ex vivo del transgén de manera selectiva de tipo celular.

30 **[0121]** Los cassetes de expresión que contienen elementos reguladores selectivos de tipo celular de esta divulgación comprenden además uno o más transgenes. Los transgenes pueden ser genes codificadores de proteínas. En algunos casos, el casete de expresión contiene un transgén. El transgén puede reemplazar un gen ausente o defectuoso, o compensar la expresión deficiente de una proteína dentro de una célula. El transgén puede participar en una vía de señalización celular. En algunos casos, un transgén puede codificar una proteína de tipo salvaje, un fragmento funcional de la misma, una proteína variante o mutante que tiene propiedades terapéuticas mejoradas, por ejemplo, actividad mejorada. En algunos casos, el transgén puede codificar una proteína de unión al ADN que comprende uno o un dedo de zinc o un dominio de dCas9, un canal iónico, tal como un canal iónico de potasio o un canal iónico de sodio, o una subunidad del mismo, un factor neurotransmisor o un neurotransmisor regulador. En algunos casos, un transgén puede codificar una subunidad del canal iónico, una variante o un mutante del mismo. En algunos casos, el transgén es una proteína de unión a ADN que comprende un dominio de unión a ADN de una proteína de unión a ADN o una proteína de escisión de ADN (por ejemplo, una nucleasa, una enzima de restricción, una recombinasa, etc.) en donde el dominio de escisión de ADN o dominio de nucleasa se ha desactivado, por ejemplo, una Cas desactivada por nucleasa (dCas), una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción desactivada o una proteína con dedos de zinc desactivada por nucleasa. En algunos casos, el dominio de unión al ADN está unido a un dominio modulador de la transcripción (p. ej., un dominio activador o represor de la transcripción). En algunos casos, el transgén comprende una proteína de edición de genes, por ejemplo, una proteína Cas, Cas9.

50 **[0122]** Los elementos reguladores descritos en el presente documento pueden ubicarse en cualquier posición dentro de un vector o casete de expresión. Por ejemplo, los elementos reguladores pueden ubicarse aguas arriba de un potenciador, aguas abajo de un potenciador pero aguas arriba de un promotor, dentro de la UTR 5' de un transgén, dentro de un intrón en el transgén, en la UTR 3' del transgén, o aguas abajo del transgén. En algunos casos, uno o más elementos reguladores están situados aguas arriba o aguas abajo del transgén operativamente unido.

55 **[0123]** En algunos ejemplos, un elemento regulador de esta divulgación da como resultado la expresión selectiva de un transgén operativamente unido a un nivel que es al menos 0,5, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5 o 3 UI/ml en un tipo de célula objetivo (p. ej., células PV) medido mediante ELISA. En algunos casos, la capacidad de un elemento regulador para aumentar la expresión transgénica se puede evaluar en un ratón en el que se mide la cantidad total de expresión transgénica en todo el ratón y/o el número total de tipos de células o tipos de tejido que tienen expresión transgénica.

60 **[0124]** Cuando se evalúa la actividad de un casete o vector de expresión, la actividad o expresión se puede representar como una actividad o nivel de expresión por dosis unitaria, o normalizarse a una dosis de casete o vector de expresión administrado o entregado a una célula, ratón, o un sujeto. En algunos casos, la expresión o actividad de un transgén se

- normaliza a una cantidad de plásmido o ADN (por ejemplo, mg/kg por ratón), o partículas virales (por ejemplo, normalizadas a una cantidad de copias del genoma/kg por ratón o sujeto) utilizadas para permitir la comparación entre diferentes vectores de expresión o casetes con o sin un elemento regulador. Por ejemplo, cuando se evalúa la actividad de un elemento regulador en un ratón, la expresión selectiva o la actividad en las células PV analizadas se puede 5 normalizar a una dosis de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más de 10 o 720 µg de vector de expresión, casete o plásmido por ratón. En algunos casos, el nivel de expresión o actividad se puede normalizar a 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} o 10^{15} gc/kg de partículas virales que contienen un vector o casete de expresión como se describe en el presente documento por ratón.
- 10 [0125] En algunos aspectos, un casete de expresión comprende uno o más elementos reguladores (por ejemplo, uno cualquiera o más de SEQ ID NO: 1-32, o un fragmento funcional o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con el mismo) descrito en el presente documento unido operativamente a un transgén para dar como resultado una expresión 15 selectiva de tipo celular, o expresión preferencial, del transgén en un tipo de célula objetivo sobre al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o más de cinco tipos de células no objetivo. En algunos casos, un casete de expresión comprende uno o más elementos reguladores unidos operativamente a un transgén para dar como resultado una expresión selectiva de tipo celular o una expresión preferencial en un subtipo de célula objetivo sobre al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, o más de cinco subtipos no objetivo, o todos los demás subtipos conocidos de la célula. En algunos casos, el transgén es cualquiera de SCN1A, SCN2A, SCN8A, 20 SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3 y STXBP1, o un fragmento funcional de los mismos, o secuencias que tienen al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con el mismo. En algunos casos, el transgén es una proteína de unión al ADN que modula un gen endógeno (por ejemplo, un SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3 o STXBP1 endógeno). En algunos casos, el transgén es cualquiera de las SEQ ID NO: 36-43, o un fragmento funcional del mismo, o secuencias que tienen al menos 80 %, al 25 menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con el mismo. En algunos casos, el transgén es un modulador transcripcional. En algunos casos, el transgén es una proteína de unión a ADN que comprende un dominio de unión a ADN de una proteína de unión a ADN o una proteína de escisión de ADN (por ejemplo, una nucleasa, una enzima de restricción, una recombinasa, etc.) en donde el dominio de escisión de ADN o dominio de nucleasa se ha desactivado, por ejemplo, una Cas desactivada por nucleasa (dCas), una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción desactivada o una proteína con dedos de zinc desactivada por nucleasa. En algunos casos, el dominio de unión al ADN está unido a un dominio modulador de la transcripción (p. ej., un dominio activador o represor de la transcripción). En algunos casos, el transgén es una proteína de edición de genes, como una proteína de la familia Cas, Cas9, una nucleasa con dedos de zinc, una nucleasa con dedos de zinc o una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción. En algunos casos, el transgén es un gen indicador o un marcador fluorescente. En algunos 30 casos, un casete de expresión divulgado en el presente documento está en un vector viral. En algunos casos, un casete de expresión descrito en el presente documento está empaquetado en un rAAV, tal como rAAV9 o rAAVDJ. En algunos casos, un casete de expresión descrito en el presente documento se administra a una célula como terapia génica. En algunos casos, una terapia génica descrita en el presente documento se administra a un sujeto, preferiblemente un ser humano o un mamífero. En algunos casos, un casete de expresión descrito en el presente documento se usa para tratar 35 una afección o enfermedad neurológica, tal como epilepsia, una enfermedad neurodegenerativa, tauopatía, hipoexcitabilidad neuronal, síndrome de Dravet o enfermedad de Alzheimer.
- 40 [0126] En algunos casos, un casete de expresión (por ejemplo, terapia génica, vector viral, vector o plásmido) comprende una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 1-32, o un fragmento funcional o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con el mismo, operativamente unido a un transgén. En algunos casos, dichos elementos reguladores combinados se unen utilizando un conector de 1 a 50 nucleótidos. En algunos casos, esos elementos regulatorios combinados no están vinculados. En algunos casos, dos o más elementos regulatorios se ubican aguas arriba y/o aguas abajo del promotor. En algunos casos, dos o más elementos reguladores están situados aguas arriba y/o aguas abajo del transgén. 45
- 50 [0127] En algunos casos, un casete de expresión comprende uno o más elementos reguladores divulgados en el presente documento, cuando se une operativamente a cualquier transgén (por ejemplo, un transgén informador o un transgén terapéutico), impulsa la expresión selectiva o la expresión preferencial en al menos un tipo de célula objetivo a un nivel que es estadísticamente significativamente mayor que la expresión impulsada por CAG, EF1α, un promotor constitutivo o un elemento regulador no selectivo cuando se une operativamente al mismo transgén, o mediante la misma construcción sin los elementos reguladores. En algunos casos, significa estadísticamente significativamente más alto que los elementos reguladores impulsan la expresión selectiva en el tipo de célula objetivo a un nivel que es al menos 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 veces el nivel de expresión por CAG, EF1α, un promotor constitutivo o un elemento regulador no selectivo cuando está unido operativamente al mismo transgén en el tipo de célula objetivo, o mediante la misma construcción sin los elementos reguladores. En algunos casos, dicha expresión selectiva de tipo celular se analiza usando un ensayo de colocalización como se describe en el presente documento.
- 55 [0128] En otros aspectos, un casete de expresión que comprende uno o más elementos reguladores divulgados en el presente documento unidos operativamente a cualquier transgén divulgado en el presente documento da como resultado 60
- 65

una expresión selectiva o expresión preferencial del transgén en un tipo de célula objetivo sobre al menos uno, al menos dos, al menos al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o más de cinco tipos de células no objetivo o subtipos no objetivo.

- 5 [0129] En algunos casos, el tipo de célula objetivo es una célula fotovoltaica. En algunos casos, los subtipos de células no objetivo son al menos uno, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro de los subtipos GABAérgicos no PV descritos en el presente documento. En algunos casos, un casete de expresión que comprende un elemento regulador descrito en el presente documento es selectivo para células PV sobre todas las células GABAérgicas no PV o todas las células del SNC no PV. En algunos casos, la selectividad del tipo de célula se mide según un ensayo de colocalización descrito en el presente documento. En algunos casos, la selectividad del tipo de célula se mide utilizando un ratón que expresa Cre en el tipo de célula objetivo.

Neuronas de parvalbúmina (PV)

- 15 [0130] Las neuronas GABAérgicas producen ácido gamma aminobutírico (GABA), el principal neurotransmisor inhibidor en el SNC. GABA es importante para reducir la excitabilidad neuronal en todo el sistema nervioso. GABA actúa en las sinapsis inhibidoras uniéndose a receptores transmembrana específicos y provocando la apertura de canales iónicos que cambian negativamente la polarización de la membrana. Esto generalmente resulta en una hiperpolarización de la célula y aumenta la señal requerida para activar un potencial de acción. Los defectos en las neuronas GABAérgicas pueden provocar un desequilibrio entre la señalización excitatoria e inhibidora y se han implicado en muchas enfermedades neurológicas, incluido el síndrome de Dravet, la epilepsia, la neurodegeneración, las tauopatías y la enfermedad de Alzheimer. Otras afecciones o enfermedades neurológicas implicadas incluyen un trastorno psiquiátrico (por ejemplo, esquizofrenia, trastorno obsesivo compulsivo, adicción, depresión, ansiedad, psicosis); un trastorno del espectro autista (p. ej., síndrome de X frágil, síndrome de Rett); epilepsia (p. ej., encefalopatía traumática crónica, epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus (GEFS+), encefalopatía epiléptica, epilepsia del lóbulo temporal, epilepsia focal, esclerosis tuberosa); y/o neurodegeneración (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson). En algunos casos, la afección o enfermedad neurológica es cualquier afección o enfermedad relacionada con convulsiones y/o epilepsia en la que están implicadas las neuronas PV.

- 30 [0131] La parvalbúmina es una proteína de unión a calcio, que se expresa en aproximadamente el 40 % del total de interneuronas GABAérgicas en la corteza somatosensorial. Dentro del SNC, las células PV generalmente se consideran células GABAérgicas. Varios estudios también han identificado que las células GABAérgicas incluyen distintos subtipos de células, incluidas células que expresan PV, SOM, CR, CCK, NPY, VIP o una combinación de las mismas.

- 35 [0132] Las neuronas PV son particularmente relevantes para diversas enfermedades o afecciones neurológicas, tales como el síndrome de Dravet, la enfermedad de Alzheimer, la epilepsia, la neurodegeneración, las tauopatías y/o las convulsiones. En algunos casos, una afección o enfermedad neurológica asociada a las neuronas PV es un trastorno psiquiátrico (p. ej., esquizofrenia, trastorno obsesivo compulsivo, adicción, depresión, ansiedad, psicosis); un trastorno del espectro autista (p. ej., síndrome de X frágil, síndrome de Rett); epilepsia (p. ej., encefalopatía traumática crónica, epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus (GEFS+), encefalopatía epiléptica, epilepsia del lóbulo temporal, epilepsia focal, esclerosis tuberosa); o neurodegeneración (p. ej., enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson). En algunos casos, la afección o enfermedad neurológica es cualquier afección o enfermedad relacionada con convulsiones y/o epilepsia en la que están implicadas las neuronas PV. En diversos aspectos, la célula objetivo son las células PV del SNC, o células GABAérgicas que expresan PV.

- 45 [0133] En diversos aspectos, las interneuronas que expresan PV también se denominan células en cesta, que pueden subdividirse además por tamaño del cuerpo celular (por ejemplo, células en cesta grande, células en cesta pequeña y células en cesta nido), y proyección dendrítica y axonal. Fisiológicamente, las células en cesta que expresan PV suelen tener picos rápidos (FS), caracterizados por un tren de potenciales de acción (AP) de alta frecuencia con poca adaptación. 50 Están ampliamente aceptado que las neuronas en cesta PV inervan el soma y las dendritas proximales de las neuronas piramidales excitadoras. La inhibición anticipada mediada a través de neuronas en cesta que expresan FS PV se puede encontrar en varias redes corticales, incluidos los circuitos talamocorticales, translaminares e interareales. Las neuronas en cesta del FS PV inhiben fuertemente las neuronas piramidales excitadoras vecinas. Se ha demostrado que las neuronas en cesta PV y las neuronas piramidales que comparten entradas excitadoras comunes tienden a estar 55 conectadas recíprocamente (inhibición de retroalimentación). Estas conexiones pueden servir para regular la ventana de tiempo precisa en la que las neuronas excitadoras pueden generar picos en respuesta a impulsos excitadores. Además, las entradas excitadoras talamocorticales e intracorticales en las neuronas de la cesta de FS PV se deprimen mediante la estimulación de alta frecuencia, que media la inhibición de avance dependiente de la actividad. Las células en cesta 60 que expresan PV también inervan otras interneuronas, incluidas otras células en cesta, y están acopladas eléctricamente entre sí a través de uniones en hendidura. Se ha propuesto que esta característica puede ayudar a generar y mantener la sincronización y oscilación de la red cortical.

- 65 [0134] En algunos casos, uno o más elementos reguladores descritos en el presente documento dan como resultado una mayor selectividad en la expresión génica en neuronas PV en comparación con al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco neuronas que no expresan PV. En algunos casos, las células no PV incluyen todas las células GABAérgicas no PV. En algunos casos, las neuronas GABAérgicas no PV incluyen, entre otras, calretinina

(CR), somatostatina (SOM), colecistoquinina (CCK), CR + SOM, CR + neuropéptido Y (NPY), CR + polipéptido vasointestinal (VIP), células que expresan SOM + NPY, SOM + VIP, VIP + colina acetiltransferasa (ChAT), CCK + NPY, CR + SOM + NPY y CR + SOM + VIP.

5 [0135] En algunos casos, cualquiera de CAG, EF1 α , un promotor constitutivo (por ejemplo, SV40, CMV, UBC, PGK y CBA), o un elemento regulador no selectivo que impulsa la expresión génica en un tipo no celular selectivo. Esta manera se puede utilizar para comparar con elementos reguladores selectivos de PV, o cualquier elemento regulador selectivo de tipo celular, divulgados en el presente documento. En algunos casos, un elemento regulador que da como resultado una expresión selectiva en células PV a un nivel superior a la expresión de un gen unido operativamente al control CAG o 10 EF1 α es indicativo de selectividad hacia las células PV. En algunos casos, un elemento regulador divulgado en el presente documento muestra una expresión génica selectiva en células PV que es al menos 2 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al 15 menos 90 % o al menos 95 % mayor que el nivel de expresión de PV de un transgén que está operativamente unido a CAG, EF1 α , un promotor constitutivo (p. ej., SV40, CMV, UBC, PGK, y CBA), o un elemento regulador no selectivo (por ejemplo, SEQ ID NO: 34, o un fragmento funcional de la misma, o una secuencia que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con el mismo), y según se mide en un ensayo de colocalización. En algunos casos, un elemento regulador descrito en el presente documento muestra una expresión génica selectiva en células PV que es al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces o al menos 10 veces el nivel 20 de expresión bajo CAG, EF1 α , un promotor constitutivo (p. ej., SV40, CMV, UBC, PGK y CBA), o un promotor no selectivo elemento regulador (por ejemplo, SEQ ID NO: 34, o un fragmento funcional de la misma, o una secuencia que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la misma) y según se mide en un ensayo de colocalización descrito en el presente documento.

25 [0136] En casos preferidos, uno o más elementos reguladores descritos en el presente documento impulsan selectivamente la expresión de un transgén en una célula GABAérgica, tal como una célula GABAérgica que expresa parvalbúmina sobre al menos otro tipo de célula del SNC (p. ej., al menos dos, al menos al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco células no PV, o dos o más, tres o más, o cuatro o más células no PV y/o neuronas GABAérgicas no PV).

30 [0137] En algunos casos, un tipo de célula objetivo es una neurona GABAérgica que expresa parvalbúmina o células PV.

35 [0138] Una forma de expresar selectivamente un transgén dentro de una subpoblación de células en el cerebro es usar un vector viral que comprende un transgén operativamente unido a un elemento regulador selectivo de tipo celular, o un elemento regulador que es selectivo (o tiene actividad selectiva) en la subpoblación de células del cerebro, por ejemplo, células fotovoltaicas. Se puede seleccionar un vector viral para que tenga alta infectividad sin selectividad para un tipo de célula particular, mientras que el elemento regulador confiere selectividad. Por ejemplo, un elemento regulador selectivo de tipo celular puede impulsar la expresión de un transgén en neuronas PV y no en otras neuronas.

40 [0139] En algunos casos, la presente divulgación implica el uso de elementos reguladores (es decir, elementos reguladores selectivos de células PV) que impulsan selectivamente la expresión en neuronas PV.

45 [0140] Las células GABAérgicas son neuronas inhibidoras que producen ácido gamma-aminobutírico. Las células GABAérgicas pueden identificarse mediante la expresión de la descarboxilasa 2 del ácido glutámico (GAD2). Otros marcadores de células GABAérgicas incluyen GAD1, NKX2.1, DLX1, DLX5, SST, PV y VIP.

50 [0141] En algunos casos, una célula del SNC no PV es una neurona excitadora, una neurona dopamínérgica, un astrocito, una microglía, una neurona motora o una célula vascular. En algunos casos, una neurona no GABAérgica es una célula que no expresa uno o más de GAD2, GAD1, NKX2.1, DLX1, DLX5, SST y VIP. En algunos casos, una neurona no PV es una neurona GABAérgica que no expresa parvalbúmina. En algunos casos, otras células del SNC se refieren a tipos de células del SNC que nunca han expresado PV, GAD2, GAD1, NKX2.1, DLX1, DLX5, SST y VIP.

55 [0142] En algunos casos, un elemento regulador descrito en el presente documento es selectivo para una célula que expresa PV sobre al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o más de cinco tipos de células del SNC no PV. En algunos casos, los tipos de células no PV incluyen células GABAérgicas no PV. En algunos casos, el tipo de célula de interés es una célula fotovoltaica. En algunos casos, los ER selectivos para células fotovoltaicas se denominan elementos reguladores selectivos de células fotovoltaicas.

60 [0143] En algunos casos, los elementos reguladores selectivos de células PV divulgados en el presente documento incluyen las secuencias de SEQ ID NO: 1-32, o cualquier combinación de las mismas.

65 [0144] En algunos casos, uno o más elementos reguladores selectivos de células PV o uno o más elementos reguladores divulgados en el presente documento se usan para aumentar la expresión de un transgén en células que expresan PV en al menos 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más veces en comparación con la expresión sin el elemento regulador. En algunos casos, un ER en un casete de expresión aumenta la expresión génica en al menos un 1,5 %, 2 %,

5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 50 %, o más del 1,5 %, 2 %, 5 %. 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % en comparación con la expresión sin los elementos reguladores. En algunos casos, las composiciones y métodos de uso de las mismas comprenden casetes de expresión que contienen uno o más elementos reguladores que dan como resultado un aumento del 10-500 % en la expresión 5 transgénica, por ejemplo, expresión de SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KCNC1 (también conocido como KV3.1), KCNC3 (también conocido como KV3.3), STXBP1, una proteína de unión al ADN, o una variante o fragmento funcional de la misma, o una proteína de la misma, en comparación con el nivel sin los elementos reguladores o en comparación con un elemento regulador no selectivo (p. ej., CAG, EF1a, un promotor constitutivo, o SEQ ID NO: 34, o un 10 fragmento funcional del mismo, o una secuencia que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos 95 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma). En algunos casos, el aumento en la expresión génica y/o el nivel de proteína de cualquiera de SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KCNC1, KCNC3 y STXBP1 es del 1,5 al 5 %, del 5 al 10 %, del 10 al 15 %, 15-20 %, 20-30 %, 30-40 %, 40-50 %, 50-60 %, 60-70 %, 70-80 %, 80-90 %, 90-100 %, 100-150 %, 150-200 %, 250-300 %, 300-350 %, 350-400 %, 400-450 %, 450-500 %, o 1,5-20 %, 20 %, 15 20-50 %, 50 %-100 %, 100-200 %, 200-300 %, 300-400 % o 400-500 % en comparación con el nivel sin el casete de expresión o elementos reguladores. En algunos casos, dicha expresión de gen o proteína es selectiva en células PV en comparación con un casete de expresión que comprende un control (por ejemplo, CAG, EF1a, un promotor constitutivo (por ejemplo, SV40, CMV, UBC, PGK y CBA), o un elemento regulador no selectivo) o un elemento regulador selectivo de tipo no celular (por ejemplo, SEQ ID NO: 34, o un fragmento funcional de la misma, o una secuencia que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos 95 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con el mismo).

20 [0145] En algunos casos, la selectividad de expresión en células PV se puede calcular dividiendo el número de células que expresan tanto PV como eGFP (el transgén operativamente unido a uno o más elementos reguladores) por el número total de células que expresan eGFP y multiplicar por 100 para convertirlo en porcentaje. Los elementos reguladores selectivos de células PV como se describen en el presente documento pueden ser altamente selectivos para la expresión 25 en células PV. Por ejemplo, los elementos reguladores selectivos de células fotovoltaicas o uno o más elementos reguladores divulgados en el presente documento pueden exhibir aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o mayor que aproximadamente 99 % de selectividad para las neuronas PV.

30 [0146] En algunos casos, un elemento regulador selectivo de células PV o cualquier elemento regulador descrito en el presente documento confiere selectividad en la expresión de un transgén en neuronas PV a un nivel que es estadísticamente mayor que un elemento regulador de control, por ejemplo, EF1a o un elemento regulador previamente conocido. En algunos casos, la diferencia estadística entre un elemento regulador selectivo de células fotovoltaicas y un elemento regulador de control es al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces o más de 2 veces de diferencia, o más 35 de 5 veces, 10 veces, o diferencia de 20 veces según lo determinado por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, como un ensayo de colocalización.

40 [0147] La presente divulgación incluye elementos reguladores que son selectivos para células fotovoltaicas. Estos ER selectivos de células PV o cualquier ER selectivo de tipo celular son preferiblemente cortos, preferiblemente menos de aproximadamente 1100 pares de bases, 1000 pb, 900 pb, 800 pb, 700 pb, 600 pb, 500 pb, 400 pb, 300 pb, 200 pb o menos de aproximadamente 110 pb. Los ER selectivos de células fotovoltaicas o cualquier ER selectivo de tipo de célula pueden tener entre 1050 pb y 100 pb, entre 100 pb y 500 pb, o entre 500 pb y 1050 pb. Algunos ejemplos de elementos reguladores selectivos de células PV se proporcionan en las SEQ ID NO 1-32, o un fragmento funcional o combinación de los mismos. Otros elementos reguladores selectivos de células PV contemplados por la presente divulgación incluyen secuencias que tienen al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con cualquiera de estas secuencias descritas en el presente documento, o una parte o fragmento de una de las secuencias descritas en el presente documento.

50 [0148] En algunos casos, un elemento regulador selectivo de células fotovoltaicas o cualquier elemento regulador descrito en el presente documento tiene al menos aproximadamente 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más del 99 % de identidad con una secuencia descrita en el presente documento, o un fragmento de una secuencia descrita en el presente documento. En algunos casos, un elemento regulador selectivo de células PV tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad con al menos aproximadamente un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de una secuencia descrita en el presente documento o un fragmento funcional del mismo.

55 [0149] En algunos casos, un elemento regulador selectivo de células PV comprende al menos un 80 % de identidad con una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 1-32, o un fragmento funcional o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con el mismo. En algunos casos, un elemento regulador selectivo de células PV tiene una identidad del 90 % con el 50 % o más de una secuencia de SEQ ID NO: 1-22. En algunos casos, un elemento regulador selectivo de PV es un fragmento funcional de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-32 o una combinación de las mismas. En algunos casos, el fragmento funcional es capaz de expresar selectivamente un transgén en células PV con al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o mayor del 95 % de selectividad de expresión en células PV.

65 [0150] En estos casos, dos o más elementos reguladores selectivos de células fotovoltaicas de esta divulgación o dos o más elementos reguladores cualesquiera divulgados en la presente se combinan para formar elementos reguladores

combinados. En algunos casos, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, o diez o más elementos reguladores selectivos de células fotovoltaicas, o una pluralidad de los elementos reguladores descritos en este documento se combinan. Por ejemplo, SEQ ID NO: 31 es una combinación de SEQ ID NO 1 y 23-29. Como otro ejemplo, SEQ ID NO: 32 es una combinación de SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 23-29. En algunos 5 casos, se pueden combinar fragmentos de dos o más elementos reguladores selectivos de PV para formar un elemento regulador combinado. Por ejemplo, el 50 % de SEQ ID NO: 1 se puede combinar con el 30 % de SEQ ID NO: 8 y el 90 % de SEQ ID NO: 30 para formar un elemento regulador de combinación.

10 **[0151]** En algunos casos, uno o más elementos reguladores selectivos de células PV de esta divulgación o uno o más elementos reguladores divulgados en el presente documento expresan selectivamente un transgén operativamente unido en neuronas PV en comparación con uno o más tipos de células del SNC. Esta expresión selectiva se puede cuantificar contando el número de neuronas PV que expresan niveles detectables del transgén vinculado como porcentaje del número total de células que expresan el transgén, incluido el número de neuronas no PV que expresan el transgén. En otras 15 palabras, la selectividad de un elemento regulador de PV en un tipo de célula o célula objetivo particular se puede determinar midiendo y/o comparando el número de neuronas PV (o células objetivo) que expresan el transgén que está operativamente unido al elemento regulador con respecto al número de tipos de células no objetivo que expresan el transgén (o el número total de células que expresan el transgén).

20 **[0152]** En algunos casos, los elementos reguladores selectivos de células PV pueden exhibir aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o mayor que aproximadamente 99 % de selectividad para neuronas PV, neuronas PV en el SNC o neuronas GABAérgicas que también 25 expresan PV. En algunos casos, uno o más elementos regulatorios de esta divulgación pueden exhibir alrededor del 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o mayor que aproximadamente 99 % de selectividad para neuronas PV en comparación con CAG o EF1 α o elemento selectivo que no 30 es de tipo celular, o en comparación con SNC no PV células, o en comparación con al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco otros subtipos neuronales GABAérgicos no PV en el SNC.

35 **[0153]** En algunos casos, un elemento regulador selectivo de PV confiere selectividad en la expresión de un transgén en neuronas PV a un nivel que es estadísticamente mayor que un elemento regulador de control, por ejemplo, CAG, EF1 α , un promotor constitutivo (por ejemplo, SV40, CMV, UBC, PGK y CBA), un elemento regulatorio no selectivo o un elemento regulatorio previamente conocido. En algunos casos, la diferencia estadística entre un ER selectivo de células fotovoltaicas y un elemento de control es al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces o más de 2 veces de diferencia, o más de 5 veces, 10 veces o 20 veces. diferencia de veces determinada por cualquiera de los métodos descritos en el 35 presente documento. En algunos casos, la selectividad en PV se mide usando un ensayo de colocalización como se describe en el presente documento.

40 **[0154]** En algunos aspectos, los elementos reguladores selectivos de tipo celular descritos en el presente documento son útiles para modular selectivamente la expresión de un transgén en un tipo de célula del SNC en comparación con otros tipos de células del SNC. Por ejemplo, los elementos reguladores selectivos de tipo celular descritos en el presente documento pueden ser útiles para modular selectivamente la expresión de un transgén en células PV sobre otras células del SNC, incluidos otros tipos de neuronas. Para la terapia génica, puede desearse la expresión selectiva de un transgén en un tipo de célula objetivo y/o una expresión minimizada del transgén en un tipo de célula no objetivo. La expresión del transgén en un tipo de célula no deseado (por ejemplo, un tipo de célula no objetivo) puede provocar un efecto adverso 45 para el sujeto. La expresión del transgén en un tipo de célula no deseado puede contrarrestar el efecto terapéutico del transgén en el tipo de célula deseado. Por ejemplo, un transgén destinado a la expresión en células PV puede tener un efecto negativo para el sujeto si se expresa en neuronas glutamatérgicas. Los elementos reguladores selectivos de tipo celular descritos en el presente documento se pueden usar en cassetes de expresión para garantizar la expresión apropiada de un transgén y/o para reducir los efectos no deseados de la terapia génica.

50 **[0155]** Los elementos reguladores selectivos de tipo celular del presente documento se pueden usar en cassetes de expresión génica mediante los cuales están unidos operativamente a uno o más transgenes. Dichos cassetes de expresión génica se utilizan para introducir transgenes en células para su expresión. El cassette de expresión puede contener un elemento regulador selectivo de tipo celular como se describe en el presente documento, una combinación de elementos reguladores selectivos de tipo celular o un fragmento de un elemento regulador selectivo de tipo celular como se describe 55 en el presente documento unido operativamente a un transgén.

60 **[0156]** Preferiblemente, los cassetes de expresión del presente documento incluyen uno o más elementos reguladores selectivos de tipo celular unidos operativamente a un transgén, por lo que los dos no funcionan juntos en su contexto endógeno *in vivo*. Por ejemplo, un transgén para la subunidad beta del canal iónico de sodio, tal como SCN1B, puede unirse operativamente a uno o más elementos reguladores que no funcionan en el mismo contexto *in vivo*, o no impulsan de forma detectable la expresión de SCN1B de forma endógena. De manera similar, un cassette de ácido nucleico puede incluir un regulador de neurotransmisor, tal como STXBP1, unido operativamente a un elemento regulador que no funciona en el mismo contexto de forma endógena o *in vivo*, o no está en el mismo marco de lectura abierto, o no está en el mismo 65 cromosoma humano, o no impulsa de forma detectable la expresión de STXBP1 *in vivo*. En algunos casos, un elemento regulador selectivo de tipo celular está unido a un transgén, en donde el elemento regulador selectivo de tipo celular no regula el gen endógeno correspondiente al transgén *in vivo*.

5 [0157] En algunos aspectos, los elementos reguladores selectivos de tipo celular descritos en el presente documento se derivan de secuencias aisladas de un locus cromosómico humano diferente de un locus de un gen nativo correspondiente al transgén. Por tanto, en algunos casos, un casete de expresión comprende uno o más elementos reguladores selectivos de tipo celular que tienen una secuencia derivada de un cromosoma diferente del cromosoma correspondiente al transgén en el mismo casete. En otros casos, los elementos reguladores de la divulgación y un transgén que están unidos operativamente en un casete de expresión se derivan de secuencias ubicadas a más de 20 kb de distancia en el genoma humano, o en ubicaciones genómicas distales. Cuando se utilizan dos o más elementos reguladores derivados de humanos en un casete de expresión, los dos o más elementos reguladores pueden tener secuencias ubicadas a más de 10 kb de distancia, a más de 10 kb de distancia, a más de 15 kb de distancia o a más de 20 kb de distancia en el genoma humano, o en el que los dos o más elementos reguladores no interactúan entre sí de forma natural en el genoma.

10

15 [0158] En algunos casos, un casete de expresión que comprende elementos reguladores selectivos de PV puede excluir secuencias conocidas derivadas de secuencias promotoras de hSyn1 o GAD2. En algunos casos, los elementos reguladores selectivos de PV no comprenden la secuencia promotora completa de ninguno de los promotores GAD2, GAD1, SYN1, NKX2.1, DLX1, DLX5, SST y VIP. En algunos casos, los elementos reguladores selectivos de PV no comprenden más de 500 pares de bases contiguos de secuencia derivada del promotor o uno o más de GAD2, GAD1, SYN1, NKX2.1, DLX1, DLX5, SST y VIP. En algunos casos, los elementos reguladores selectivos de PV no comprenden secuencias que estén dentro de 1 kb, 2 kb, 3 kb, 4 kb, 5 kb, 6 kb, 7 kb, 8 kb, 9 kb o 10 kb del sitio de inicio de la transcripción de cualquiera de GAD2, SYN1, NKX2.1, DLX1, DLX5, SST y VIP.

20

25 [0159] En algunos casos, un transgén es útil para tratar una enfermedad asociada con un tipo de célula específica de interés. En algunos casos, un tipo de célula de interés es una neurona, una neurona inhibidora, una neurona GABAérgica o una neurona PV. En algunos casos, un transgén es uno o más de SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3 y STXBP1. En algunos casos, un transgén es una proteína de unión al ADN que modula la expresión de un gen (p. ej., un activador transcripcional o un represor transcripcional que modula la expresión de un gen endógeno). En algunos casos, un transgén es una proteína de edición de genes, como una nucleasa con dedos de zinc, una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción, una proteína de la familia Cas. En algunos casos, un transgén es un gen informador o un marcador detectable, como eGFP, tdTomato o RFP. En algunos casos, un transgén es una proteína Cas, como Cas9.

30

35 [0160] Los transgenes útiles para tratar una afección asociada con células neuronales PV se pueden incorporar en un vector, casete de ácido nucleico o método como se describe en el presente documento. Los transgenes utilizados en el presente documento generalmente no contienen intrones o no contienen más de un intrón. Se puede obtener un transgén a partir de una secuencia de ADNc en lugar de una secuencia genómica. En algunos casos, los transgenes pueden contener algunos o todos sus intrones endógenos. En algunos ejemplos, dicho transgén codifica un dominio de unión al ADN o un canal iónico. Ejemplos de dominios de unión a ADN que pueden codificarse en los casetes de expresión de esta divulgación incluyen dedos de zinc, Cas9, una proteína de la familia Cas, dCas9, una proteína de la familia dCas o un efector similar a un activador transcripcional (TALE). En algunos casos, el transgén es una proteína de unión a ADN que comprende un dominio de unión a ADN de una proteína de unión a ADN o una proteína de escisión de ADN (por ejemplo, una nucleasa, una enzima de restricción, una recombinasa, etc.) en donde el dominio de escisión de ADN o dominio de nucleasa se ha desactivado, por ejemplo, una Cas desactivada por nucleasa (dCas), una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción desactivada o una proteína con dedos de zinc desactivada por nucleasa. En algunos casos, el dominio de unión al ADN está unido a un dominio modulador de la transcripción (p. ej., un dominio activador o represor de la transcripción). En algunos casos, el transgén comprende una proteína de edición de genes, por ejemplo, una proteína Cas, Cas9. En algunos casos, el transgén es una subunidad o un componente de un canal iónico o una proteína de membrana, o un gen asociado con una afección o enfermedad neurológica descrita en el presente documento. Ejemplos de transgenes de canales iónicos que se pueden usar en los casetes de expresión de esta divulgación incluyen canales iónicos regulados por voltaje y regulados por ligando. Los canales iónicos dependientes de voltaje incluyen canales de sodio, canales de calcio, canales de potasio y canales de protones. En algunos casos, el transgén codifica una subunidad de un canal de sodio dependiente de voltaje. Ejemplos de subunidades de canales de sodio dependientes de voltaje incluyen SCN1B (NM_001037.4), SCN1A (NM_001165963.1) y SCN2B (NM_004588.4).

40

45

50

55 [0161] En algunos casos, el transgén codifica una subunidad de un canal de potasio dependiente de voltaje. Ejemplos de subunidades de canales de sodio dependientes de voltaje incluyen KCNC1 (NM_001112741.1) y KCNC3 (NM_004977.2). En algunos casos, un transgén es uno o más de SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, STXBP1, una variante y un fragmento funcional de los mismos. En algunos casos, un transgén es una secuencia que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o al menos 99,5 % de identidad de secuencia con cualquiera de SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, STXBP1, una variante o un fragmento funcional del mismo. En algunos casos, dicha identidad de secuencia se mide utilizando BLAST.

60

65 [0162] En algunos casos, un casete de expresión divulgado en el presente documento comprende uno o más elementos reguladores selectivos de PV o uno o más elementos reguladores de esta divulgación unidos operativamente a un transgén que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o al menos 99,5 % de

5 identidad de secuencia con una secuencia que codifica cualquiera de las SEQ ID NO: 37-43, o un fragmento funcional o variante de la misma, o las secuencias de GenBank correspondientes a las SEQ ID NO: 37-43. En algunos casos, un casete de expresión divulgado en el presente documento comprende un transgén que tiene una secuencia según (i) una secuencia de SEQ ID NO: 37-43, o (ii) un fragmento funcional del mismo, o (iii) una secuencia que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o al menos 99,5 % de identidad de secuencia con (i) o (ii).

10 [0163] En algunos ejemplos, el transgén es un regulador de neurotransmisor, o una variante o fragmento funcional del mismo. Un regulador de neurotransmisores puede participar en la regulación de la producción o liberación de un neurotransmisor en el SNC. Por ejemplo, un regulador de neurotransmisores puede ayudar con la fusión sináptica para liberar neurotransmisores. Un ejemplo de un regulador de neurotransmisor es STXBP1 (NM_001032221.3) o un fragmento funcional del mismo, o una secuencia que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia. a ello. El transgén también puede ser una subunidad de un regulador de neurotransmisor.

15 [0164] En algún caso, un casete de expresión de esta divulgación puede contener una ITR 5' de AAV2, un potenciador selectivo de PV, un promotor selectivo de PV, o una combinación de uno o más promotores y potenciadores selectivos de PV, un ADNc de SCN1B, un WPRE, una señal poliA de hGH, un elemento regulador selectivo de PV y un 3'ITR de AAV2. En un ejemplo, el casete de expresión comprende un promotor AmpR y una secuencia codificante de AmpR, un origen de replicación bacteriano, una ITR de AAV2, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 23-29, un transgén (secuencia codificante, un WPRE, una señal poli A de la hormona del crecimiento humano, una ITR de AAV2 y un origen f1).

20 [0165] Como otro ejemplo, un casete de expresión de esta divulgación puede contener una ITR 5' de AAV2, un potenciador, un promotor, un activador transcripcional del gen SCN1A endógeno, un WPRE, una señal poliA de hGH, un elemento regulador y un AAV2 3'ITR. En algunos casos, un casete de expresión comprende AAV2 5' ITR, un promotor, un elemento intrónico, modificador transcripcional, poliA sintética y una AAV2 3' ITR. En algunos casos, un casete de expresión de esta divulgación puede contener una ITR 5' de AAV2, un potenciador selectivo de PV, un promotor selectivo de PV, una secuencia que codifica un activador transcripcional de SCN1A o SCN1B, un WPRE, una señal poliA de hGH, un elemento regulador selectivo de PV o cualquiera de los elementos reguladores descritos en este documento, y un AAV2 3'ITR.

25 [0166] Un casete de expresión que comprende uno o más elementos reguladores de esta divulgación se puede usar para tratar una afección médica. En algunos casos, un casete de expresión que contiene un elemento regulador de esta divulgación se usa para tratar una afección neurológica o una afección neurodegenerativa. La condición neurológica 30 puede ser causada por un evento genético conocido o puede tener una causa desconocida.

35 [0167] La afección neurológica puede ser una enfermedad asociada con las neuronas PV. La afección neurológica puede ser una enfermedad asociada con neuronas inhibidoras, como las neuronas PV. Las enfermedades o afecciones 40 asociadas con las neuronas PV se pueden tratar administrando un casete de expresión que porta un transgén y uno o más elementos reguladores selectivos de células PV o cualquiera de los elementos reguladores como se describe en el presente documento a una célula *in vivo*. En algunos aspectos, los casetes de expresión que comprenden un transgén unido operativamente a uno o más elementos reguladores selectivos de células PV o cualquiera de los elementos 45 reguladores descritos en el presente documento se pueden usar para tratar el síndrome de Dravet, la enfermedad de Alzheimer, la epilepsia, un trastorno neurodegenerativo, la tauopatía, la hipoexcitabilidad neuronal y/o convulsiones. En algunos casos, un casete de expresión de esta divulgación se usa para tratar un trastorno psiquiátrico (por ejemplo, esquizofrenia, trastorno obsesivo compulsivo, adicción, depresión, ansiedad, psicosis); un trastorno del espectro autista (p. ej., síndrome de X frágil, síndrome de Rett); epilepsia (p. ej., síndrome de Dravet, encefalopatía traumática crónica, epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus (GEFS+), encefalopatía epiléptica, epilepsia del lóbulo temporal, epilepsia focal, esclerosis tuberosa); y/o neurodegeneración (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de 50 Parkinson). En algunos casos, la afección o enfermedad neurológica es cualquier afección o enfermedad relacionada con convulsiones y/o epilepsia en la que están implicadas las neuronas PV.

55 [0168] La mayor parte de síndrome de Dravet está asociada con mutaciones en los genes SCN1A y/o SCN2A. Las mutaciones o anomalías en SCN1A también se han asociado con trastornos convulsivos, epilepsia, autismo, migraña hemipléjica familiar tipo 3 (FHM3), epilepsia genética con convulsiones febriles plus (GEFS+) y eficacia de ciertos medicamentos anticonvulsivos. Por ejemplo, la mutación ICS5N+5G>A en SCN1A se asocia con la cantidad (dosis) máxima segura de los medicamentos anticonvulsivos fenitoína y carbamazepina.

60 [0169] En algunos pacientes con Alzheimer, la producción de amiloide β ($A\beta$) implica muchos péptidos y proteasas que pueden afectar la excitabilidad de las neuronas, provocando convulsiones y regulación negativa del canal de sodio Nav1.1 en las neuronas PV.

65 [0170] Las enfermedades asociadas con neuronas PV disfuncionales tales como aquellas debidas a mutaciones de pérdida de función en SCN1A o Nav1.1 incluyen: síndrome de Dravet, síndrome de Ohtahara, epilepsia, encefalopatía epiléptica infantil temprana 6 (EIEE6), convulsiones febriles familiares 3A (FEB3A), epilepsia infantil intractable con convulsiones tónico-clónicas generalizadas (ICEGTC), migraña, hemipléjico familiar 3 (FHM3), síndrome de

Panayiotopoulos, fibrilación auricular familiar 13 (ATFB13), epilepsia generalizada con convulsiones febriles más tipo 1 (gefs+ tipo 1), síndrome de Brugada, defecto de conducción cardíaca inespecífico, epilepsia generalizada con crisis febriles plus, convulsiones infantiles familiares benignas, encefalopatía epiléptica infantil temprana11 (EIEE11), epilepsia infantil familiar benigna, neurodegeneración, tauopatías y enfermedad de Alzheimer. En algunos casos, la condición 5 neurológica es el síndrome de Dravet. El síndrome de Dravet se asocia con mutaciones en los genes SCN1A y/o SCN2A. En algunos casos, uno o más elementos reguladores de esta divulgación se usan en una terapia génica o un casete de expresión para tratar una condición o enfermedad neurológica asociada con las neuronas PV, por ejemplo, un trastorno psiquiátrico (por ejemplo, esquizofrenia, trastorno obsesivo compulsivo, adicción, depresión, ansiedad, psicosis); un trastorno del espectro autista (p. ej., síndrome de X frágil, síndrome de Rett); epilepsia (p. ej., síndrome de Dravet, 10 encefalopatía traumática crónica, epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus (GEFS+), encefalopatía epiléptica, epilepsia del lóbulo temporal, epilepsia focal, esclerosis tuberosa); o neurodegeneración (p. ej., enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson). En algunos casos, uno o más elementos reguladores de esta divulgación (por ejemplo, elementos reguladores selectivos de neuronas PV) se usan para tratar el síndrome de Dravet y/o la enfermedad de 15 Alzheimer (por ejemplo, en un casete de expresión, un vector o una terapia génica). En algunos casos, la afección o enfermedad neurológica es cualquier afección o enfermedad relacionada con convulsiones y/o epilepsia en la que están implicadas las neuronas PV.

[0171] Los métodos y composiciones de esta divulgación se pueden usar para tratar a un sujeto al que se le ha diagnosticado una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad neurológica o neurodegenerativa. El sujeto puede ser un paciente que padece una forma de epilepsia. En algunos casos, el sujeto es un paciente con síndrome de Dravet. El sujeto 20 puede ser un paciente que padece una enfermedad neurodegenerativa, por ejemplo, un paciente con la enfermedad de Alzheimer. En algunos casos, la epilepsia, la encefalopatía y/o las convulsiones se asocian con una mutación genética en SCN8A. En algunos casos, una mutación genética en SCN8A puede dar lugar a síndromes de epilepsia, por ejemplo, el síndrome de Dravet. En algunos casos, una mutación genética en STXBP1 se asocia con encefalopatía con epilepsia, 25 caracterizada por convulsiones recurrentes.

[0172] En algunos casos, un sujeto tratado con una o más composiciones descritas en el presente documento es uno diagnosticado con una mutación o aberración genética en un canal iónico o un regulador de neurotransmisor (por ejemplo, una proteína de unión a sintaxina). Ejemplos de tales mutaciones incluyen mutaciones en SCN1A, SCN2A, SCN8A, 30 SCN1B, SCN2B, KCNC1, KCNC3 y/o STXBP1, o una combinación de las mismas. El casete de expresión que contiene un elemento regulador selectivo de tipo celular como se describe en el presente documento puede administrarse a un sujeto para tratar o prevenir una enfermedad con síntomas asociados con un tipo de célula específico. Por ejemplo, un casete de expresión que comprende un transgén operativamente unido a uno o más elementos reguladores selectivos de 35 células PV se administra a un sujeto que tiene síntomas, o está en riesgo de desarrollar síntomas, asociados con neuronas PV.

[0173] En algunos casos, el tratamiento se puede administrar a un sujeto con, o en riesgo de desarrollar, síndrome de Dravet. Los síntomas asociados con el síndrome de Dravet incluyen convulsiones, defectos de memoria, retraso en el desarrollo, tono muscular deficiente y/o problemas cognitivos. El tratamiento con un casete de expresión de esta divulgación puede dar como resultado una mejora de uno o más síntomas, tal como una reducción en el número, la duración y/o la intensidad de las convulsiones. La administración de una terapia génica como se describe en el presente documento a un sujeto con riesgo de desarrollar el síndrome de Dravet puede prevenir el desarrollo o retardar la progresión de uno o más síntomas.

[0174] En otro ejemplo, el tratamiento puede administrarse a un sujeto que padece la enfermedad de Alzheimer. Los síntomas asociados con la enfermedad de Alzheimer incluyen pérdida de memoria a corto plazo, dificultades cognitivas, convulsiones y dificultades con el lenguaje, las funciones ejecutivas, la percepción (agnosia) y la ejecución de movimientos (apraxia). El tratamiento con un casete de expresión de esta divulgación puede dar como resultado una mejora de uno o más síntomas de la enfermedad de Alzheimer, tal como una reducción en la progresión de la pérdida de memoria o la 50 prevención de uno o más síntomas. En algunos casos, el tratamiento puede dar como resultado una corrección de la actividad cerebral de alto poder gamma. El tratamiento puede dar como resultado una disminución en la frecuencia y/o gravedad de las convulsiones, o una disminución en la actividad de alto poder gamma en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 70 %. En algunos casos, el tratamiento puede resultar en una mejora de la función cognitiva. El aprendizaje y/o la memoria se pueden mejorar en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o más del 100 %.

[0175] Los métodos y composiciones de esta divulgación se pueden usar para tratar a un sujeto que está en riesgo de desarrollar una enfermedad. Se puede saber que el sujeto está predisposto a una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad neurológica o una enfermedad asociada con epilepsia, convulsiones y/o encefalopatía. El sujeto puede estar 55 predisposto a una enfermedad debido a un evento genético, o bien a factores de riesgo conocidos. Por ejemplo, un sujeto puede portar una mutación en SCN1A asociada con el síndrome de Dravet. En algunos casos el sujeto puede estar predisposto a una enfermedad como la enfermedad de Alzheimer debido a la edad del sujeto.

[0176] El tratamiento puede dar como resultado una disminución o el cese de los síntomas. Por ejemplo, el tratamiento 60 puede mejorar el aprendizaje, la memoria, la función cognitiva y/o la función motora; reducir la frecuencia y/o duración de las convulsiones; y/o reducir la sensibilidad a la temperatura (o aumentar el umbral de temperatura para desencadenar una convulsión).

- 5 [0177] En algunos casos, el tipo de célula objetivo de una terapia génica o casete de expresión divulgado en el presente documento es una célula PV. En algunos casos, los subtipos de células no objetivo son al menos uno, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro de los subtipos GABAérgicos no PV descritos en el presente documento. En algunos casos, un casete de expresión que comprende un elemento regulador descrito en el presente documento es selectivo para las células PV sobre todas las células del SNC que no son PV. En algunos casos, la selectividad del tipo celular se mide según un ensayo de colocalización descrito en el presente documento. En algunos casos, la selectividad del tipo de célula se mide utilizando un ratón que expresa Cre en el tipo de célula objetivo.
- 10 [0178] En algunos casos, el tratamiento no da como resultado una reacción adversa para el sujeto. El tratamiento con una terapia génica que contiene un elemento regulador selectivo de PV puede causar menos reacciones adversas o menos graves en un sujeto que el tratamiento con una terapia génica similar que contiene el mismo transgén vinculado a un elemento regulador no selectivo.
- 15 [0179] En diversos aspectos, cualquier casete de expresión descrito en el presente documento puede adaptarse o usarse en una terapia génica (por ejemplo, terapia génica rAAV o rAAV9) para tratar uno cualquiera o más de síndrome de Dravet, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, neurodegeneración, tauopatía, hipoexcitabilidad neuronal y/o convulsiones. En algunos casos, una terapia génica comprende uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, o diez o más de SEQ ID NO: 1-32, o un fragmento funcional o una combinación 20 de los mismos, o secuencias que tienen al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con las mismas, operativamente vinculado a un transgén. En algunos casos, una terapia génica comprende un casete de expresión de esta divulgación. En algunos casos, una terapia génica comprende uno o más elementos reguladores descritos en el presente documento unidos operativamente a cualquier transgén (por ejemplo, un transgén informador o un transgén terapéutico) de manera que los elementos reguladores impulsan la expresión selectiva o la expresión preferencial en al menos un tipo de célula objetivo en un nivel que es estadísticamente significativamente mayor que la expresión impulsada por CAG o EF1 α o un elemento regulador no selectivo cuando se une operativamente al mismo transgén, o por la misma construcción sin los elementos reguladores. 25 En algunos casos, significa estadísticamente significativamente más alto que los elementos reguladores impulsan la expresión selectiva en el tipo de célula objetivo a un nivel que es al menos 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 30 80, 85, 90, 95 o 100 veces el nivel de expresión por el CAG, EF1 α , un promotor constitutivo o un elemento regulador no selectivo cuando está vinculado operativamente al mismo transgén en el tipo de célula objetivo, o mediante la misma construcción sin los elementos reguladores. En algunos casos, dicha expresión selectiva de tipo celular se analiza usando un ensayo de colocalización como se describe en el presente documento. En algunos casos, el transgén es uno o más 35 de SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, STXBP1 y un fragmento funcional de los mismos. En algunos casos, el transgén es una proteína de unión al ADN que modula la expresión de un gen endógeno, como un modulador transcripcional, un activador transcripcional o un represor transcripcional. En algunos casos, el transgén es una proteína de unión a ADN que comprende un dominio de unión a ADN de una proteína de unión a ADN o una proteína de escisión de ADN (por ejemplo, una nucleasa, una enzima de restricción, una recombinasa, etc.) en donde el dominio de escisión 40 de ADN o dominio de nucleasa se ha desactivado, por ejemplo, una Cas desactivada por nucleasa (dCas), una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción desactivada o una proteína con dedos de zinc desactivada por nucleasa. En algunos casos, el dominio de unión al ADN está unido a un dominio modulador de la transcripción (p. ej., un dominio activador o represor de la transcripción). En algunos casos, el transgén es una proteína de edición de genes, como una nucleasa con dedos de zinc o una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción. En algunos casos, un transgén es un gen informador o un marcador detectable, como eGFP, tdTomato o RFP. En algunos casos, un transgén 45 es una proteína Cas, como Cas9.
- 50 [0180] En algunos casos, una terapia génica que comprende un casete de expresión divulgado en el presente documento se usa para tratar una afección o enfermedad neurológica. En algunos casos, una terapia génica que comprende un casete de expresión divulgado en el presente documento se usa para tratar una afección o enfermedad neurológica, en donde el casete de expresión comprende uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, o diez o más de SEQ ID NO: 1-32, o un fragmento funcional o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con el mismo, operativamente unido a un transgén. En algunos casos, el transgén es uno cualquiera o más de SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, STXBP1, una proteína de unión a ADN y un fragmento funcional de la misma. En algunos casos, se usa una terapia génica que comprende un casete de expresión descrito en el presente documento para tratar el síndrome de Dravet. En algunos aspectos, una terapia génica que comprende un casete de expresión divulgado en el presente documento se usa para tratar la enfermedad de Alzheimer. En algunos casos, una terapia génica que comprende un casete de expresión descrito en el presente documento se usa para tratar la epilepsia y/o los síntomas de convulsiones asociados con el síndrome de Dravet y/o la enfermedad de Alzheimer. En algunos casos, tratar cualquiera de los síndromes de Dravet, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, neurodegeneración, tauopatía, hipoexcitabilidad neuronal y/o convulsiones comprende entregar o administrar una terapia génica de esta divulgación a una célula de un sujeto que la necesita. En algunos casos, el sujeto que lo necesita tiene riesgo de padecer o tiene alguno de los síndromes de Dravet, enfermedad de Alzheimer, epilepsia y/o convulsiones. En algunos casos, el sujeto es un niño o un menor de edad. En algunos casos, una terapia génica que comprende un casete de expresión divulgado en el presente documento se usa para tratar a un bebé, un niño o un menor 55

diagnosticado con síndrome de Dravet o que está en riesgo de desarrollarlo. En algunos casos, una terapia génica que comprende un casete de expresión divulgado en el presente documento se usa para tratar a un sujeto que comprende una mutación o un defecto genético en uno cualquiera o más de SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, y STXBP1.

5

[0181] En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un método para tratar cualquiera de los síndromes de Dravet, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, neurodegeneración, tauopatía, hipoexcitabilidad neuronal y/o convulsiones, que comprende administrar una terapia génica en una célula de un sujeto, en donde la terapia génica comprende un casete de expresión divulgado en el presente documento. En algunos casos, dicho casete de expresión comprende uno cualquiera o más de SEQ ID NO: 1-32, o un fragmento funcional o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con el mismo, operativamente unido a un transgén, en el que el transgén es cualquiera de SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, STXBP1 y un fragmento funcional del mismo. En algunos casos, el transgén es una subunidad de un canal iónico de sodio o un canal iónico de potasio. En algunos casos, el transgén es una proteína de unión a sintaxina. En algunos casos, el transgén es un modulador transcripcional, por ejemplo, un activador transcripcional o un represor transcripcional. En algunos casos, el transgén es un modulador transcripcional que modula la expresión de un gen endógeno (por ejemplo, SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3 o STXBP1). En algunos casos, un transgén es una proteína de edición de genes, como una nucleasa con dedos de zinc o una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción. En algunos casos, el transgén es una proteína Cas, como Cas9.

20

[0182] En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un método para modificar cualquier terapia génica diseñada para tratar el síndrome de Dravet, la enfermedad de Alzheimer, la epilepsia, la neurodegeneración, la tauopatía, la hipoexcitabilidad neuronal y/o las convulsiones mediante la adición de uno o más elementos reguladores divulgados en el presente documento para mejorar la selectividad del tipo celular de la terapia génica. En algunos casos, la terapia génica es una terapia génica rAAV.

25

[0183] En algunos casos, el tratamiento con un casete de expresión descrito en el presente documento reduce la duración y/o frecuencia de las convulsiones, por ejemplo, convulsiones asociadas con el síndrome de Dravet, en al menos un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % en comparación con un control no tratado o en comparación con el nivel antes del tratamiento.

30

[0184] En algunos casos, el tratamiento con un casete de expresión descrito en el presente documento reduce la actividad de alto poder gamma (por ejemplo, actividad de alto poder gamma asociada con la enfermedad de Alzheimer) en al menos un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % en comparación con un control no tratado o en comparación con el nivel anterior tratamiento.

40

[0185] En un aspecto, la presente divulgación proporciona un casete de ácido nucleico de esta divulgación que comprende uno o más elementos reguladores unidos operativamente a un transgén que dan como resultado la expresión selectiva en un tipo de célula objetivo sobre uno o más tipos de células no objetivo, por ejemplo, expresión selectiva en neuronas PV del SNC sobre uno o más tipos de células del SNC no PV. En algunos casos, cada uno de los elementos reguladores comprende (i) una secuencia de SEQ ID NO: 1-32, (ii) un fragmento funcional o una combinación de los mismos, o (iii) una secuencia con al menos un 80 % de identidad de secuencia con (i) o (ii). En algunos casos, el porcentaje de identidad de secuencia se puede medir utilizando BLAST. En algunos casos, al menos uno de los elementos reguladores es de origen humano. En algunos casos, al menos uno de los elementos reguladores deriva de un mamífero no humano. En algunos casos, los elementos regulatorios no ocurren de forma natural. En algunos casos, los elementos reguladores dan como resultado una selectividad de expresión en células PV que es mayor que la expresión del transgén operativamente unido a CAG o EF1 α o un elemento regulador no selectivo medido mediante un ensayo de colocalización. En algunos casos, un transgén es uno o más de SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3 y STXBP1, o un fragmento funcional del mismo, o secuencias que tienen al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con el mismo. En algunos casos, un transgén es una proteína de unión al ADN que modula la expresión de un gen (p. ej., un gen endógeno como SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3 y STXBP1), como transcripcional, modulador, activador transcripcional o represor transcripcional. En algunos casos, un transgén es una proteína de edición de genes, como una nucleasa con dedos de zinc o una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción. En algunos casos, un transgén es un gen informador o un marcador detectable, como eGFP, tdTomato o RFP. En algunos casos, un transgén es una proteína Cas, como Cas9. En algunos casos, los elementos reguladores dan como resultado una expresión selectiva en células PV a un nivel que es al menos 0,5 veces, al menos 0,6 veces, al menos 0,7 veces, al menos 0,8 veces, al menos 0,9 veces, al menos 1,1 veces, al menos 0,8 veces, al menos 0,9 veces, al menos 1,1 veces, al menos 1,2 veces, al menos 1,3 veces, al menos 1,4 veces, al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, en al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 11 veces, al menos 12 veces, al menos 13 veces, al menos 14 veces, al menos 15 veces, al menos 16 veces, al menos 17 veces, en al menos 18 veces, al menos 19 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces, al menos 60 veces,

al menos 70 veces, al menos 80 veces, en al menos 90 veces, al menos 100 veces en comparación con la de un CAG o EF1α o un elemento regulador no selectivo, según se mide mediante el ensayo de colocalización. En algunos casos, una diferencia de veces se refiere a la diferencia de veces entre el porcentaje de células eGFP+, PV+ que resultan de uno o más elementos reguladores y el de un elemento regulador no selectivo. En algunos casos, el ensayo de colocalización es un ensayo inmunohistoquímico, como se describe a continuación en el Ejemplo 5. En algunos casos, se realiza un ensayo de colocalización usando un anticuerpo anti-PV disponible comercialmente. En algunos casos, el transgén codifica una subunidad de canal iónico, un regulador de neurotransmisor o una variante o fragmento funcional del mismo. En algunos casos, la subunidad del canal iónico es una subunidad alfa o una subunidad beta de un canal iónico de sodio o una subunidad de un canal iónico de potasio. En algunos casos, el transgén es cualquiera de (i) SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3 o una proteína de unión a ADN; (ii) un fragmento funcional del mismo; o (iii) una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con (i) o (ii). En algunos casos, el regulador del neurotransmisor es (i) STXBP1, (ii) un fragmento funcional del mismo, o (iii) una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con (i) o (ii). En algunos casos, los elementos reguladores y el transgén operativamente unido se encuentran en cromosomas diferentes. En algunos casos, los elementos reguladores combinados tienen un tamaño inferior a 2,5 kb, 5 menos de 1,5 kb, menos de 1 kb o menos de 500 pb. En algunos casos, las células no PV comprenden uno o más tipos de células del SNC no PV, incluidas, entre otras, neuronas excitadoras, neuronas dopamínergicas, astrocitos, microglía o neuronas motoras. En algunos casos, el casete de ácido nucleico es una construcción lineal. En algunos casos, el casete de ácido nucleico es un vector. En algunos casos, el casete de ácido nucleico es un plásmido. En algunos casos, el vector es un vector viral. En algunos casos, el vector viral es un vector de virus adenoasociado (AAV). En algunos casos, el vector de AAV es AAV1, AAV8, AAV9, scAAV1, scAAV8 o scAAV9. En algunos casos, el vector viral es un vector lentiviral. 10 En algunos casos, los elementos reguladores contienen menos de 600 pb de secuencia contigua dentro de 10 kb del sitio de inicio de la transcripción de GAD2, GAD1, SYN1, NKX2.1, DLX1, DLX5/6, SST, PV y/o VIP.

15

20

25

30

35

[0186] En diversas formas de realización descritas en el presente documento, un elemento regulador es inferior a 2050 pb, 2000 pb, 1900 pb, 1800 pb, 1700 pb, 1600 pb, 1500 pb, 1400 pb, 1300 pb, 1200 pb, 1100 pb, 1000 pb, 800 pb, 700 pb, 600 pb, 500 pb, 400 pb, 300 pb, 200 pb, 100 pb, 90 pb, 80 pb, 70 pb, 60 pb, 50 pb, 40 pb, 30 pb, 20 pb, 10 pb o 5 pb. En diversas formas de realización descritas en el presente documento, un casete de expresión comprende un transgén que es mayor que el tamaño de un transgén típico en un vector viral convencional, por ejemplo, AAV. En algunos aspectos, un casete de expresión de cualquier forma de realización divulgada en el presente documento comprende un transgén que tiene al menos 1 kb, 1,5 kb, 2 kb, 2,5 kb, 3 kb, 3,5 kb, 4 kb, 4,5 kb, 5 kb, 5,5 kb, 6 kb, 6,5 kb, 7 kb, 7,5 kb u 8 kb. En algunos aspectos, cualquier forma de realización descrita en el presente documento comprende un casete de expresión (p. ej., AAV) que comprende un transgén que es más de 1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9 o 4 kb de tamaño. En algunos aspectos, cualquier forma de realización descrita en el presente documento puede comprender además una o más secuencias o elementos de ácidos nucleicos heterólogos.

[0187] En un aspecto, un método para tratar un trastorno o afección neurológica en un sujeto que lo necesita comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un casete de ácido nucleico descrito en el presente documento. En otro aspecto, un método para aumentar la expresión selectiva de un transgén en neuronas PV comprende poner en contacto una célula con un casete de ácido nucleico descrito en el presente documento. En algunos casos, un método de cualquier forma de realización divulgada en el presente documento se usa para tratar una afección o enfermedad neurológica, por ejemplo, un trastorno psiquiátrico (por ejemplo, esquizofrenia, trastorno obsesivo compulsivo, adicción, depresión, ansiedad, psicosis); un trastorno del espectro autista (p. ej., síndrome de X frágil, síndrome de Rett); epilepsia (p. ej., síndrome de Dravet, encefalopatía traumática crónica, epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus (GEFS+), encefalopatía epiléptica, epilepsia del lóbulo temporal, epilepsia focal, esclerosis tuberosa); o neurodegeneración (p. ej., enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson). En algunos casos, se puede usar un método de cualquier forma de realización descrita en el presente documento para tratar el síndrome de Dravet. Se puede usar un método de cualquier forma de realización divulgada en el presente documento para tratar la enfermedad de Alzheimer. En algunos casos, los métodos y/o composiciones de esta divulgación se pueden usar para tratar cualquier condición o enfermedad neurológica asociada con convulsiones y/o epilepsia, y/o en la que las neuronas PV están implicadas.

[0188] En un aspecto, una afección neurológica descrita en el presente documento se trata con una terapia génica, preferiblemente una que dé como resultado una expresión preferencial en un tipo de tejido o tipo de célula sobre otro, por ejemplo, una neurona PV según se determina mediante un ensayo de colocalización. En algunos casos, la terapia génica es un AAV.

[0189] En un aspecto, un método para dirigir la expresión de cualquier transgén a neuronas PV en el SNC comprende vincular operativamente uno o más elementos reguladores selectivos de neuronas PV a un transgén. En algunos casos, los elementos reguladores comprenden una o más secuencias de SEQ ID NO: 1-32, o secuencias con al menos 80 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1-32, o un fragmento funcional de las mismas. En algunos casos, los elementos reguladores dan como resultado una expresión selectiva en neuronas PV a un nivel que es al menos 2 veces, al menos 5 veces, o al menos 7 veces, o al menos 10 veces en comparación con CAG o EF1α o un elemento regulador no selectivo unido operativamente al transgén, medido mediante un ensayo de colocalización. En algunos casos, el transgén es SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, STXBP1, una proteína de unión al ADN o un fragmento

funcional de la misma. En algunos casos, los elementos reguladores y el transgén se encuentran en un AAV. En algunos casos, el AAV es AAV9.

- 5 [0190] En un aspecto, un método para tratar una afección o trastorno neurológico en un sujeto que lo necesita comprende poner en contacto una célula con un casete de ácido nucleico que comprende uno o más elementos reguladores unidos operativamente a un transgén que da como resultado la expresión selectiva en neuronas PV sobre una o más células del SNC no fotovoltaicas. En algunos casos, los elementos reguladores comprenden uno o más de SEQ ID NO: 1-32, o un fragmento funcional o una combinación de los mismos, o secuencias que tienen al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos un 99 % de identidad de secuencia con el mismo. En algunos casos, el transgén es una subunidad de canal iónico dependiente de voltaje, o una variante o un fragmento funcional del mismo. En algunos casos, la subunidad es una subunidad beta de un canal iónico de sodio. En algunos casos, la subunidad es una subunidad alfa de un canal iónico de sodio. En algunos casos, la subunidad es de un canal iónico de potasio. En algunos casos, el transgén es cualquiera de (i) SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, una proteína de unión a ADN o STXBP1; (ii) un fragmento funcional del mismo; o (iii) una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con (i) o (ii). En algunos casos, la afección o trastorno neurológico está asociado con una haploinsuficiencia o una mutación en cualquiera de SCN1A, SCN1B, SCN2B, KV3.1 y KV3.3. En algunos casos, la condición o trastorno neurológico es el síndrome de Dravet. En algunos casos, la condición o trastorno neurológico es la enfermedad de Alzheimer. En algunos casos, la afección o enfermedad neurológica es un trastorno psiquiátrico (p. ej., esquizofrenia, trastorno obsesivo compulsivo, adicción, depresión, ansiedad, psicosis); un trastorno del espectro autista (p. ej., síndrome de X frágil, síndrome de Rett); epilepsia (p. ej., encefalopatía traumática crónica, epilepsia generalizada con convulsiones febiles plus (GEFS+), encefalopatía epiléptica, epilepsia del lóbulo temporal, epilepsia focal, esclerosis tuberosa); o neurodegeneración (p. ej., enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson). En algunos casos, la afección o enfermedad neurológica es cualquier afección o enfermedad relacionada con convulsiones y/o epilepsia en la que están implicadas las neuronas PV. En algunos casos, el casete de ácido nucleico da como resultado una expresión selectiva en neuronas PV a un nivel que es al menos 2 veces, al menos 5 veces, o al menos 7 veces, o al menos 10 veces en comparación con CAG o EF1 α o un elemento regulador no selectivo vinculado operativamente al transgén, medido mediante un ensayo de colocalización. En algunos casos, el casete de ácido nucleico está en un AAV. En algunos casos, el AAV es AAV9.
- 10 30 [0191] En un aspecto, un método para tratar el síndrome de Dravet comprende poner en contacto una célula con un AAV que comprende un transgén que es cualquiera de (i) SCN1A, SCN1B, SCN2B, una proteína de unión al ADN (ii) un fragmento funcional de la misma, o (iii) una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con (i) o (ii). En algunos casos, el AAV comprende además uno o más elementos reguladores selectivos de neuronas PV o cualquiera de los elementos reguladores descritos en el presente documento unidos operativamente al transgén. En algunos casos, 35 cada uno de los elementos reguladores comprende independientemente una secuencia que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 1-32, o cualquier fragmento funcional o combinación de los mismos, o una secuencia que comprende al menos un 80 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 1-32.
- 40 45 [0192] En otro aspecto, un método para tratar la enfermedad de Alzheimer comprende poner en contacto una célula con un AAV que comprende un transgén que es cualquiera de (i) SCN1A, SCN2B, KV3.1, KV3.3 y STXBP1, (ii) un agente funcional fragmento del mismo, y (iii) una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con (i) o (ii). En algunos casos, el AAV comprende además uno o más elementos reguladores selectivos de neuronas PV unidos operativamente al transgén. En algunos casos, cada uno de los elementos reguladores comprende independientemente una secuencia que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 1-32, o cualquier fragmento funcional o combinación de los mismos, o una secuencia que comprende al menos un 80 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 1-32.

EJEMPLOS

- 50 55 [0193] Estos ejemplos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos.

EJEMPLO 1

Identificación de supuestos elementos reguladores selectivos de energía fotovoltaica

- 60 65 [0194] Para identificar y seleccionar elementos reguladores putativos que son selectivos para células PV, se pueden recolectar células PV de un ratón knockin R26-CAG-LSL-Sun1-sfGFP-Myc usando purificación por afinidad, por ejemplo, usando anti-GFP o anticuerpos anti-Myc y perlas magnéticas recubiertas de proteína G. Las células PV se pueden enriquecer utilizando perlas recubiertas de anticuerpos anti-PV o una matriz de purificación por afinidad. A continuación, se aislan los núcleos de las células fotovoltaicas. El ARN nuclear se puede purificar a partir de los núcleos, convertirlo en ADNc y amplificarlo con el Nugen Ovation RNA-seq System V2 (Nugen 7102), seguido de secuenciación utilizando Illumina HISEQ® 2500. El ADN genómico se puede purificar a partir de núcleos, fragmentarlo y se utiliza para crear bibliotecas de metilCseq, que se pueden secuenciar utilizando Illumina HISEQ® 2000. Para generar una biblioteca ATAC-seq, los núcleos unidos a perlas se transponen utilizando la transposasa Tn5 (Illumina FC-121-1030). Después de 9 a 12 ciclos de amplificación por PCR, las bibliotecas se secuencian utilizando un Illumina HISEQ® 2500. Para generar una biblioteca ChIP-seq, los núcleos de las células PV se digieren en mononucleosomas usando nucleasa microcócica,

seguido de la extracción con sal de cromatina y ChIP nativo y construcción de bibliotecas, que se puede secuenciar en un Illumina HISEQ® 2500. Después de secuenciar estas bibliotecas, las secuencias se mapean para identificar correlaciones y patrones en la hipometilación en regiones ricas en CG, modificaciones de histonas, sitios de unión de factores transcripcionales y patrones asociados con factores transcripcionales altamente expresados en células fotovoltaicas. Las características y correlaciones superpuestas de múltiples ensayos y/o bibliotecas descritas anteriormente proporcionan evidencia convergente para identificar secuencias candidatas que son supuestos elementos reguladores selectivos de PV. Los supuestos elementos reguladores selectivos de PV se pueden probar adicionalmente usando un ensayo de colocalización como se describe en el Ejemplo 5 a continuación. Los supuestos elementos reguladores selectivos de PV también se pueden probar en el ratón B6 PV-Cre (Jackson Laboratory), que es un ratón B6 PV-Cre knock-in que expresa la recombinasa Cre en la expresión de parvalbúmina, como se describe en el Ejemplo 2 a continuación. Después de validar la selectividad PV de los elementos reguladores, los elementos reguladores pueden unirse operativamente a un transgén para dirigir la expresión selectivamente a células PV en al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o más de cinco células no PV.

15 EJEMPLO 2

Selectividad para neuronas PV en ratón PV-Cre

20 [0195] La selectividad para las neuronas PV se puede determinar usando imágenes fluorescentes. Los vectores AAV9 que contienen eGFP operativamente unido a (i) un promotor de control (EF1a); o (ii) un ER selectivo para PV identificado en el Ejemplo 1 anterior; o (iii) un sistema fotovoltaico selectivo ER seleccionó SEQ ID NO: 1-32; y los vectores AAV9 que contienen un tdTomato dependiente de Cre se coinyectan en un ratón B6 PVCre (Jackson Labs). PV-Cre es un ratón knock-in que expresa la recombinasa Cre en neuronas que expresan parvalbúmina (como las interneuronas del cerebro y las neuronas sensoriales aferentes propioceptivas en los ganglios de la raíz dorsal), sin alterar la expresión endógena de Pvalb.

25 [0196] Se infunden a los ratones bilateralmente 1,5 μ L de vector AAV9 (5¹² a 1¹³ gc/ml) en el hipocampo dorsal y ventral a una velocidad de 0,3 μ L/min con un período de descanso de 4 minutos después de la inyección. Se anestesian los ratones para la inyección. Los animales se colocan en un marco estereotáxico (Kopf Instruments, EE. UU.), utilizando las 30 siguientes coordenadas para el hipocampo dorsal (AP -2,0 mm, lateral \pm 1,5, DV -1,4 mm desde la duramadre) y el hipocampo ventral (AP -3,1 mm, lateral \pm 2,8, DV -3,8 mm de la duramadre). Se puede utilizar una jeringa Hamilton (modelo n.º 80308; jeringa de 10 μ L con la correspondiente aguja de punta roma de calibre 30 ga) con el micromanipulador estereotáctico para designar y perforar los orificios de la fresa. El taladro sólo se utiliza para penetrar el hueso. Después 35 de la perforación, la cánula de infusión se baja al interior del cerebro hasta la profundidad del lugar deseado para la inyección, por ejemplo, volumen de inyección: 1,5 μ L; Velocidad de inyección: 0,3 μ L/min. Antes de la infusión, se deja que la aguja se equilibre durante 1 minuto. Una vez que se completa la administración, se deja la aguja durante 4 minutos y luego se retira durante aproximadamente 1 minuto. Una vez que se completan todas las infusiones, la incisión en la piel se cierra con suturas y se administran analgésicos posquirúrgicos. Los ratones tratados se someten a controles de salud 40 diarios durante el resto del estudio y se pesan una vez por semana para controlar el peso corporal.

[0197] Para la recolección de tejido, los ratones se sacrifican mediante sobredosis de isoflurano y se perfunden con paraformaldehído (PFA) al 4 %. Se extrae un trozo de tejido cerebral que contiene el hipocampo y se coloca en PFA al 4 % a 4°C durante al menos 12 horas. A continuación, el tejido cerebral se deshidrata en sacarosa al 30 % (en solución salina tamponada con fosfato) a 4°C hasta que el tejido se hunde hasta el fondo del tubo. El tejido cerebral se incluye en 45 TISSUE-TEK® OCT para seccionarlo en un criostato. El tejido cerebral seccionado se tiñe para eGFP y tdTomato mediante procedimientos inmunohistoquímicos estándar con anticuerpo polyclonal de conejo anti-RFP (Rockland Antibodies and Assay) y anticuerpo polyclonal de pollo anti-eGFP (Aves Labs). Se utilizan imágenes de microscopio de fluorescencia para visualizar las células eGFP, o fluorescencia verde, corresponde a toda la expresión genética. La fluorescencia roja de tdTomato corresponde a células PV+. Una superposición de las dos señales de fluorescencia, que 50 pueden visualizarse como células amarillas o blancas, representa células PV+ que expresan el transgén eGFP. Se espera que los vectores AAV9 que comprenden un elemento regulador selectivo de PV produzcan un mayor número de células que son eGFP+ y PV+ en comparación con el promotor de control (EF1a). Por ejemplo, se espera que las imágenes de fluorescencia de células de ratones inyectados con AAV9 que comprenden cualquiera de los ER selectivos para PV (por ejemplo, SEQ ID NO: 1-32 o ER putativos identificados en el Ejemplo 1) muestren un mayor número de células eGFP+ 55 que también son PV+. La selectividad de las células fotovoltaicas se puede cuantificar como porcentaje de todas las células eGFP+ que también son PV+.

EJEMPLO 3

60 Reducción de convulsiones en el modelo de ratón Dravet

[0198] Se obtuvieron ratones B6(Cg)-Scn1a^{tm1.1Dsf}/J de la Federación Europea del síndrome de Dravet a través de los Laboratorios Jackson. Estos ratones contienen una mutación asociada al síndrome de Dravet en el exón 24 de SCN1A (A a V en la posición 1783). Los ratones también contienen un exón 24 floxado con secuencia de tipo salvaje. Cuando no 65 se manipula, esta cepa de ratones expresa dos copias del alelo WT de SCN1A. Sin embargo, tras la administración de un AAV que expresa la recombinasa Cre, cualquier célula a la que se dirige el AAV cambiará para expresar una copia del

alelo mutante. Tras la expresión de la subunidad SCN1A mutante, los ratones desarrollan convulsiones espontáneas en un plazo de 10 días.

5 **[0199]** Se inyectaron ratones B6(Cg)-*Scn1a^{tm1.1Dsf}*J y C57BL6 de control, como en el Ejemplo 2, con AAV que expresan CRE recombinasa bajo el control del promotor EF1α y un AAV que comprende el elemento regulador selectivo de células PV SEQ ID NO: 32 expresión impulsora de eGFP (SEQ ID NO: 36) o SCN1B (SEQ ID NO: 37). Una vez que se completaron las cuatro infusiones, se realizó inmediatamente la implantación de telemetría (F20-EET, Data Sciences International). Los datos del electrocorticograma se monitorearon continuamente durante 14 días a partir de los 10 días posteriores a la cirugía. Se analizaron los datos del electrocorticograma y se registraron todos los eventos de convulsiones, 10 anotados con fecha, hora de inicio, hora de finalización, duración de las convulsiones y puntuación de gravedad. FIG. 1 ilustra la frecuencia de las convulsiones en períodos de 12 horas durante los 14 días posteriores al tratamiento. Los ratones tratados con SCN1B mostraron una tendencia hacia una menor frecuencia de convulsiones en comparación con los animales de control.

15 **[0200]** Esta observación fue consistente con la noción de que la unidad beta del canal iónico de sodio, por ejemplo, SCN1B, puede contribuir al tráfico y ensamblaje del canal iónico de sodio y que aumentar la expresión de la unidad beta selectivamente en neuronas PV puede dar como resultado un mayor tráfico y ensamblaje del canal Nav1.1, lo que conduce a una tendencia hacia una menor frecuencia y duración de las convulsiones en los ratones tratados con terapia 20 génica SCN1B.

EJEMPLO 4

Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un modelo de ratón

25 **[0201]** Se utilizaron ratones hembra APP/PS1 y WT criados en PSYCHOGENICS®. Los ratones APP/PS1 contienen transgenes humanos tanto para la proteína precursora del beta amiloide (APP) que porta la mutación sueca (670 GT y 671 AC) como para la presenilina 1 (PSEN1) que contiene una mutación L166P, ambas bajo el control del promotor Thy1. Estos ratones desarrollan síntomas de la enfermedad de Alzheimer, incluidas placas amiloides y defectos de memoria. 30 Se puede encontrar una descripción más detallada de estos ratones en Radde et al., 2006 (Radde, Rebecca, et al. "Aβ42-driven cerebral amyloidosis in transgenic ratones revela una patología temprana y robusta". EMBO reports 7.9 (2006): 940-946).

35 **[0202]** Se utilizaron ratones APP/PS1 como modelo para determinar el efecto del tratamiento con SCN1B bajo el control de un ER sobre los síntomas de la enfermedad de Alzheimer. A ratones APP/PS1 y controles no transgénicos se les inyectó un vector de control que expresa eGFP o un vector de tratamiento que expresa SCN1B, ambos bajo el control de SEQ ID NO: 32; e implantado con un transmisor EET como en el Ejemplo 3. La actividad cerebral se evaluó durante 24 horas a las 4 semanas después de la cirugía. Los datos del electrocorticograma se analizaron automáticamente y se compararon los niveles de potencia en las diferentes bandas de frecuencia. FIG. 2 ilustra la alta potencia gamma (50-100 Hz) en ratones controles no transgénicos (WT), APP/PS1 y APP/PS1 tratados con SCN1B. El aumento de la actividad de 40 alto poder gamma se asocia con convulsiones en pacientes con Alzheimer y epilepsia. Los ratones APP/PS1 mostraron un mayor nivel de actividad de alto poder gamma que los ratones de control. Sin embargo, el aumento estuvo ausente en los ratones tratados, lo que indica un tratamiento eficaz con el vector.

EJEMPLO 5

Selectividad para neuronas PV en ratón C57BL/6J (WT)

50 **[0203]** La selectividad de diversos ER divulgados en el presente documento se probó para determinar la expresión génica 55 selectiva en neuronas PV usando métodos inmunohistoquímicos. Se utilizó la línea de ratón C57BL/6J (WT) para los ensayos inmunohistoquímicos de PV. Casetes de expresión que comprenden el transgén informador eGFP unido operativamente a un elemento regulador (SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 8) o un promotor CAG en una construcción de AAV9.

60 **[0204] Infusiones sistémicas para crías:** A ratones C57BL/6J del día posnatal 1 se les infundió mediante inyección en la vena facial el vector AA9 (1 E¹² a 3 E¹²) utilizando una jeringa de insulina de 300 U con una aguja de 31 G. Para la recolección de tejido, los ratones fueron sacrificados 21 días después de la infusión mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (i.p.) y se les perfundió con solución salina heparinizada (2,5 UI/ml) seguido de una perfusión con formaldehído al 4 %. Se extrajeron los cerebros y posteriormente se fijaron por inmersión en formaldehído al 4 % durante 24 a 48 horas a 4 grados Celsius. A continuación, el cerebro se colocó en PBS que contenía un 30 % de sacarosa y se dejó 65 descender a 4 grados Celsius (~2-3 días). Tras el hundimiento, los hemisferios cerebrales individuales se congelaron en TISSUE-TEK® OCT con la línea media hacia abajo. Los cerebros congelados se procesaron para secciones sagitales en un criostato y se colocaron flotando libremente en PBS. Las secciones se tiñeron para eGFP y parvalbúmina (PV) utilizando procedimientos inmunohistoquímicos estándar con anti-GFP de pollo (Aves Lab, GFP-1020) y anti-PV de ratón (Sigma, P3088).

5 **[0205] Infusiones sistémicas para adultos:** A ratones C57BL/6 de 4 semanas de edad se les infundió mediante inyección en la vena de la cola 60 μ L de vector AAV9 (4,9¹³ a 1¹⁴ gc/ml) que expresa eGFP. Para la recolección de tejido, los ratones fueron sacrificados 21 días después de la infusión mediante una sobredosis de isoflurano y se extrajeron cerebros completos, se lavaron con PBS y se colocaron en tubos separados de 5 ml que contenían formaldehído al 4 % enfriado con hielo. El tejido se fijó a 4 grados Celsius durante la noche. Al día siguiente, el cerebro se colocó en PBS que contenía un 30 % de sacarosa y se dejó descender a 4 grados Celsius. Tras el hundimiento, los hemisferios cerebrales individuales se congelaron en Tissue-Tek OCT con la línea media hacia abajo. Los cerebros congelados se procesaron para secciones sagitales en un criostato y se colocaron flotando libremente en PBS. Las secciones se tiñeron para EGFP y parvalbúmina (PV) utilizando procedimientos inmunohistoquímicos estándar con anti-GFP de pollo (Aves Lab, GFP-1020) y anti-PV de ratón (Sigma, P3088).

10 **[0206] Protocolo de inmunohistoquímica:** se usó inmunohistoquímica para analizar la co-localización de la señal de eGFP y la señal de PV usando el anticuerpo anti-PV, en donde la superposición de las señales se presentó como puntos blancos o gris claro en las imágenes del panel superior (fusión), en donde la superposición representativa se indicó mediante puntas de flecha. La superposición de la fluorescencia de eGFP y PV es indicativa de expresión en células PV. Dichos experimentos se pueden utilizar para determinar la expresión selectiva de la expresión en células PV. Para realizar los experimentos inmunohistoquímicos, los tejidos obtenidos de cada ratón se bloquearon con una solución tampón de bloqueo (que comprende 3 % de BSA, 3 % de NGS, 0,3 % de Triton X-100, 0,2 % de Tween-20 en 1X PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, los tejidos se incubaron con anticuerpos primarios en tampón de bloqueo 20 durante la noche a 4 °C, se lavaron tres veces con 1 mL de PBS 1X, cada uno con un intervalo de 5 minutos. A continuación, los tejidos se incubaron con anticuerpos secundarios en tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de lavados tres veces, cada vez con 1 mL de PBS 1X y con un intervalo de 5 minutos. Los tejidos se incubaron con DAPI (1:1000) en tampón PBS durante 5 minutos y se lavaron dos veces con 1 mL de PBS 1X. Los tejidos se montaron en portaobjetos, se tomaron imágenes y se analizaron utilizando un microscopio de fluorescencia. Las imágenes se tomaron utilizando un sistema de imágenes Vectra 3 (Perkin Elmer) y se cuantificaron para el co-etiquetado 25 de eGFP y tinción PV utilizando inform-Tissue Finder, software avanzado de análisis de imágenes o puntuación manual. Se contaron al menos 80 células positivas para GFP en cada panel antes de determinar el porcentaje de colocalización.

30 **[0207]** Las FIGS. 3A-3C ilustra los resultados de los experimentos de inmunohistoquímica realizados en crías después de inyecciones sistémicas de AAV9. FIGS. 4A-4C ilustra los resultados de experimentos de inmunohistoquímica similares realizados en ratones adultos después de inyecciones de AAV9.

35 **[0208] FIG. 3A** ilustra la superposición de los experimentos de inmunohistoquímica realizados en crías después de inyecciones de AAV9 sistémicas. **FIG. 3B** ilustra la cuantificación de la colocalización de los experimentos de inmunohistoquímica, en los que la selectividad para las células PV se midió como porcentaje de células GFP+ que también eran PV+, en comparación con la expresión de eGFP bajo el control del promotor CAG.

40 **[0209] FIG. 4A** ilustra la superposición de los experimentos de inmunohistoquímica realizados en ratones adultos después de inyecciones sistémicas de AAV9. **FIG. 4B** ilustra la cuantificación de la co-localización de los experimentos de inmunohistoquímica, en los que la selectividad para las células PV se midió como porcentaje de células GFP+ que también eran PV+, en comparación con la expresión de eGFP bajo el control de EF1 α .

45 **[0210]** Se estima que las neuronas GABAérgicas constituyen aproximadamente el 20 % del SNC, mientras que las células PV constituyen aproximadamente el 40 % de las neuronas GABAérgicas, lo que significa que las células PV constituyen aproximadamente el 8 % de todas las neuronas en el SNC. Véase Pelkey, KA et al., 2017; y Lee, S. et al., 2010. Por lo tanto, se podría predecir que aproximadamente el 8 % de las células marcadas por un elemento regulador no selectivo (p. ej., CAG, EF1 α o un promotor constitutivo) serían PV positivas, o dentro de este rango. Por lo tanto, la expresión en células PV por encima del 8 % es indicativa de una mayor selectividad en las células PV. En particular, las inyecciones de AAV9 que comprenden el elemento regulador SEQ ID NO: 8 dieron como resultado aproximadamente el 60 % de las células positivas para PV, lo que fue 7,5 veces mayor de lo esperado por la distribución de células PV.

50 **[0211]** Se realizaron experimentos de inmunohistoquímica similares a los descritos anteriormente para determinar la expresión selectiva de elementos reguladores adicionales, SEQ ID NO: 2-7 y 9-22 en comparación con un elemento regulador no selectivo que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 34, excepto que se utilizó el vector viral AAVDJ para administrar eGFP operativamente vinculado a un elemento regulador en ratones C57BL/6J (WT). Este virus AAVDJ se inyectó directamente en el SNC del hipocampo de ratones adultos. Se contaron al menos 80 células positivas para GFP en cada experimento antes de calcular el porcentaje de colocalización, o selectividad, como porcentaje de células positivas para GFP que también eran positivas para PV. **FIGS. 5A-5F** ilustran las imágenes de fluorescencia utilizadas para determinar la co-localización, o selectividad, medida como porcentaje de células positivas para eGFP que también eran positivas para PV y en comparación con la señal del elemento regulador no selectivo SEQ ID NO: 34. Las células que eran positivas para un marcador aparecen como células blancas/grises en las imágenes. Las imágenes combinadas ilustran la superposición entre las imágenes eGFP y anti-PV correspondientes. Las células que fueron positivas tanto para eGFP como para PV aparecen como células blancas/gris claro en la imagen combinada. **FIG. 6** ilustra la cuantificación del análisis de colocalización, medido como porcentaje de células eGFP+ que también eran PV+.

EJEMPLO 6

Tratamiento del síndrome de Dravet en diferentes líneas de ratones

[0212] El tratamiento del síndrome de Dravet y/o síntomas del mismo usando los casetes de expresión descritos en el presente documento se puede probar en varias líneas de ratones, tales como B6(Cg)-Scn1a^{tm1.1Dsf}J como se describe arriba, líneas de ratón Scn1a^{tm1Kea} y Scn1a-R1470X. Estas líneas de ratones son modelos de ratón establecidos para el síndrome de Dravet. Las líneas de ratones Scn1a^{tm1Kea} y Scn1a-R1470X no requieren recombinasa CRE.

[0213] El ratón Scn1a^{tm1Kea} (disponible en el Laboratorio Jackson; descrito en Hawkins et al., *Scientific Reports*, vol. 7: 15327 (2017)) comprende una eliminación del primer exón codificante de SCN1A. Los ratones homocigotos para el alelo knockout de SCN1A se caracterizan por temblores, ataxia, convulsiones y mueren en el día 16 postnatal. Los ratones heterocigotos con el entorno C57BL/6 desarrollan convulsiones espontáneas y mueren en unas semanas. Esta cepa de ratón se puede utilizar para estudiar la seguridad y eficacia del tratamiento de la epilepsia y el síndrome de Dravet. Véase Miller et al., *Genes Brain Behav.* febrero de 2014; 13(2): 163-72 para obtener información adicional.

[0214] El ratón Scn1a-R1470X es un ratón knock-in que porta un codón de parada prematuro, R1407X, en el exón 21 del gen SCN1A. La misma mutación ha sido identificada como mutación patogénica en tres pacientes SMEI no relacionados. Las crías Scn1a^{RX/RX} se caracterizan por convulsiones espontáneas recurrentes a los 12 días posnatales, incluidas convulsiones tónico-clónicas y clónicas a los 12-16 días posnatales, y movimientos espasmódicos rítmicos y contracción muscular involuntaria. Véase Ogiwara et al., *Journal of Neuroscience*, 30 de mayo de 2007, 27 (22) 5903-5914 para obtener información adicional.

[0215] Para probar las composiciones descritas en el presente documento, tales como la terapia génica con AAV y el tratamiento usando dicha terapia génica, se utilizaron ratones Dravet de cada una de las cepas de ratón descritas anteriormente y ratones de control (por ejemplo, un ratón de tipo salvaje o un ratón Dravet no tratado para la cepa) se inyectan (p. ej., administrados mediante inyección intraperitoneal) con AAV que expresan eGFP u otro gen indicador, o un casete de expresión que comprende uno o más ER selectivos de PV (p. ej., SEQ ID NO: 1-32) como se describe en el presente documento unidos operativamente a un transgén divulgado en el presente documento, tal como SCN1A, SCN1B o SCN2B, o cualquiera de las SEQ ID NO: 37-39, o una variante o fragmento funcional del mismo. Después de las inyecciones de AAV, se controla la supervivencia del ratón a lo largo del tiempo. Se controló diariamente la salud general de todos los ratones (por ejemplo, peso, hidratación, aseo y movilidad) y se registraron las muertes. La implantación de telemetría se puede realizar inmediatamente después de las inyecciones de AAV (F20-EET, Data Sciences International). Los datos del electrocorticograma se pueden registrar y monitorear continuamente durante al menos 14 días a partir de los 10 días posteriores a la cirugía. Todos los eventos convulsivos se pueden registrar durante al menos 14 días después del tratamiento con AAV, anotados con fecha, hora de inicio, hora de finalización, duración y puntuación de gravedad. Una reducción en la frecuencia y/o duración de las convulsiones después del tratamiento con un AAV como se describe anteriormente en comparación con el control de eGFP o un control no tratado es indicativa de la eficacia de la terapia génica para reducir los síntomas y/o la gravedad del síndrome de Dravet.

[0216] Despues del tratamiento de los ratones con AAV, los niveles de expresión del transgén (por ejemplo, SCN1A; SCN1B; SCN2B; una proteína de unión al ADN, tal como un activador transcripcional, que modula un SCN1A, SCN1B o SCN2B endógeno; cualquiera de SEQ ID NO: 37-39; o cualquier variante o fragmento funcional de los mismos) se pueden monitorear a lo largo del tiempo usando diversos métodos de PCR y/o secuenciación para mostrar que el tratamiento con AAV puede dar como resultado un aumento en la expresión génica en células PV. El análisis de transferencia Northern y la hibridación in situ también se pueden utilizar para analizar la expresión transgénica in vivo. El nivel de la proteína expresada a partir de la proteína también puede controlarse después del tratamiento para mostrar que un aumento en la expresión transgénica se correlaciona con un aumento en la proteína correspondiente in vivo. Los niveles de proteína se pueden analizar usando diversos métodos, incluidos, entre otros, análisis de transferencia Western, inmunohistoquímica, histoquímica de inmunofluorescencia y/o ensayos ELISA. La formación de canales iónicos de sodio dependientes de voltaje funcionales también se puede analizar mediante análisis de pinza de corriente.

[0217] Las convulsiones inducidas por hipertermia se pueden evaluar para comparar los ratones de tipo salvaje y/o ratones Dravet no tratados con ratones Dravet tratados con terapia génica de AAV que comprende un casete de expresión descrito en el presente documento (por ejemplo, un casete de expresión que comprende uno o más ER de este divulgación operativamente unido a un transgén de esta divulgación, tal como SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, un fragmento funcional del mismo, o una proteína de unión a ADN que modula un SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B o SCN2B endógeno). En tales experimentos, la temperatura corporal central se monitorea con una sonda de temperatura rectal RET-3 (Physitemp Instruments, Inc, Nueva Jersey, EE. UU.) y se controla mediante una lámpara de calor conectada a un regulador de temperatura de roedores (TCAT-2DF, Physitemp Instruments, Inc.) reconfigurado con un controlador Partlow 1160 + (West Control Solutions, Brighton, Reino Unido). La temperatura corporal se eleva 0,5 °C cada dos minutos hasta el inicio de la primera convulsión clónica. En comparación con los ratones Dravet no tratados, se espera que los ratones Dravet tratados con una terapia génica de AAV tengan un umbral de temperatura más alto antes del inicio de la primera convulsión clónica y/o tengan una mayor proporción de ratones que permanecen libres de convulsiones a la temperatura máxima probada.

[0218] También se pueden administrar a ratones diferentes dosis de AAV que comprenden un casete de expresión para determinar el perfil de seguridad y eficacia de cada tratamiento de terapia génica. Estos estudios preclínicos también pueden informar la dosis óptima de terapia génica que se utilizará para tratar el síndrome de Dravet.

5 **EJEMPLO 7**

Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en ratón

[0219] Se pueden usar ratones hembra APP/PS1 y de tipo salvaje (WT), que se crían en PSYCHOGENICS® y son 10 modelos de ratón establecidos de la enfermedad de Alzheimer, para estudiar la seguridad y eficacia de las composiciones descritas en el presente documento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que comprenden uno o más ER selectivos para PV. Los ratones APP/PS1 se describen anteriormente en el Ejemplo 4.

[0220] A ratones APP/PS1 y controles no transgénicos se les inyecta un vector de AAV de control que expresa eGFP o 15 un vector de AAV de tratamiento que comprende uno o más ER selectivos de PV descritos en el presente documento, por ejemplo, SEQ ID NO: 1-32, unidos operativamente a un transgén que es deficiente o está deteriorado en la enfermedad de Alzheimer, tal como SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, STXBP1, una proteína de unión al ADN que modula un gen endógeno (por ejemplo, SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3 o STXBP1), o cualquiera de las SEQ ID NO: 37-43, o un fragmento funcional del mismo.

[0221] Despues de las inyecciones de AAV, la supervivencia del ratón se controla a lo largo del tiempo. Se controló 20 diariamente la salud general de todos los ratones (por ejemplo, peso, hidratación, aseo y movilidad) y se registraron las muertes. Despues de las inyecciones de los AAV, a los ratones también se les implanta un transmisor EET como se describe en el Ejemplo 3 anterior. La actividad cerebral se puede registrar y monitorear durante 24 horas durante al menos 25 4 semanas despues de la cirugía. Los datos del electrocorticograma se pueden analizar automáticamente y los niveles de potencia en las diferentes bandas de frecuencia (50-100 Hz) se pueden comparar en diferentes grupos: ratones WT, ratones APP/PS1 no tratados y ratones APP/PS1 tratados con AAV, cada uno de ellos tratado con una terapia génica de AAV como se describió anteriormente. El aumento de la actividad de alto poder gamma se asocia con convulsiones en pacientes con Alzheimer y epilepsia. Por lo tanto, se espera que los ratones APP/PS1 no tratados muestren un mayor 30 nivel de actividad de alto poder gamma que los ratones de control, mientras que se espera que este aumento esté ausente o se reduzca en los ratones tratados, lo que indica un tratamiento eficaz con una terapia génica de AAV.

[0222] Despues del tratamiento de los ratones con AAV, los niveles de expresión del transgén se pueden controlar a lo 35 largo del tiempo usando diversos métodos de PCR y/o secuenciación para mostrar que el tratamiento con AAV puede dar como resultado un aumento en la expresión endógena del transgén. El análisis de transferencia Northern y la hibridación in situ también se pueden utilizar para analizar la expresión génica in vivo. El nivel de la proteína expresada a partir del transgén también se puede controlar despues del tratamiento para mostrar que un aumento en la expresión genética se correlaciona con un aumento en los niveles de proteína. El nivel de proteína se puede analizar utilizando diversos métodos, incluidos, entre otros, análisis de transferencia Western, inmunohistoquímica y/o ensayos ELISA. La formación de canales 40 iónicos de sodio o potasio funcionales dependientes de voltaje también se puede analizar mediante análisis de pinza de corriente.

[0223] También se pueden administrar a ratones diferentes dosis de AAV que comprenden un casete de expresión para 45 determinar el perfil de seguridad y eficacia de cada tratamiento de terapia génica. Estos estudios preclínicos también pueden informar sobre las dosis óptimas de la terapia génica que se utilizarán para tratar la enfermedad de Alzheimer.

REIVINDICACIONES

1. Un casete de ácido nucleico que comprende
 - 5 un elemento regulador selectivo de neuronas de parvalbúmina (PV) unido operativamente a un transgén, en el que el elemento regulador selectivo de neuronas de PV comprende una secuencia con al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 30, y en el que el elemento regulador selectivo de neuronas PV da como resultado la expresión selectiva del transgén en las neuronas PV del sistema nervioso central (SNC) sobre una o más células del SNC que no son neuronas PV.
 - 10
2. El casete de ácido nucleico según la reivindicación 1, en el que el elemento regulador selectivo de neuronas PV comprende SEQ ID NO: 30.
- 15 3. El casete de ácido nucleico según la reivindicación 1 o 2, en el que el elemento regulador selectivo de neuronas PV tiene menos de 1,5 kb.
4. El casete de ácido nucleico según la reivindicación 1 o 2, en el que el elemento regulador selectivo de neuronas PV comprende además una secuencia con al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1.
- 20 5. El casete de ácido nucleico según la reivindicación 4, en el que el elemento regulador selectivo de neuronas PV comprende la SEQ ID NO: 31 o una secuencia con al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 31.
- 25 6. El casete de ácido nucleico según la reivindicación 4 o 5, en el que el elemento regulador selectivo de la neurona PV tiene menos de 2,5 kb.
- 30 7. El casete de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el elemento regulador selectivo de neuronas PV da como resultado una expresión selectiva del transgén en neuronas PV que es mayor que la expresión del mismo transgén cuando está unido operativamente a un elemento regulador no selectivo, medido mediante un ensayo de colocalización.
8. El casete de ácido nucleico según la reivindicación 7, en el que:
 - 35 (i) el elemento regulador no selectivo es un promotor constitutivo;
 - (ii) el elemento regulador no selectivo es cualquiera de CAG, EF1α, SV40, CMV, UBC, PGK y CBA;
 - (iii) el elemento regulador selectivo de la neurona PV da como resultado la expresión selectiva del transgén en neuronas PV a un nivel que es al menos 2 veces, al menos 5 veces o al menos 10 veces mayor que la expresión del transgén en PV neuronas cuando están operativamente unidas al elemento regulador no selectivo, según se mide mediante el ensayo de colocalización;
 - 40 (iv) el elemento regulador selectivo de neuronas PV da como resultado una expresión selectiva del transgén en neuronas PV que es al menos 2 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % mayor que la expresión del transgén en neuronas PV cuando el transgén está operativamente unido al elemento regulador no selectivo;
 - 45 (v) el elemento regulador selectivo de la neurona PV da como resultado la expresión selectiva del transgén en neuronas PV de manera que el porcentaje de neuronas que expresan el transgén es aproximadamente 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 7,5 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces mayor que el porcentaje de neuronas PV en el SNC;
 - 50 (vi) el ensayo de colocalización es un ensayo inmunohistoquímico, opcionalmente en el que el ensayo inmunohistoquímico comprende un anticuerpo anti-PV.
9. El casete de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el transgén codifica una subunidad de canal iónico, un regulador de neurotransmisor, un dominio de unión al ADN o una proteína de edición de genes.
- 55 10. El casete de ácido nucleico según la reivindicación 9, en el que:
 - 60 (i) la subunidad del canal iónico es una subunidad alfa de un canal iónico de sodio, una subunidad beta de un canal iónico de sodio o una subunidad de un canal iónico de potasio;
 - (ii) el transgén es un regulador de neurotransmisor que comprende STXBP1;
 - (iii) el transgén comprende una proteína de unión al ADN que modula la expresión de un gen endógeno; o
 - (iv) el transgén comprende una proteína de edición de genes, opcionalmente en donde la proteína de edición de genes es una proteína Cas.
- 65 11. El casete de ácido nucleico según la reivindicación 10(i), en el que:

- (i) el transgén comprende cualquiera de las SEQ ID NOS: 37-43; o
- (ii) el transgén comprende SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1 o KV3.3.

5 12. El casete de ácido nucleico según la reivindicación 10(iii), en el que:

- (i) la proteína de unión al ADN es un activador transcripcional que modula un gen SCN1A endógeno; o
- (ii) el gen endógeno es SCN1A, SCN2A, SCN8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3 o STXBP1.

10 13. El casete de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una o más células del SNC que no son neuronas PV comprenden una o más neuronas excitadoras, neuronas dopaminérgicas, astrocitos, microglía y neuronas motoras.

15 14. El casete de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el casete de ácido nucleico es una construcción lineal o un vector, opcionalmente en el que el vector es un plásmido.

15. El casete de ácido nucleico según la reivindicación 14, en el que el casete de ácido nucleico es un vector viral, opcionalmente en el que el vector viral es un vector de virus adenoasociado (AAV) o un vector lentiviral.

20 16. El casete de ácido nucleico según la reivindicación 15, en el que el vector de AAV es AAV1, AAV8, AAV9, scAAV1, scAAV8 o scAAV9.

17. El casete de ácido nucleico según la reivindicación 16, en el que el vector de AAV es AAV9 o scAAV9.

25 18. El casete de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores para uso en un método de tratamiento de un trastorno o afección neurológica en un sujeto que lo necesita.

19. Un casete de ácido nucleico que comprende una secuencia con al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 30 unida operativamente a un transgén.

30 20. El casete de ácido nucleico de la reivindicación 19, que comprende además una secuencia con al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1.

FIG. 1

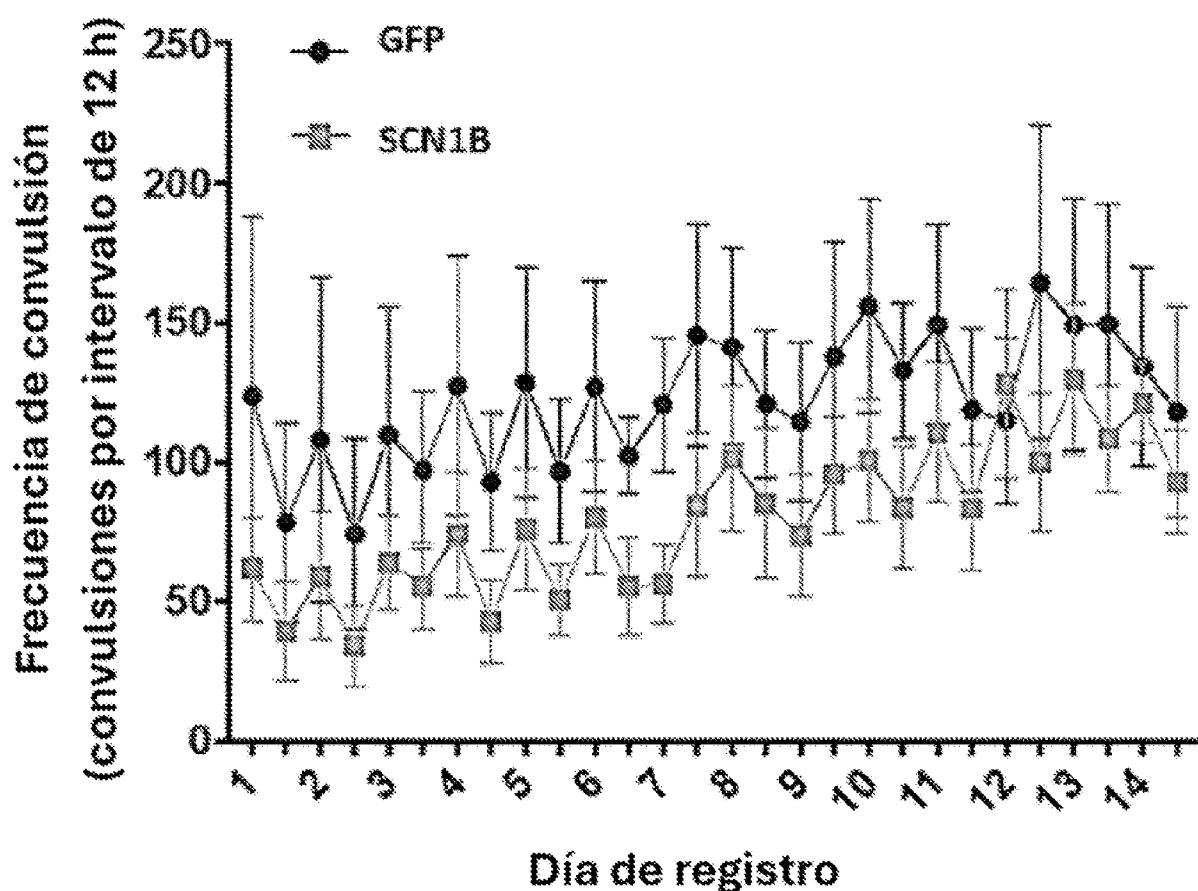


FIG. 2

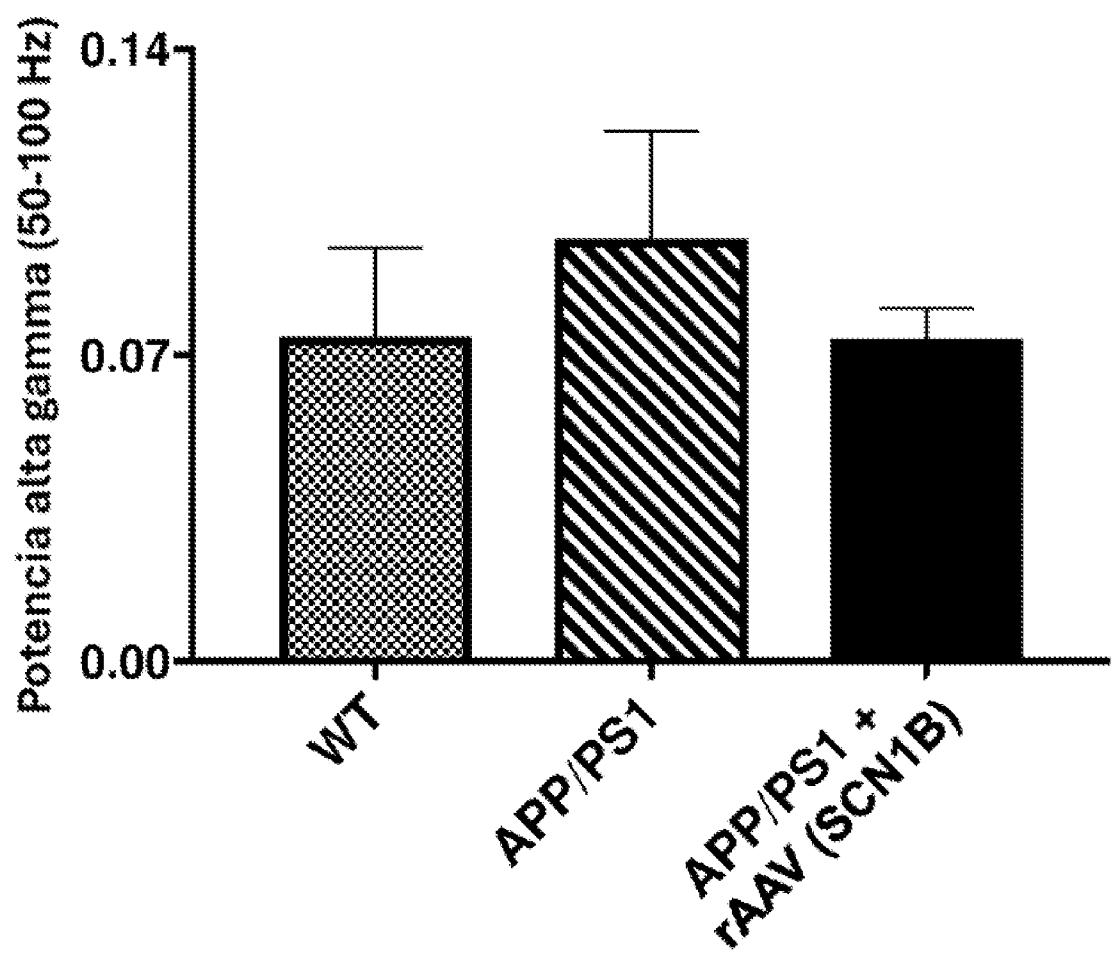


FIG. 3A

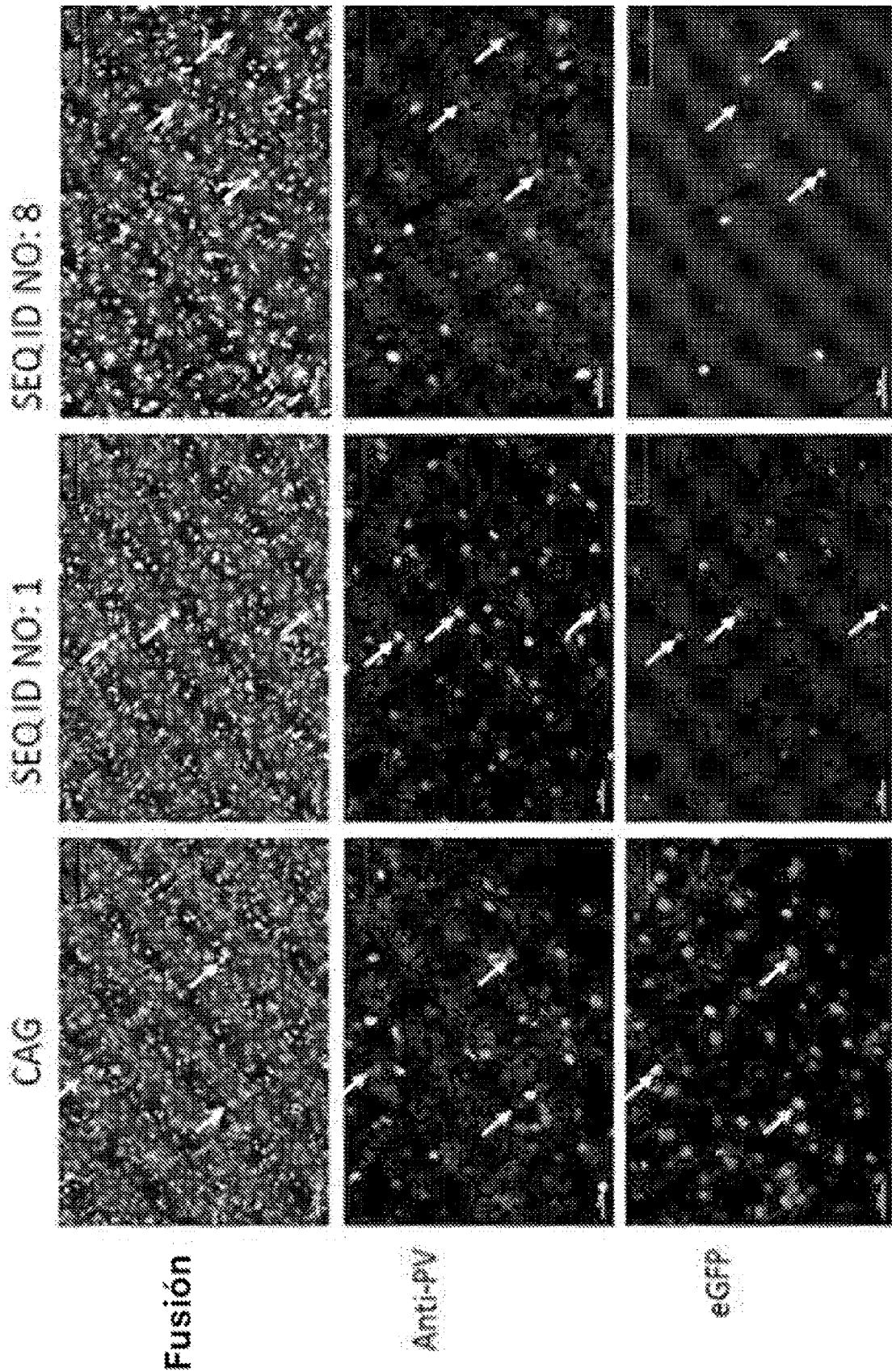


FIG. 3B

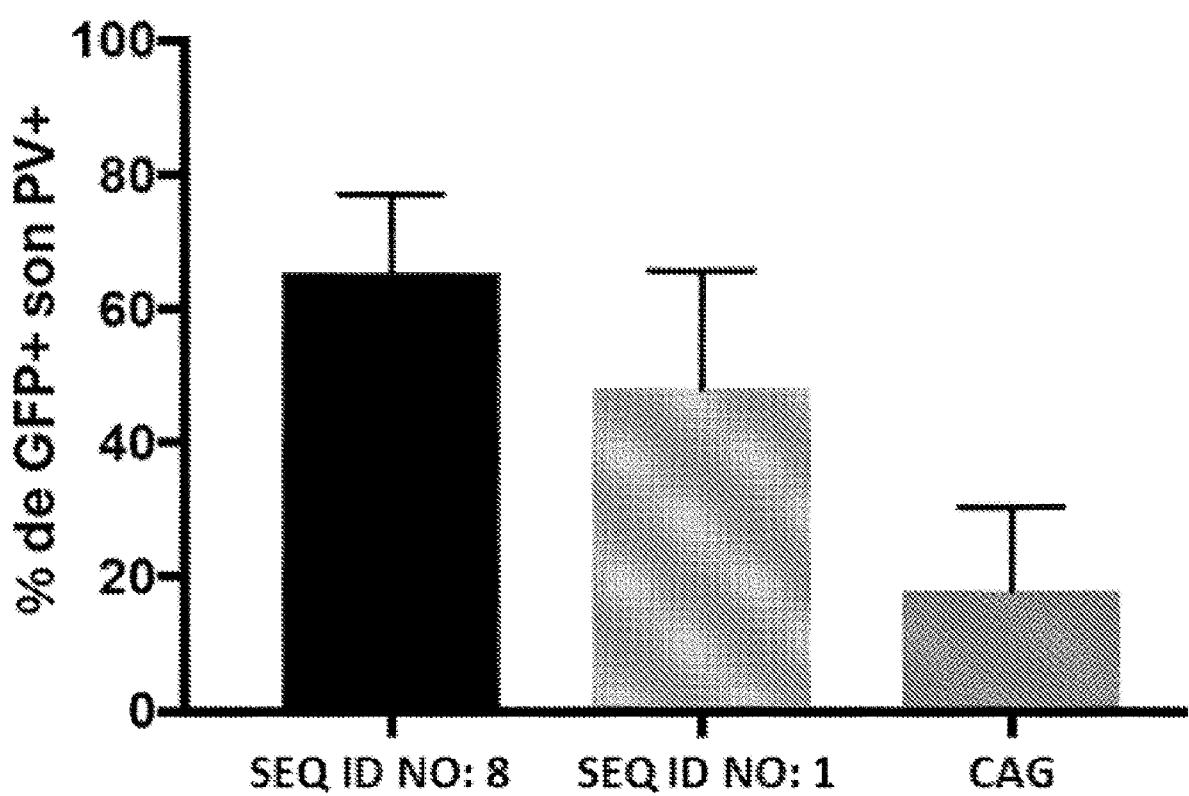


FIG. 4A

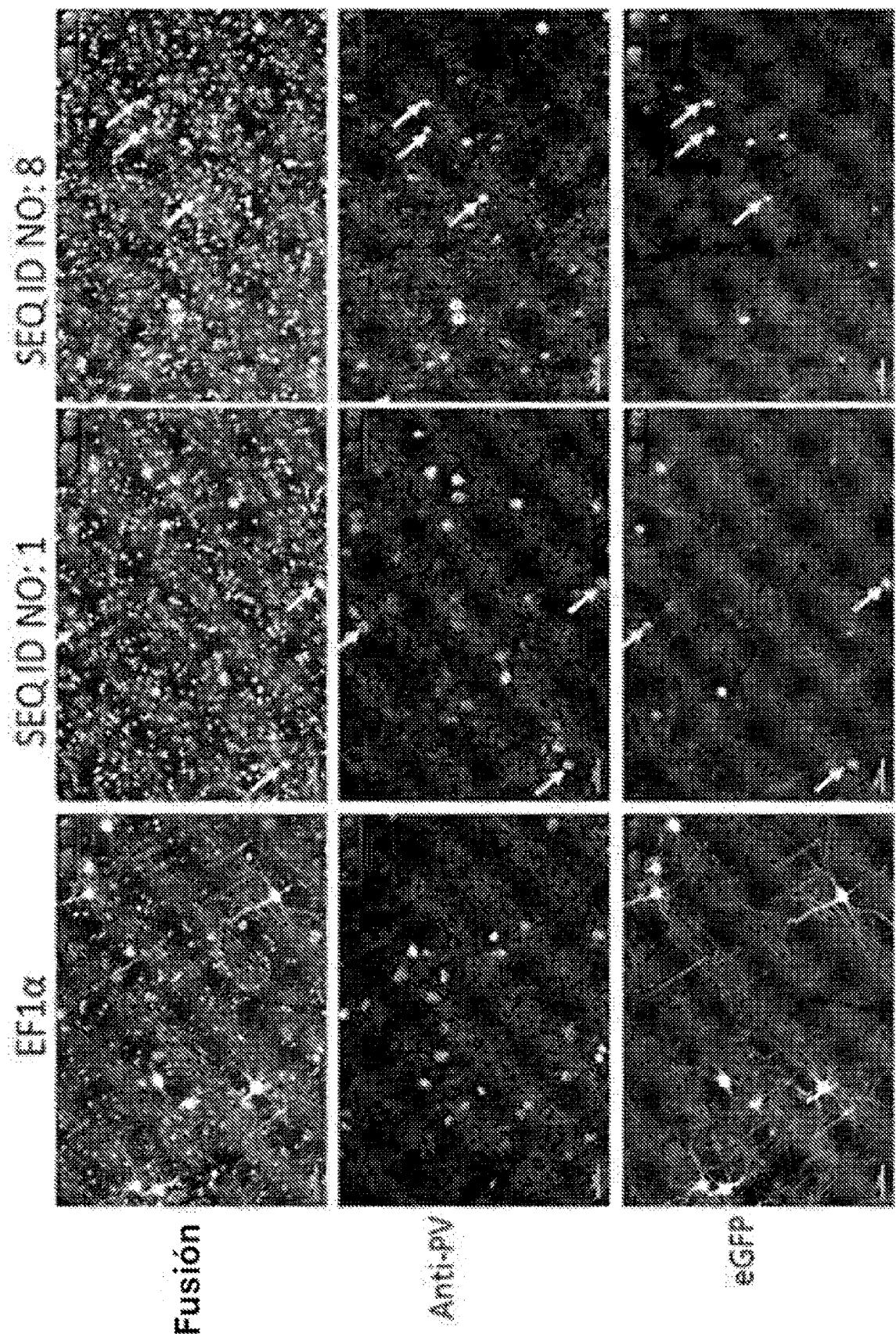


FIG. 4B

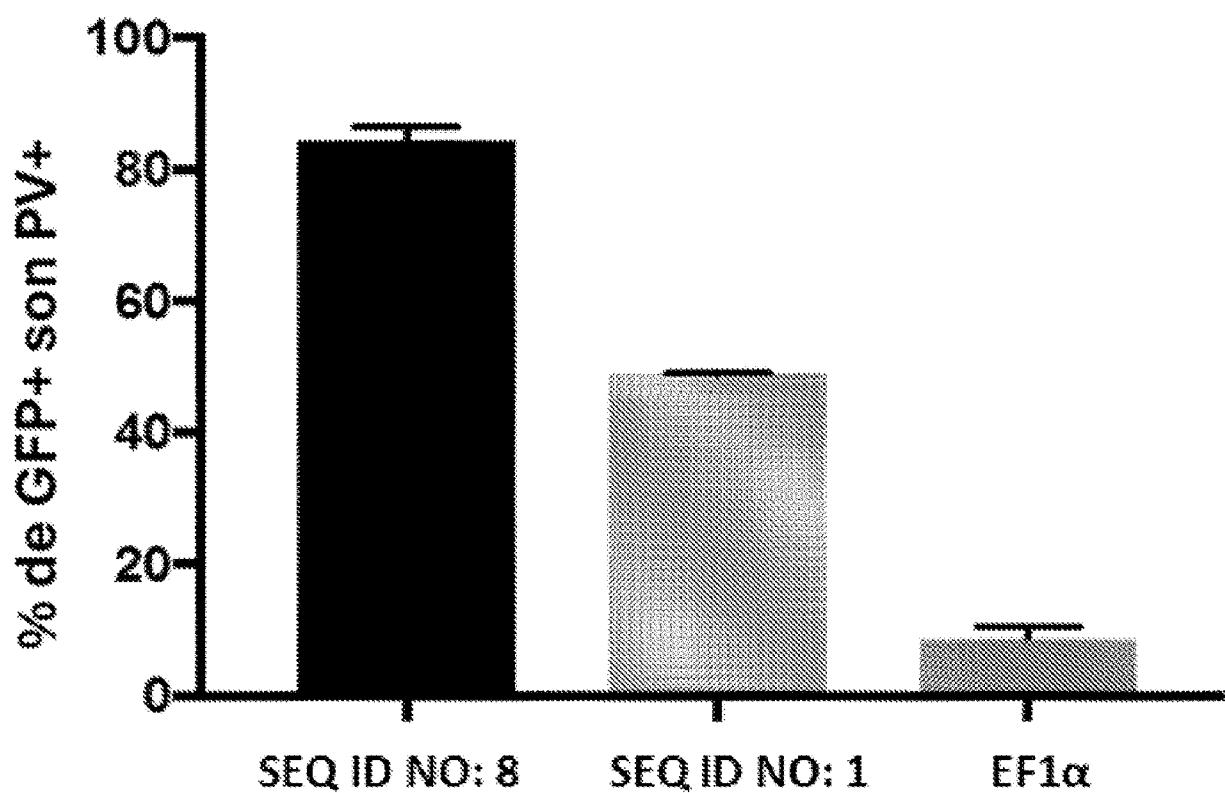


FIG. 5A

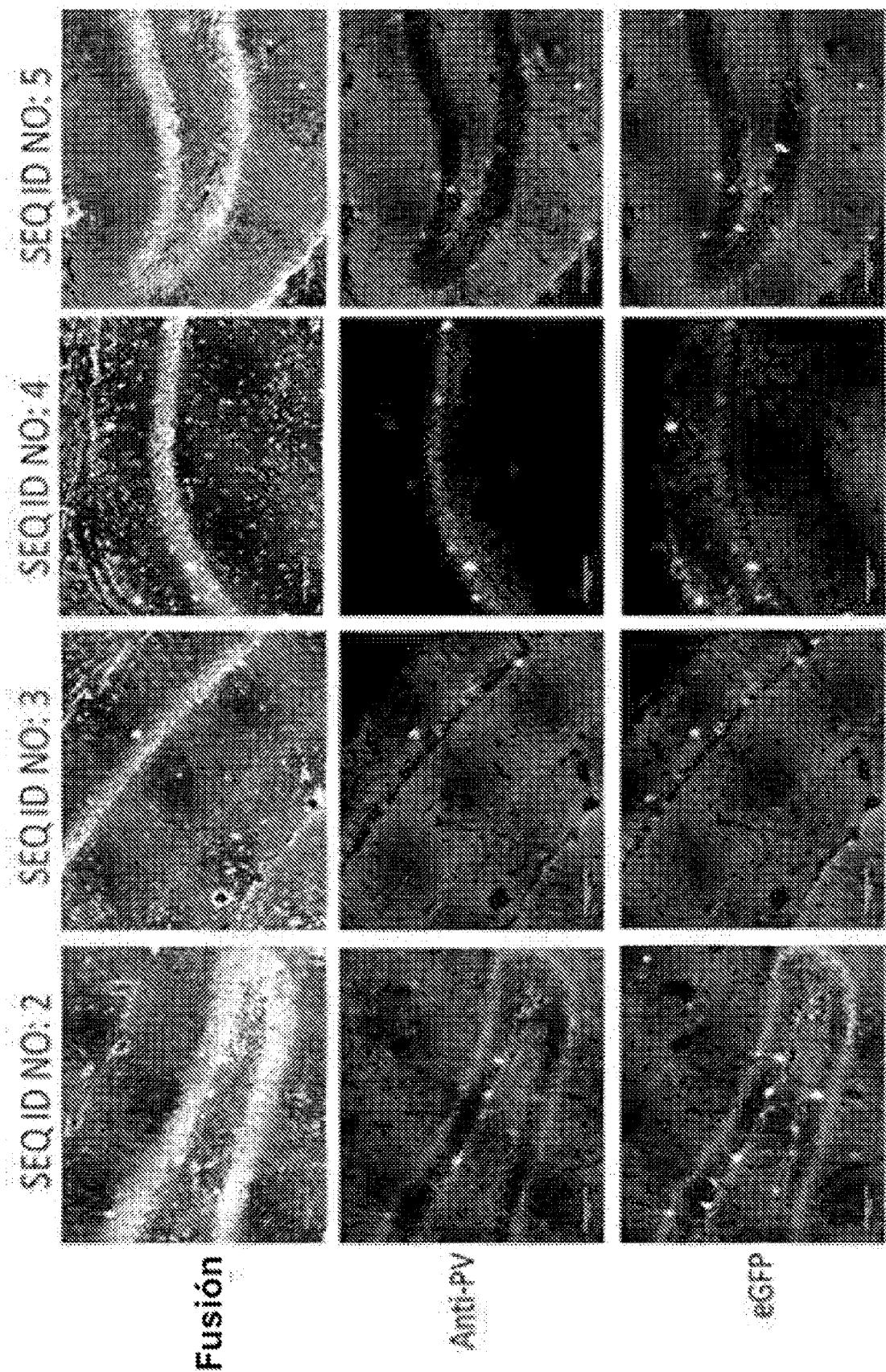


FIG. 5B

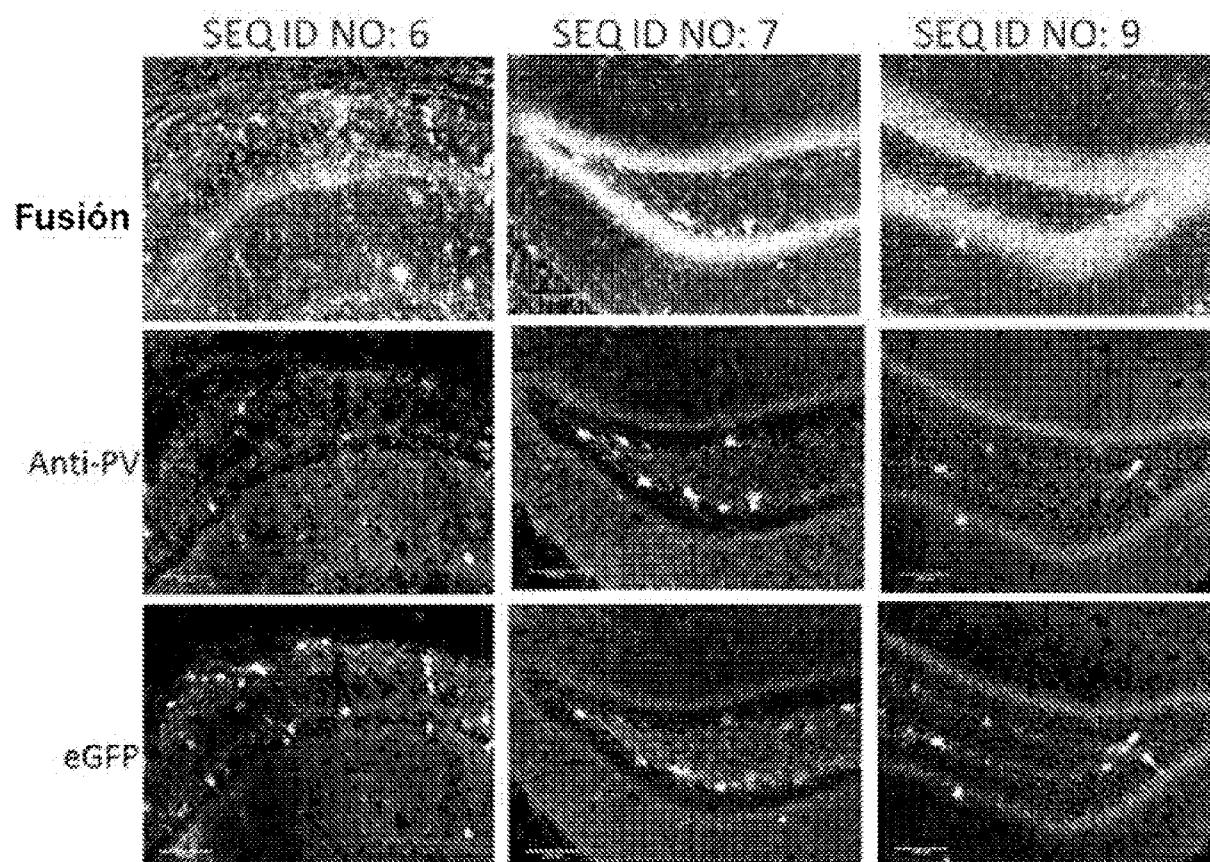


FIG. 5C

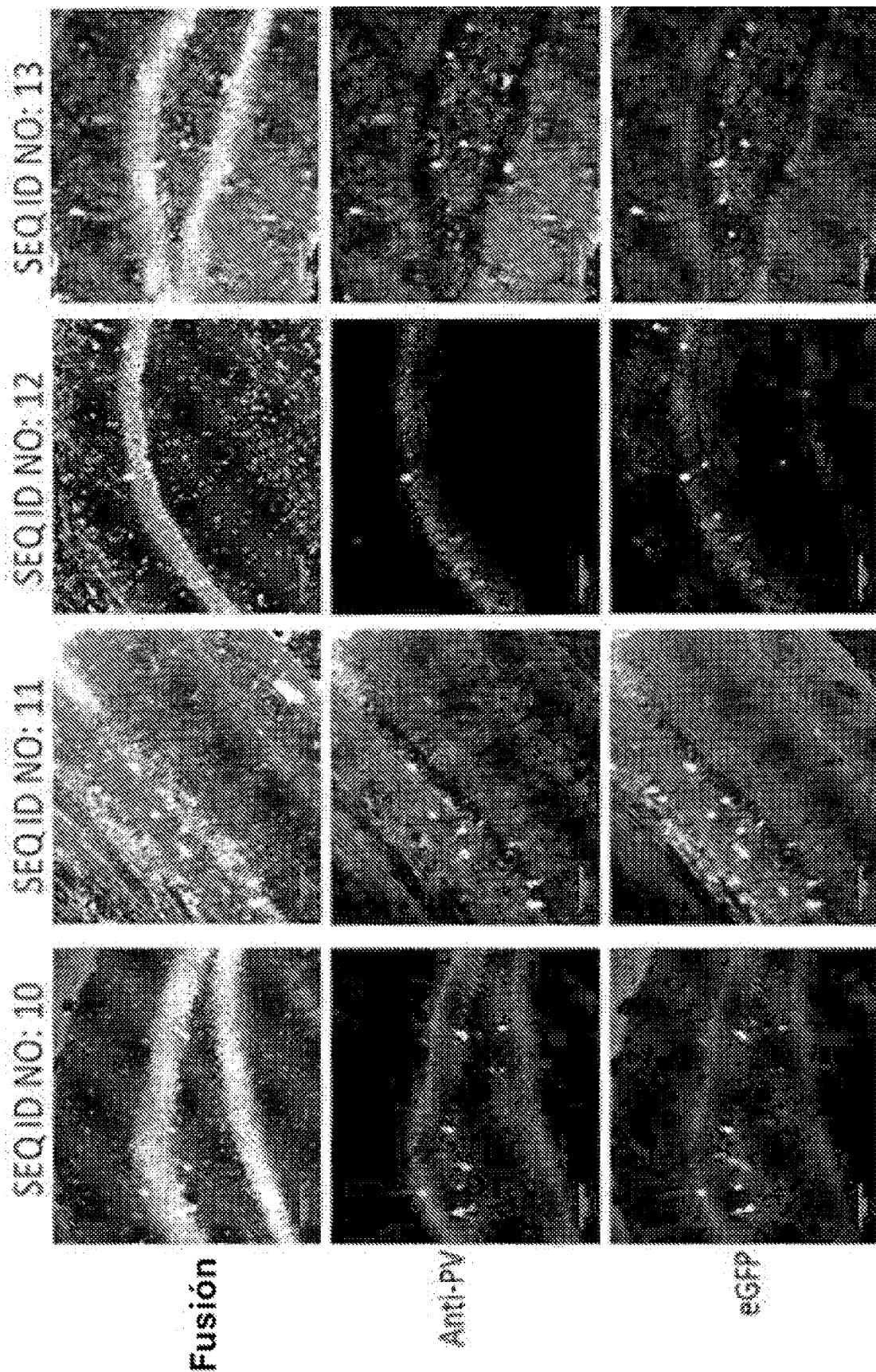


FIG. 5D

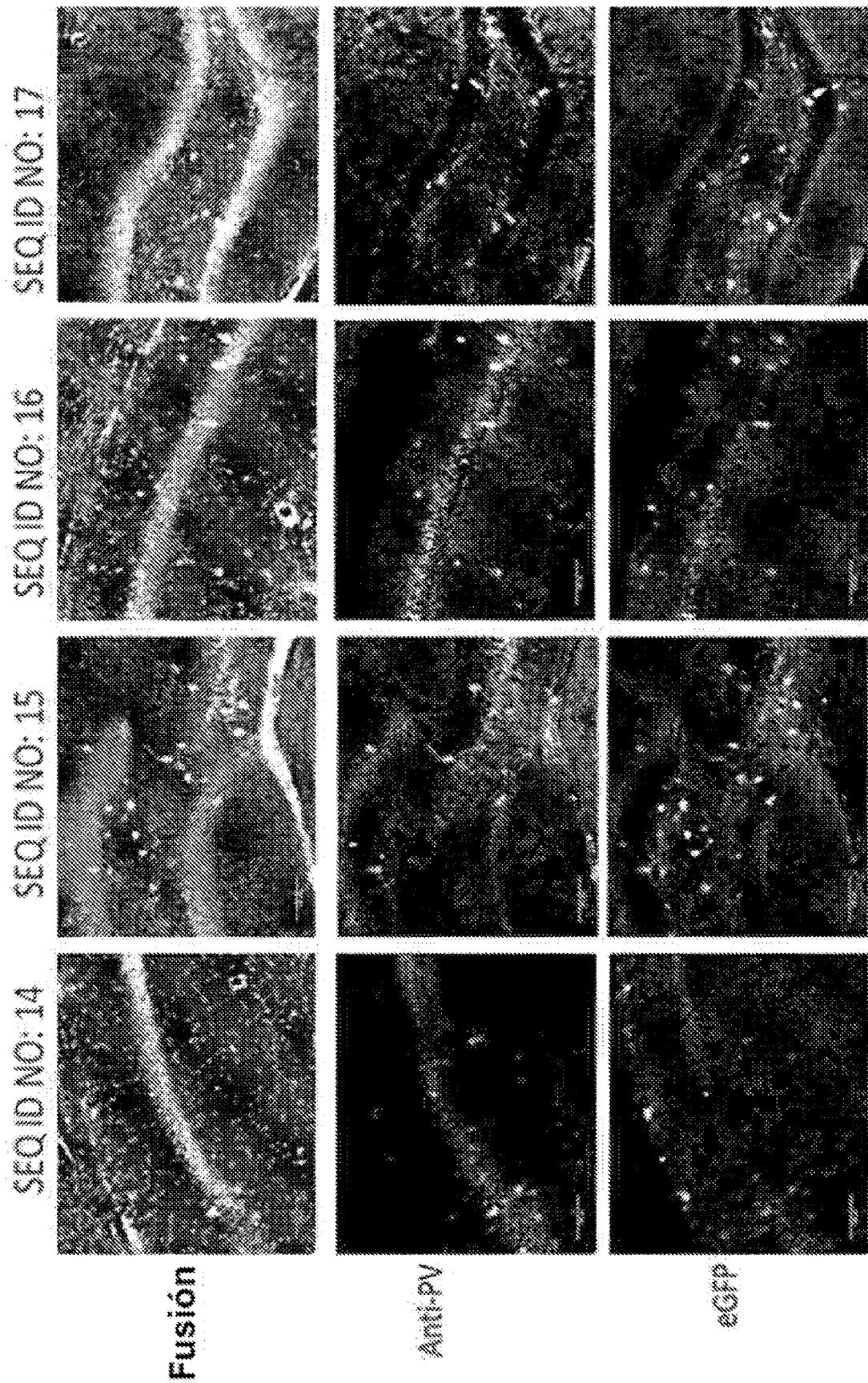


FIG. 5E

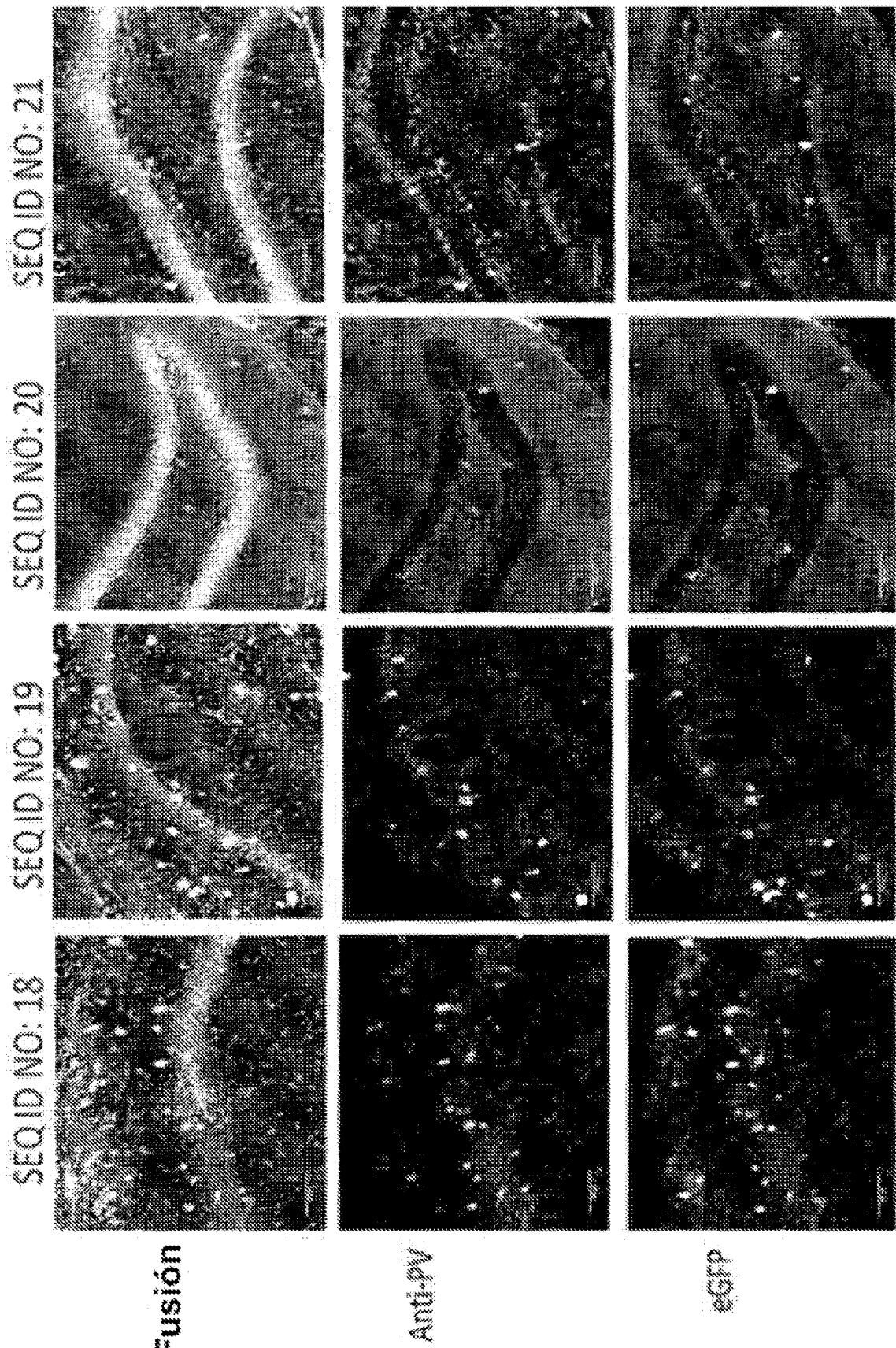


FIG. 5F

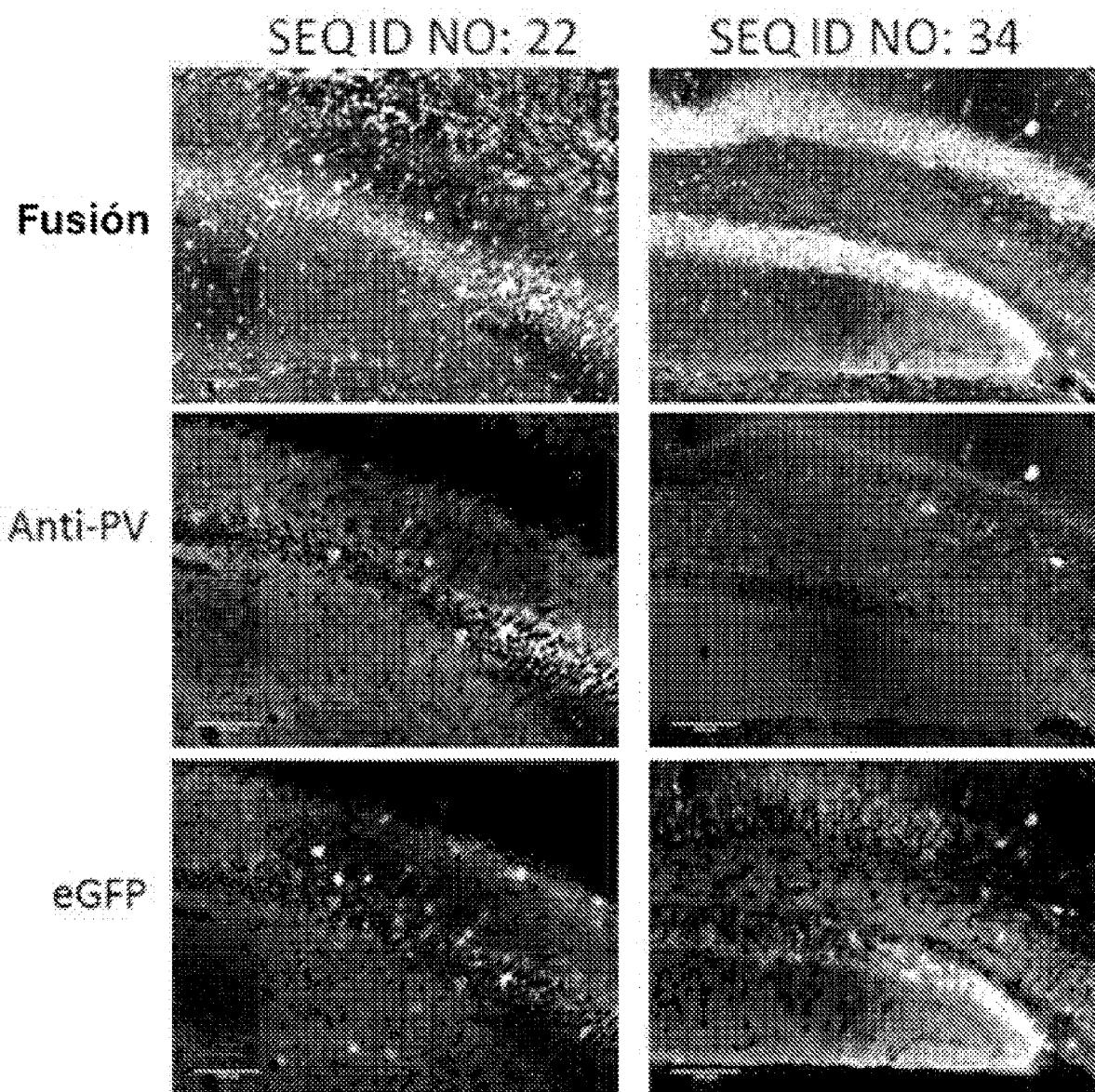


FIG. 6

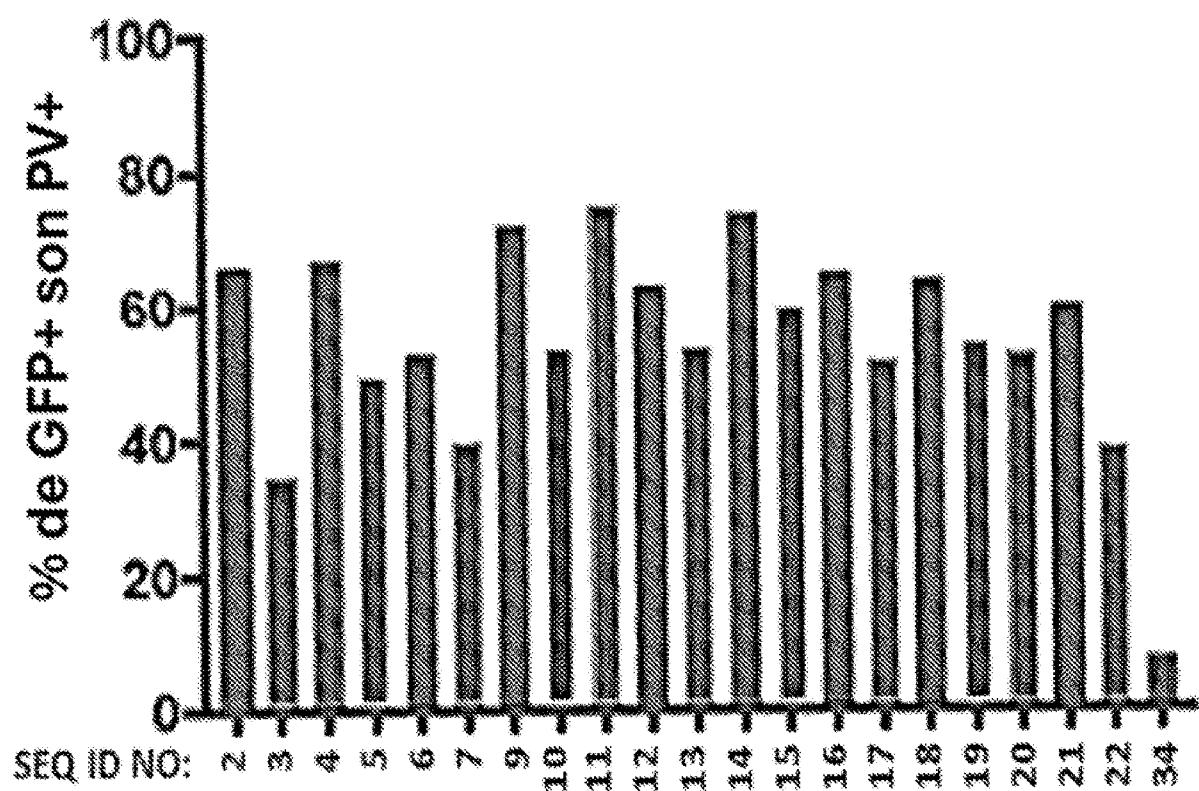


FIG. 7

