



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 362 195**

⑤1 Int. Cl.:
C07K 14/46 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **06724141 .4**

⑨6 Fecha de presentación : **07.04.2006**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **2010563**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.2009**

⑤4

Título: **Secuencia de MeCP2 sintética para la terapia de sustitución de proteínas.**

④5

Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.06.2011

④5

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.06.2011

⑦3

Titular/es: **Georg-August-Universität Göttingen
Stiftung Öffentlichen Rechts
Robert-Koch-Strasse 40
37075 Göttingen, DE**

⑦2

Inventor/es: **Laccone, Franco, Antonio**

⑦4

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

Secuencia de MeCP2 sintética para la terapia de sustitución de proteínas

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con la proteína MeCP2 y su uso en terapia de la sustitución de la proteína, según se define en las reivindicaciones. Más específicamente, las secuencias del ácido nucleico optimizadas del codón para la expresión de las proteínas MeCP2, los métodos para fabricar dicha secuencia del ácido nucleico y que expresa dicha proteína, las fusiones de una proteína de la invención con un dominio de transducción, y los vectores y las células huésped que comprenden una proteína de la invención se describen. Se describen otros usos de los ácidos nucleicos o las proteínas de la invención en la medicina, las composiciones farmacéuticas que comprenden las secuencias del ácido nucleico y las proteínas de la invención, también como los métodos para el tratamiento, prevención, y/o terapia de enfermedades neurodegenerativas o del desarrollo neurológico, incluyendo el síndrome de Rett.

Antecedentes de la invención

El síndrome de Rett (RTT), es un trastorno progresivo del desarrollo neurológico. Este afecta casi exclusivamente a las mujeres (Rett, 1966, Wien Med Wochenschr .116:723-6) y es una de las causas más comunes de retraso mental en las mujeres. RTT se caracteriza por un curso clínico de forma dinámica con cuatro etapas consecutivas. Durante la Etapa I (edad 6-18 meses), las chicas dejan de adquirir nuevas habilidades; mostrando una desaceleración del crecimiento de la cabeza y rasgos autistas tales como retraimiento emocional y contacto visual disminuido. En la Etapa II (edad 1-4 años), los niños afectados pierden las habilidades aprendidas tales como el habla y el uso de la mano intencional. Desarrollan patrones de respiración irregulares, ataxia/apraxia del modo de andar y del tronco, y movimientos de la mano en forma estereotípica. Aproximadamente la mitad de las chicas también desarrollan convulsiones y existe alguna estabilización de la enfermedad durante la Etapa III (edad 4-7 años). Las convulsiones se hacen menos frecuentes durante la Etapa IV (edad 5-15 años y mayores), pero el deterioro motor continúa. La hipoactividad, especialmente entre aquellos que no caminan, contribuye al desarrollo frecuente de escoliosis, que pueden causar que las chicas se confinen a las sillas de ruedas. Las características neuropatológicas de los pacientes con Rett, incluyen una disminución en el espesor cortical también una reducción del tamaño neuronal cortical. Una fuerte reducción de la arborización dendrítica también ha sido descrita, pero ninguna de las características morfológicas gruesas se afectan (Armstrong, 2002, Ment Retard Dev Disabil Res Rev 8:72-6). RTT es una enfermedad ligada a X con una incidencia estimada de 1:10,000 a 1:15,000. Amir et al. (1999) (Nat Genet 23:185-8), han identificado mutaciones en el gen MECP2 como la causa de RTT. El gen MECP2 se somete a la inactivación de X. Por consiguiente, los heterocigotos hembras mutantes son mosaicos para la deficiencia de MeCP2 y este es más probablemente uno de los factores que modulan la influencia del fenotipo de la enfermedad. Los hombres que cumplen el criterio clínico para el síndrome de Rett han sido identificados en asociación con un cariotipo 47, XXY y a partir de mutaciones postcigóticas de MECP2 que dan lugar a mosaicismo somático. Para referencia, ver L. S. Weaving et al.: Journal of Medical Genetics 2005; 42:1-7; and G. Miltenberger- Miltenyi, F. Laccone: Human Mutation 2003 Volume 22, Issue 2; 107-115.

El gen MECP2 se localiza en brazo largo del cromosoma X, en la posición Xq28 (Adler 1995, Mamm Genome 6(8):491-2). El gen abarca 76 kb y se compone de cuatro exones. El gen MECP2 codifica para una proteína llamada proteína 2 de enlace metil-CpG (MeCP2), que se cree que juega un papel esencial en el silenciamiento de otros genes. La proteína MeCP2 tiene dos isoformas, MeCP2 e1 y MeCP2 e2, antes llamadas MeCP2B y MeCP2A, respectivamente (Mnatzakanian et al. 2004, Nat Genet 36:339-41). La isoforma e1 está compuesta de 498 aminoácidos y la isoforma e2 tiene 486 aminoácidos de largo. La isoforma e1 tiene un péptido distintivo de 21-aminoácidos en el terminal N, incluyendo tractos polialanina y poliglicina. El ARNm de la variante MECP2 e1 tiene una expresión 10-veces mayor en el cerebro que aquella de la MECP2 e2 y es la isoforma de proteína más abundante en cerebro de ratón y humano. MeCP2 es una proteína de mamífero abundante, que une selectivamente los residuos 5-metil citosina en dinucleótidos posicionados simétricamente. Los dinucleótidos CpG se localizan preferencialmente en las regiones promotoras de los genes. Representan uno de los elementos para la regulación de los genes que se dirigen de los factores de silenciamiento transcripcional después de la metilación de ADN.

No se conoce aún un tratamiento exitoso para mejorar los resultados neurológicos de individuos con síndrome de Rett. De acuerdo con el espectro mutacional del MECP2 en humanos (Lam et al. 2000, J Med Genet 37(12):E41; Lee et al. 2001, Brain Dev 23:S138-43) y los resultados a partir de ratón con RTT, existe un acuerdo general que el síndrome RTT se causa por una pérdida de la función de MeCP2. Una estrategia eficiente que tiene como objetivo almacenar la actividad de MeCP2 debería ser capaz de compensar la pérdida de la función de MeCP2 en células neuronales deficientes. Para referencia, ver L. S. Weaving et al.: Journal of Medical Genetics 2005; 42:1-7; and G. Miltenberger-Miltenyi, F. Laccone: Human Mutation 2003, Volume 22, Issue 2; 107 - 115.

Schwarze et al. (1999, Science 285:1569-1572) reportan que es posible entregar macromoléculas biológicamente activas en las células vivas utilizando un dominio de TAT (proteína transcripcional transactivadora del virus-1 de inmunodeficiencia humana). Muestran la producción de una proteína TAT-®-galactosidasa recombinante y su

inyección vía intraperitoneal en ratones. Encontraron que la proteína de fusión fue distribuida a todos los tejidos incluyendo el cerebro y la proteína de fusión fue biológicamente activa.

WO 00/62067 (Dowdy et al.) reporta el uso de moléculas de proteína transducción (PTD), incluyendo los dominios de la proteína TAT para dirigir las moléculas terapéuticas en el sistema nervioso.

- 5 Kosai et al. (Molecular Therapy, Academic Press, San Diego, CA, US, vol. 11, page 24 (August 15, 2008)) revela que RTT es reversible y tratable con terapia génica de MeCP2 en el estriado de ratones.

WO2005/078099 describe las variantes de corte y empalme y su uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tales como el síndrome de Rett. Las proteínas de fusión que comprenden estas variantes de corte y empalme también se contemplan en general, sin embargo, sin revelar o señalar en la presencia en dichas proteínas de fusión de los dominios de las proteínas de transducción.

- 10 La producción de proteínas en sistemas de expresión heteróloga (i.e. proteína humana en *Escherichia coli*) necesita un vector de expresión correspondiente y la secuencia de ADNc del gen de interés. Los 64 codones (tripletes de nucleótidos) del código genético codificados de 20 aminoácidos y de tres señales de parada de la traducción. El código genético por lo tanto es redundante y esto significa que algunos aminoácidos se codifican por más de un
- 15 codón. La metionina y el triptófano son los únicos aminoácidos codificados por un codón, ATG y TGG, respectivamente, mientras que la arginina, leucina y serina se codifican cada uno por seis codones sinónimos. Debido a que la degeneración del código genético, muchas secuencias alternativas del ácido nucleico codifican la misma proteína. Las frecuencias de los codones de uso varían entre los diferentes organismos. Estas predisposiciones pueden influenciar fuertemente la expresión de las proteínas heterólogas (Kane, 1995, Curr Opin Biotechnol 6(5):494-500). El codón de uso ha sido identificado como el único factor más importante en la expresión de genes procariotas (Lithwick, 2003, Genome Res 13 (12):2665-2673).

Por lo tanto, un objetivo de los actuales inventores es proporcionar construcciones codificantes de proteínas MeCP2 biológicamente activas, que son capaces de entrar en las células del sistema nervioso y compensar de la pérdida de función de MeCP2 de células neuronales afectadas.

- 25 Un enfoque terapéutico mediante la entrega de proteínas recombinantes TAT en el cerebro podría tener la tremenda ventaja de una posible traducción rápida a partir del modelo en animales con pacientes. Otras ventajas pueden ser su aplicación de dosificación fácilmente controlable, la eficacia de entrega muy alta, ninguna preocupación inherente con la potencialmente mutagénesis por inserción o los efectos secundarios clínicos debido a la reacción inmunológica contra las proteínas virales como en el caso de una metodología de terapia génica. La metodología de
- 30 entrega de la proteína PTD y su posterior desarrollo puede permitir el tratamiento de enfermedades neurogenéticas y devastadoras como el síndrome de Rett.

- Dado que los intentos para expresar construcciones de la proteína MeCP2 utilizando la secuencia de ADNc humano en cantidades suficientes para propósitos terapéuticos hasta ahora sin éxito, otro objetivo de la presente invención es proporcionar una expresión de la construcción de MeCP2 que permite un aumento de la producción de proteína MeCP2 recombinante.

RESUMEN DE LA INVENCION

- Conforme, una molécula de ácido nucleico que comprende una primera secuencia del ácido nucleico que codifica una proteína MeCP2 o fragmento biológicamente activo o un derivado de dicha proteína o fragmento, se revela. Adicionalmente, la invención se relaciona con un polipéptido según se define en las reivindicaciones. Además, un
- 40 método de preparación de una secuencia del ácido nucleico así como un método para producir un polipéptido se revela. Además, una composición farmacéutica que comprende la molécula de ácido nucleico y/o un polipéptido se revela. La invención también se relaciona con un uso de los polipéptidos en tratamientos médicos, como se especifica en las reivindicaciones.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

- 45 La presente invención logra el objetivo buscado por mucho tiempo de proporcionar los medios y formas para proporcionar las proteínas MeCP2 recombinantes que pueden ser utilizadas en terapia de enfermedades neurodegenerativas y del desarrollo neurológico. Los inventores encontraron que a través del diseño y la creación de secuencias optimizadas del ácido nucleico de MeCP2, es por primera vez posible proporcionar las proteínas MeCP2 así como los fragmentos o derivados de tales proteínas o fragmentos que pueden ser utilizados para los métodos de
- 50 terapia de la sustitución de la proteína en mamíferos.

En un primer aspecto, una molécula de ácido nucleico que comprende una primera secuencia del ácido nucleico que codifica una proteína MeCP2 o fragmento biológicamente activo o un derivado de la proteína o del fragmento, en donde la secuencia del ácido nucleico es optimizada del condón para la expresión en una célula heteróloga se revela.

Una "proteína MeCP2", como se utiliza en este documento, puede ser la isoforma e1 humana (alias isoforma B) que tiene el número de acceso AAS55455 o isoforma e2 humana (alias isoforma A), que tiene el número de acceso NP_004983 (base de datos de la secuencia de la proteína NCBI), respectivamente. Un experto entenderá que otras isoformas humanas de MeCP2 o proteínas MeCP2 que se originan a partir de otros vertebrados también serán apropiadas como proteínas MeCP2 de la presente invención, si estas proteínas o fragmentos de esta muestran actividad biológica similar como las isoformas de MeCP2 humana conocidas. El experto puede fácilmente obtener las secuencias de las isoformas mencionadas anteriormente y sus correspondientes ARNm a partir de las bases de datos a disposición del público.

El término "fragmento biológicamente activo", como se utiliza en este documento, se refiere a un polipéptido de al menos 150 o al menos 200 aminoácidos de una proteína MeCP2. Un fragmento de una proteína MeCP2 contiene menos aminoácidos que cualquiera de las proteínas MeCP2 de longitud completa que pueden ser encontrados bajo el número de acceso AAS55455 o el número de acceso NP_004983, respectivamente. Un fragmento biológicamente activo aún muestra la actividad biológica de la proteína que ocurre naturalmente a partir de la cual se deriva, aunque no necesariamente al mismo grado.

Un "derivado" de una proteína MeCP2 es un polipéptido que no se codifica como tal por el genoma de una especie que ocurre naturalmente. En particular, un derivado es un polipéptido que no es idéntico a uno de aquellos polipéptidos que tienen los números de acceso de cualquiera de las isoformas de MeCP2 mencionadas anteriormente. Un derivado, por lo tanto, contiene una modificación de las proteínas MeCP2 que ocurren naturalmente, por ejemplo por sustitución, delección y adición de aminoácidos, pero aún muestra la actividad biológica de la proteína que ocurre naturalmente, aunque no necesariamente al mismo grado. Un derivado incluye moléculas que comprenden regiones que son homólogas a una proteína MeCP2 por lo menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % de identidad sobre una secuencia de aminoácido de tamaño idéntico, cuando las dos secuencias que se comparan se alinean mediante un programa de ordenador de homología conocido en el oficio tal como, por ejemplo el programa "BLAST" que es accesible al público bajo <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Un fragmento de un derivado de una proteína MeCP2 contiene menos aminoácidos que un derivado de una proteína MeCP2 según se define anteriormente.

Un fragmento "biológicamente activo" o un derivado de una proteína o fragmento "biológicamente activo" significa que el fragmento o derivado tiene al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 100% de la actividad biológica de una proteína MeCP2 según se define anteriormente. Si una proteína MeCP2 o fragmento o derivado biológicamente activo, se puede determinar por ejemplo mediante las siguientes pruebas:

1) Una proteína MeCP2 o fragmento o derivado se considera que es biológicamente activo, si es capaz de unirse a citosinas metiladas, y/o de inducir un reclutamiento directo de HDACs y/o de cambiar el estado de acetilación de la histona H3 y la histona H4. Una prueba general incluye el cultivo de fibroblastos de ratones *Mecp2^{Y/-}* (disponibles de Jackson Laboratory bajo B6.129P2(C)-*Mecp2^{tm1.1Ebrd/J}*) y ratones del tipo salvaje a partir de puntas de cola/extremidades traseras, por ejemplo establecida de acuerdo con el protocolo descrito en 3.1 de la sección experimental a continuación. Por lo general, los medios serán cambiados y luego las células se incuban durante una semana a 37° C con 10% de CO₂. Para probar la actividad biológica, por ejemplo mediante el monitoreo del estado de acetilación de la histona H3 y la histona H4, fibroblastos de ratón de animales *Mecp2^{Y/-}* se prueban con, por ejemplo, 300 pmol de una proteína MeCP2 o un fragmento o un derivado de una proteína MeCP2 o fragmento fusionado con un dominio de transducción tal como el dominio de TAT u otros dominios de transducción como se describe a continuación, y se incuban por ejemplo durante 30 h. Los lisados de células luego se pueden inmunotransferir con anticuerpos contra por ejemplo la histona H3, histona H3 acetilada, o H4K16 acetilada, como se describe a continuación. La diferencia del estado de acetilación entre fibroblastos tratados y sin tratar se cuantifica mediante un análisis densitométrico como se indica por ejemplo en la Fig. 5C, y de esta manera, un experto será capaz de determinar un cambio en el estado de acetilación de la histona. Los Ejemplos 5, 6 y 8.1 en combinación con la Figura 3 C-D y la Figura 5 a continuación, muestran una forma de realizar y evaluar tales ensayos.

2) Otra posibilidad para probar la actividad biológica de una proteína MeCP2 o fragmento o un derivado de una proteína MeCP2 o fragmento es una medida del nivel de acetilación de H3 inducido mediante experimentos de transducción dirigidos con las proteínas que se probaran fusionadas con los dominios de la proteína de transducción como se describe a continuación. Las líneas celulares disponibles comúnmente tales como HeLa o NIH3T3 pueden ser utilizadas para este propósito. Cuando se ponen en contacto las células con las proteínas de fusión, el nivel de acetilación de la histona H3, disminuirá cuando se compara con una línea celular control que tiene un nivel normal de acetilación de la histona H3. Es posible utilizar esta disminución para cuantificar la actividad biológica de la proteína producida. La evaluación de esta prueba por ejemplo mediante métodos de Western blot, se describe en la sección experimental a continuación.

3) las proteínas MeCP2 o fragmentos o derivados de tales proteínas se pueden determinar por ser biológicamente activas, mediante su capacidad para unirse a las citosinas metiladas, por ejemplo mediante ensayos de transcripción in vitro, tal como se describe en Nan, X et al., Cell 88: 471-481 (1997), en Yusufzai T.M. and Wolffe, A.P., Nucl. Acids Res. 28: 4172-4179 (2000) o Yu F. et al., Nucl. Acids Res. 29(21):4493-501 (2001).

El término secuencia del ácido nucleico "optimizada del condón" como se utiliza en este documento se refiere a una secuencia del ácido nucleico que contiene codones que se diseñan con el fin de utilizar los codones preferidos por la célula huésped deseada, preferiblemente una célula huésped *E. coli*. Una secuencia del ácido nucleico se convierte en una secuencia del ácido nucleico optimizada del condón que tiene una secuencia de polipéptido traducida idéntica, pero con el uso de un codón alternativo, en particular utilizando los codones más frecuentemente de un organismo dado, por ejemplo *Escherichia coli*. Dicho proceso se llama "retrotraducción". Un método para seleccionar y preparar secuencias del ácido nucleico optimizadas del condón y realizar una retrotraducción comprende por ejemplo, el empleo de los datos a partir del gen de Clase II de Henaut and Danchin: Analysis and Predictions from *Escherichia coli* sequences in: *Escherichia coli* and *Salmonella*, Vol. 2, Ch. 114:2047-2066, 1996, Neidhardt FC ed., ASM press, Washington, D.C.. La guía para la retrotraducción de una secuencia de proteína dada también se proporciona por las herramientas disponibles en <http://www.pordoric.de/JCat> (Grote A. et al., *Nucleic Acids Research*, 2005, Vol. 33, WebServer issue doi:10.1093/nar/gki376, W526-W531) o el software Vector NTI (Invitrogen). Un método para crear una secuencia del ácido nucleico optimizada del condón de una proteína MeCP2 incluye la identificación de codones en la secuencia que ocurren naturalmente de un gen MECP2 que comúnmente no se asocian con alta expresión de genes *E. coli* y el reemplazo de estos con codones que se conocen por ser ampliamente utilizados en la expresión del gen *E. coli*. Una secuencia del ácido nucleico optimizada del condón puede mostrar expresión mejorada sobre la secuencia que ocurre naturalmente en la célula huésped deseada. Si una secuencia optimizada del condón inducirá una mejora en la producción de la proteína sobre la secuencia no-optimizada, se puede determinar por un experto en vista de la presente divulgación. Un ejemplo de cómo diseñar y crear una secuencia del ácido nucleico optimizada del condón, de la invención se proporciona en la sección experimental, a continuación.

Una célula "heteróloga" como se utiliza en este documento se refiere a una célula que expresa un gen que no es un gen que ocurre naturalmente de la célula particular.

En una modalidad preferida, la proteína MeCP2 o fragmento biológicamente activo o derivado de la proteína o fragmento es de origen humano. Más particularmente, la proteína MeCP2 o un fragmento biológicamente activo o derivado de la proteína o fragmento puede tener la isoforma e1 de MeCP2 humana o la isoforma e2 de MeCP2 humana, o un fragmento biológicamente activo o un derivado de estas isoformas o estos fragmentos. Será claro para un experto, que otras isoformas biológicamente activas de MeCP2 de origen humano o no-humano o sus fragmentos biológicamente activos o derivados de las isoformas o fragmentos también se pueden utilizar como proteínas MeCP2 de la invención.

La primera secuencia del ácido nucleico tiene al menos 60 %, al menos 65 %, en particular al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ADN de la isoforma e1 de MeCP2 humana optimizada del condón (SEQ ID NO.1) o la isoforma e2 de MeCP2 humana optimizada del condón (SEQ ID NO.2). Un 100% de identidad de la secuencia también se incluye. Una molécula de ácido nucleico tiene "al menos x % de identidad" con la SEQ ID NO.1 o SEQ ID NO.2 si, cuando la secuencia del ácido nucleico en cuestión se alinea con la mejor secuencia correspondiente de SEQ ID NO.1 o SEQ ID NO.2, la identidad de secuencia entre estas dos secuencias alineadas es al menos x %. Dicha alineación se puede hacer mediante un programa de ordenador de homología disponible al público, por ejemplo el programa "BLAST" proporcionado en la página principal de NCBI en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Mientras que los derivados o polipéptidos o fragmentos de MeCP2 no-funcionales pueden ser útiles por ejemplo para propósitos de diagnóstico, los fragmentos o derivados o proteínas funcionales biológicamente activos son deseables para propósitos terapéuticos. La actividad biológica de tal polipéptido puede ser determinado por los ensayos descritos anteriormente.

En otra modalidad preferida, la molécula de ácido nucleico se expresa en una célula procariota, particularmente en una célula gram-negativa o gram-positiva, por ejemplo células *E. coli* o células *Bacillus* sp.. Las células procariotas apropiadas para la expresión de moléculas de ácidos nucleicos, por ejemplo varias bacterias gram-negativas o gram-positivas, son conocidas en el oficio. El experto también apreciará que otros sistemas de expresión bien conocidos pueden ser utilizados para lograr la expresión de la proteína a partir de las moléculas de ácidos nucleicos. Tales células apropiadas pueden ser células no-humanas dentro o fuera del cuerpo del animal o una célula humana fuera del cuerpo humano. Ejemplos son las células de mamífero similares a las células HEK, células HELA, células CHO, y otras. Ejemplos de células de origen no-mamífero o incluso de origen no-vertebrado son células Schneider de la *Drosophila*, otras células de insectos similares a las células Sf9, células de levadura, otras células de hongos, y otras.

Se describe una molécula de ácido nucleico, que además comprende una segunda secuencia del ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende un dominio de transducción de la proteína, en donde la segunda secuencia es un enlace operativo con la primera secuencia del ácido nucleico. Particularmente, la molécula de ácido nucleico que comprende una primera y segunda secuencia del ácido nucleico se selecciona de cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO.50 o SEQ ID NO.51.

Los dominios de transducción de la proteína son regiones de proteínas de densidad de carga altamente positiva, y son capaces de atravesar las membranas biológicas mediante rutas no-clásicas. Estas regiones usualmente tienen menos de 30 aminoácidos en longitud y adquieren su carácter básico y por lo tanto sus propiedades de transducción

de arginina alta y, en menor medida, contenidos de lisina; se hace referencia por ejemplo a Mol. Cell Proteomics. 2004, 3 (8): 746 - 69. Un dominio de transducción se puede obtener a partir de cualquier proteína o porción de esta que puede asistir en la entrada en una célula de otra proteína fusionada al dominio de transducción. La capacidad de un dominio de transducción para la transducción de una proteína en una célula puede ser determinada por cualquier método convencional para monitorear la absorción de proteína por las células, por lo general mediante la clasificación FACS o varias técnicas de microscopía como microscopía de fluorescencia. Los dominios de transducción de la proteína que tiene la capacidad para la transducción de un polipéptido acoplado se puede derivar, por ejemplo, a partir de la proteína transcripcional transactivadora del virus-1 de inmunodeficiencia humana (proteína TAT, número de acceso AAQ86751), el homeodominio antennapedia (Derossi et al., J. Biol. Chem., 269: 10444 (1994) y HSVVP22 (Elliot y O'Hare, Cell, 88: 223 (1997)), u otros dominios de la proteína de transducción como tramos de poliarginina (8 a 10) (para una revisión, ver Jones S.W. et al., Br. J. Pharmacol. (2005) 145(8):1093-1102), o el péptido sintético PTD4 (descrito en Ho A. et al., Cancer Res. (2001) 15; 61(2):474-477). En una modalidad preferida, el dominio de transducción de la proteína se deriva de la proteína TAT. Aún más preferida, la secuencia del ácido nucleico que codifica un dominio de transducción de la proteína codifica una secuencia de aminoácido que tiene al menos 60 %, al menos 65 %, en particular al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido del dominio de transducción de la proteína TAT (YGRKKRRQRRR, SEQ ID NO.54). Una secuencia de aminoácido tiene "al menos x % de identidad" con SEQ ID NO.54 si, cuando la secuencia de aminoácido en cuestión se alinea con la mejor secuencia correspondiente de SEQ ID NO.54, la identidad de secuencia entre aquellas dos secuencias alineadas es al menos x %. Dicha alineación se puede hacer mediante un programa de ordenador de homología disponible al público, por ejemplo el programa "blastp" proporcionado en la página principal de NCBI en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. El experto, sin embargo, apreciará que un fragmento más largo de la proteína TAT también se puede utilizar como un dominio de transducción de la proteína.

El término "en enlace operativo", como se utiliza en este documento, significa una configuración de las secuencias del ácido nucleico en las cuales una secuencia se coloca en una posición relativa a otra secuencia de tal manera que las secuencias del ácido nucleico, después del enlace, están en una orientación de tal manera que el marco de traducción de los polipéptidos codificados no se altera (i.e. las moléculas de ácidos nucleicos están unidos el uno al otro "en-marco"). La molécula de ácido nucleico resultante, por lo tanto codifica una proteína de fusión en-marco. Para lograr esto, las secuencias del ácido nucleico de la invención se pueden organizar de varias maneras. Una secuencia del ácido nucleico se puede lograr en el N-terminal o en el C-terminal de la otra secuencia, ya sea unidos directamente o separados por ácidos nucleicos ligadores adicionales que también están en-marco con las secuencias del ácido nucleico. También se contempla que una secuencia del ácido nucleico se inserta en otra secuencia del ácido nucleico, a condición que el marco de lectura del polipéptido codificado permanezca intacto. Si se desea que la secuencia en la cual la inserción se coloca incluso codifica un polipéptido funcional, la actividad biológica del polipéptido en cuestión se puede evaluar de acuerdo con las pruebas descritas en este documento.

Un enlace de las secuencias del ácido nucleico se puede lograr por ejemplo por métodos estándar de enlace de manipulación de ADN como se describe en la sección de ejemplos en este documento y por ejemplo Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Otros métodos de enlace tales como enlace químico también se contemplan.

También se contempla una tercera secuencia del ácido nucleico en enlace operativo con una secuencia del ácido nucleico que comprende (i) la primera secuencia del ácido nucleico o (ii) la primera y la segunda secuencia del ácido nucleico, en donde la tercera secuencia codifica una o más secuencias de polipéptidos apropiados para la purificación de proteínas. Particularmente, las secuencias de polipéptidos apropiadas para la purificación de proteína incluyen, pero no se limitan a, una etiqueta strep y/o una etiqueta his y/o una etiqueta GST y/o una etiqueta intein. Dichas etiquetas facilitan la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad, y son bien-conocidas en el oficio (para referencia, ver por ejemplo Terpe K., AppL Microbiol. Biotechnol. (2003) 60(5):523-533). La tercera secuencia del ácido nucleico está en enlace operativo con una secuencia del ácido nucleico que comprende la primera secuencia del ácido nucleico o la primera y la segunda secuencia del ácido nucleico, i.e. se puede lograr en una posición ya sea en el N-terminal o el C-terminal de cualquiera la primera o la segunda secuencia del ácido nucleico. Si (1) indica la primera secuencia del ácido nucleico, (2) indica la segunda secuencia del ácido nucleico, y (3) indica la tercera secuencia del ácido nucleico, las formas posibles de posicionar las secuencias incluyen (1)-(2)-(3), (1)-(3)-(2), (2)-(1)-(3), (2)-(3)-(1), (3)-(1)-(2), o (3)-(2)-(1). Las secuencias del ácido nucleico se pueden ligar la una a la otra ya sea directamente o se pueden separar la una de la otra por ácidos nucleicos ligadores adicionales. La unión con o sin un ligador se realiza con el fin de lograr las tres secuencias del ácido nucleico en-marco con respecto a la otra, y la molécula de ácido nucleico resultante codifica una proteína de fusión. También se contempla que una secuencia del ácido nucleico se inserta en otra secuencia del ácido nucleico, a condición que el marco de lectura del polipéptido codificado permanezca intacto. Si se desea que la secuencia en la cual la inserción se coloca no obstante codifique un polipéptido funcional, la actividad biológica del polipéptido en cuestión se puede evaluar de acuerdo con las pruebas descritas en este documento.

La molécula de ácido nucleico además puede comprender una cuarta secuencia del ácido nucleico en enlace operativo con una secuencia del ácido nucleico que comprende (i) la primera secuencia del ácido nucleico, o (ii) la primera y la segunda secuencia del ácido nucleico, o (iii) la primera y la segunda y la tercera secuencia del ácido nucleico, dicha cuarta secuencia que codifica uno o más polipéptidos indicadores. Los polipéptidos indicadores o

moléculas indicadoras apropiadas permiten una visualización y/o localización del polipéptido de fusión por ejemplo por métodos ópticos tales como microscopía de fluorescencia. Ejemplos de apropiados polipéptidos indicadores son proteínas fluorescentes como GFP, CFP y YFP, o enzimas capaces de formar un marcador detectable en una reacción secundaria tal como peroxidasa de rábano picante, luciferasa, o β -galactosidasa. En lugar de un polipéptido indicador, el experto también contemplará la marcación de una proteína de fusión de la invención con otro marcador detectable tal como una molécula orgánica fluorescente o luminiscente (por ejemplo fluoresceína, FITC, o Cy5) o por un marcador radioactivo.

La cuarta secuencia del ácido nucleico está en enlace operativo con una secuencia del ácido nucleico que comprende la primera secuencia del ácido nucleico o la primera y la segunda secuencia del ácido nucleico o la primera y la segunda y la tercera secuencia del ácido nucleico, i.e. se puede lograr en una posición ya sea en el N-terminal o el C-terminal de cualquiera la primera o la segunda o la tercera secuencia del ácido nucleico. Si (1) indica la primera secuencia del ácido nucleico, (2) indica la segunda secuencia del ácido nucleico, (3) indica la segunda secuencia del ácido nucleico, y (4) indica la tercera secuencia del ácido nucleico, las formas posibles de posicionar las secuencias incluyen (1)-(2)-(3)-(4), (1)-(2)-(4)-(3), (1)-(3)-(2)-(4), (1)-(3)-(4)-(2), (1)-(4)-(2)-(3), (1)-(4)-(3)-(2), (2)-(1)-(3)-(4), (2)-(1)-(4)-(3), (2)-(3)-(1)-(4), (2)-(3)-(4)-(1), (2)-(4)-(1)-(3), (2)-(4)-(3)-(1), (3)-(1)-(2)-(4), (3)-(1)-(4)-(2), (3)-(2)-(1)-(4), (3)-(2)-(4)-(1), (3)-(4)-(1)-(2), (3)-(4)-(2)-(1), (4)-(1)-(2)-(3), (4)-(1)-(3)-(2), (4)-(2)-(1)-(3), (4)-(2)-(3)-(1), (4)-(3)-(1)-(2), o (4)-(3)-(2)-(1). Las secuencias del ácido nucleico se pueden ligar a cada otra, ya sea directamente o pueden ser separadas una con otra por ácidos nucleicos ligadores adicionales. La unión con o sin un ligador se realiza con el fin de lograr las cuatro secuencias del ácido nucleico en-marco con respecto a cada otra, y la molécula de ácido nucleico resultante codifica una proteína de fusión. También se contempla que una secuencia del ácido nucleico se inserte en otra secuencia del ácido nucleico, a condición que el marco de lectura del polipéptido codificado permanezca intacto. Si se desea que la secuencia en la cual la inserción se coloca incluso codifique un polipéptido funcional, la actividad biológica del polipéptido en cuestión se puede evaluar de acuerdo con las pruebas descritas en este documento.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un polipéptido según se define en las reivindicaciones. Los métodos de obtención de polipéptidos a partir de las moléculas de ácidos nucleicos, son bien-conocidos en el oficio y se describen, por ejemplo por Maniatis et al (supra).

También se contempla obtener un polipéptido de fusión por enlace químico de dos o más fragmentos de un polipéptido de la invención. Los métodos de enlace químico proporcionan enlaces covalentes entre polipéptidos mediante reticulado químico. Los agentes de reticulado apropiados son por ejemplo reticulantes bifuncionales tales como sulfo-MBS, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, y otros reticulantes disponibles por ejemplo a partir de Pierce Chemical Company (Rockford, IL, USA).

También se contempla un vector que comprende las moléculas de ácidos nucleicos como se describe anteriormente. Dicho vector puede ser un plásmido, un fagómido o un cósmido. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico como se describe anteriormente se puede clonar en un vector de expresión procariota o eucariota por métodos descritos en Maniatis et al. (supra). Preferiblemente, dicho vector es capaz de expresar un polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico como se describe anteriormente. Tales vectores de expresión por lo general comprenden al menos un promotor y también pueden comprender una señal de inicio de la traducción y una señal de la terminación de la traducción, o señales de terminación transcripcional y poliadenilación. Los vectores de expresión apropiados son por ejemplo el vector pET28 a+, el vector pUC18, o el vector pTRI-Ex-neo1.1, como se describe en los Ejemplos a continuación.

Además se contempla una célula huésped que comprende un vector como se describe anteriormente. Dicha célula huésped puede ser una célula no-humana dentro o fuera del cuerpo del animal o una célula humana dentro o fuera del cuerpo humano. Otras células apropiadas incluyen células procariotas, particularmente células de bacterias gram-negativas o gram-positivas. Particularmente se prefieren las células *E. coli* o células *Bacillus* sp.. Un vector se puede transferir en una célula huésped por una variedad de métodos bien-conocidos en el oficio. Los métodos de transfección de células huésped y el cultivo de dichas células huésped transfectadas, así como las condiciones para producir y obtener los polipéptidos de la invención a partir de dichas células huésped transformadas también son bien-conocidos en el oficio y se describen, por ejemplo, en Maniatis et al. (supra).

En otro aspecto, según se describe anteriormente un método de preparación de las secuencias del ácido nucleico o las moléculas de ácidos nucleicos como se describe anteriormente, que comprende la etapa de (a) generación de una molécula bicatenaria de ácido nucleico por hibridación y extendiendo un primer conjunto de oligonucleótidos cebadores apropiados, en donde los cebadores comprenden las secuencias del ácido nucleico como se describe anteriormente, y (b) opcionalmente la repetición de la etapa de (a) con un segundo, tercer, o más, conjuntos de oligonucleótidos cebadores apropiados, se describe.

Los oligonucleótidos cebadores apropiados se designan dividiendo una secuencia del ácido nucleico de interés en oligonucleótidos solapantes, de tal manera que los oligonucleótidos comprenden secuencias del ácido nucleico como se describe anteriormente. Por lo general, el rango de solapamiento comprendido por estos oligonucleótidos cebadores varía de 3 a 100 nucleótidos, particularmente de 20 a 30 nucleótidos. Un segundo, tercer, o más, conjuntos de oligonucleótidos cebadores apropiados se pueden diseñar de tal manera que cada cebador del

segundo, tercer, o más, conjuntos cubra una región de la secuencia deseada del ácido nucleico, y también puede comprender un rango de solapamiento con uno o más de los cebadores precedentes. Preferiblemente, el rango de solapamiento varía entre 3 a 100 nucleótidos, particularmente entre 20 a 30 nucleótidos.

Para lograr una hibridación de un oligonucleótido cebador con uno u otros oligonucleótidos cebadores o porciones de secuencias del ácido nucleico como se describe anteriormente, las condiciones y procedimientos que se siguen son bien-conocidas en el oficio. Un experto apreciará que las condiciones para escoger el procedimiento de hibridación dependen de varios factores tales como longitud del cebador, longitud de las regiones solapantes, contenido de GC, etc. Después de la hibridación, la secuencia de nucleótidos de los cebadores se puede extender mediante métodos bien conocidos de reacción PCR u otros métodos útiles para la síntesis de ADN. Se hace referencia, por ejemplo, a Xiong A.S., et al. (2004), Nucl. Acids Res. 32(12):e98. Un método de preparación de una secuencia del ácido nucleico de acuerdo con la invención se ilustra por ejemplo en el Ejemplo 1, a continuación.

En otro aspecto, un método para producir un polipéptido que comprende una proteína MeCP2 o un fragmento biológicamente activo de una proteína MeCP2 o un derivado de una proteína MeCP2 o fragmento de MeCP2, que comprende (a) la transformación de una célula huésped con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención; (b) el cultivo de la célula transformada bajo condiciones que permiten la expresión de una molécula de ácido nucleico de la invención para producir un polipéptido que comprende una proteína MeCP2 o un fragmento biológicamente activo o derivado de una proteína MeCP2 o fragmento; y (c) opcionalmente la recuperación del polipéptido, se contempla.

Los métodos para la transformación de una célula huésped con una molécula de ácido nucleico son bien-conocidos en el oficio. Las células huésped se pueden transfectar por ejemplo por métodos tales como transfección mediante fosfato de calcio, electroporación, transfección de la lipofectina y así sucesivamente. Las células huésped también pueden ser transformadas por métodos mecánicos tales como microinyección de ADN o utilizando vectores tales como retrovirus. Se hace referencia a Maniatis et al. (supra). Preferiblemente, la célula huésped es una célula procariota, más preferiblemente una célula *E. coli*. Las condiciones para el cultivo de tales células huésped transfectadas así como las condiciones que permiten la expresión de las moléculas de ácidos nucleicos descrita anteriormente, para producir los polipéptidos de acuerdo con la invención se conocen por el experto y dependen, por ejemplo del tipo de la célula huésped y del tipo de vector utilizado para transformar la célula huésped. Ejemplos del cultivo de células huésped y para realizar la expresión de los polipéptidos de la invención se proporcionan en la sección de ejemplos a continuación. Los métodos para la recuperación de un polipéptido a partir de una célula huésped transformada, se describen por ejemplo en Roe, S. (ed.), Protein Purification Applications: A Practical Approach. Oxford University Press (2001), Oxford.

En una modalidad preferida, las etapas (b) y (c) del método no incluyen someter al polipéptido a condiciones de desnaturalización. La desnaturalización de un polipéptido, como se utiliza en este documento, se refiere a los cambios estructurales causados por efectos químicos y físicos que pueden conducir a una pérdida completa o parcial de la actividad biológica del polipéptido. La desnaturalización de un polipéptido cambia la estructura secundaria y terciaria o la conformación del polipéptido, pero usualmente conserva su estructura primaria. La desnaturalización se puede realizar por ejemplo mediante cambios en la temperatura, el pH, adición de detergentes o sales, ultrasonidos, y así sucesivamente. En contraste con la estrategia más común del cultivo y la recuperación de los polipéptidos bajo condiciones de desnaturalización por ejemplo para propósitos de purificación, la extracción de los polipéptidos bajo condiciones nativas puede ofrecer la ventaja de mantener la actividad funcional y reducir la degradación intracelular debido al plegado incorrecto de los polipéptidos. Tales polipéptidos extraídos de forma nativa de la invención pueden tener alta eficiencia en la transducción.

En una modalidad preferida, el polipéptido está presente después de la etapa (b) del método en una concentración mayor de 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 mg/l del cultivo bacteriano. La concentración de la proteína se puede cuantificar, utilizando el Kit de Ensayo de Proteínas Coomassie (Bradford) (Pierce, Rockford, USA) de acuerdo con el protocolo del proveedor. En un ejemplo, la concentración de la proteína se mide después de la elución de la solución de la muestra a partir de una columna de afinidad y después de la desalación. Por lo general, la concentración de la proteína se determina contra un conjunto de estándares de proteínas tales como un estándar de albúmina. Los estándares se utilizan para calibrar un fotómetro tal como un Eppendorf BioPhotometer (medición de la absorbancia por ejemplo a 595 nm). En un ejemplo, 100 µl de la proteína eluidos se mezclan con 5 ml del "Reactivo del Ensayo de Proteína Coomassie" (Pierce), equilibrado a temperatura ambiente durante 10 min y a continuación se mide en un espectrofotómetro. Un algoritmo integrado calcula la concentración de la muestra.

En otro aspecto, una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico como se describe anteriormente y/o un polipéptido de acuerdo con la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable se contempla. Un experto estará familiarizado con apropiados materiales portadores farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad neurodegenerativa o una enfermedad del desarrollo neurológico, que comprende la administración de un polipéptido o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención a un mamífero. Preferiblemente, el mamífero es un sujeto humano. Las

posibles rutas de administración son por vía intravenosa, vía intraperitoneal, intratecal, subcutánea, rectal, sublingual, nasal, oral, o transdérmica.

Por lo general, una enfermedad neurodegenerativa es un trastorno progresivo causado por el deterioro y pérdida de células neuronales. Una enfermedad del desarrollo neurológico es un trastorno causado por una alteración del control prenatal y, en algunos casos, del desarrollo del cerebro postnatal. Particularmente, los trastornos neurodegenerativos y del desarrollo neurológico se deben a una reducción de la expresión de MeCP2 o a una función deteriorada de MeCP2. Una función deteriorada de MeCP2 se puede reconocer por ejemplo mediante las consecuencias funcionales de mutaciones del gen MECP2 como se describe en Yusufzai T.M. and Wolffe A.P., Nucl. Acids Res. (2000), 28(21): 4172-4179, Kudo S. et al., Brain Dev. (2001) Suppl 1:S165-73, y Ballestar E. et al., Hum. Genet. (2005) 116(1-2): 91-104. Generalmente, las mutaciones del MBD (dominio de enlace metil) alteran la capacidad de MeCP2 de unir o de ser liberada a partir del ADN, y de esta manera hacerla no-funcional. Las mutaciones dentro del TRD (dominio de represión de la transcripción) por lo general modifican o suprimen la función de represión de la transcripción de la proteína, y conducen a una reducción de la expresión de MeCP2. En vista de la divulgación anterior, el profesional médico que presta la atención sabrá si un paciente se beneficiará de, o es apto para ser sometido a, los métodos de tratamiento y/o terapia descritos en este documento.

Más particularmente, la enfermedad del desarrollo neurológico es el síndrome de Rett. El síndrome de Rett es un trastorno del desarrollo neurológico después del nacimiento caracterizado por una pérdida progresiva de capacidades mentales, pérdida de habilidades comunicativas y habilidades motoras gruesas y finas. Una desaceleración del crecimiento de la cabeza también el desarrollo de diferentes patrones movimientos de las manos estereotipados son características usuales del síndrome de Rett. Los criterios de diagnóstico han sido definidos y son útiles para el diagnóstico clínico (Hagberg B. et al. Eur. J. Paediatr. Neurol. (2002) 6(5):293-7). Herramientas para el diagnóstico del síndrome de Rett incluyen la detección de mutaciones en el gen MECP2.

En otra modalidad, la composición farmacéutica se administra a una dosificación apropiada. Un experto conocerá los procedimientos útiles para establecer una dosis apropiada para la administración. Una dosis apropiada conducirá a una mejora general de las condiciones de un mamífero que sufre de un trastorno neurodegenerativo y del desarrollo neurológico debido a una reducción de la expresión de MeCP2 o a una función deteriorada de MeCP2. Los efectos de una dosificación apropiada pueden incluir un aumento de la atención del paciente, una reducción de las convulsiones, mejorar las habilidades motoras, y los síntomas generalmente asociados con el síndrome de Rett. Preferiblemente, la composición farmacéutica se administra a una dosificación de 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 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, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 µg del polipéptido de la invención o secuencias del ácido nucleico como se describe anteriormente por g de peso corporal del mamífero. En otra modalidad, la composición farmacéutica se administra al menos una vez por día, al menos cada 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días.

En otro aspecto, el uso de una molécula de ácido nucleico como se describe anteriormente para producir un polipéptido que comprende una proteína MeCP2 o un fragmento biológicamente activo o un derivado de una MeCP2 o fragmento de MeCP2 se describe. Ejemplos para tales usos se proporcionan en los ejemplos a continuación.

En otro aspecto, una molécula de ácido nucleico o un polipéptido como se describe anteriormente se contempla para utilizar en medicina y/o medicina veterinaria. En otro aspecto, la invención se relaciona con un uso del polipéptido de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para la prevención y/o terapia de una enfermedad neurodegenerativa o del desarrollo neurológico, como se describe anteriormente. Más específicamente, la enfermedad del desarrollo neurológico se causa por una reducción de la expresión de MeCP2 o mediante una función deteriorada de MeCP2, como se describe anteriormente. Particularmente, la enfermedad del desarrollo neurológico es el síndrome de Rett, como se describe anteriormente. La molécula de ácido nucleico, polipéptido o composición farmacéutica está en una forma apropiada para la administración a un mamífero. Preferiblemente, el mamífero es un sujeto humano. Las posibles rutas de administración son vía intravenosa, vía intraperitoneal, intratecal, subcutánea, rectal, sublingual, nasal, oral, o transdérmica.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. A. El dibujo muestra la estrategia para fabricar la secuencia sintética reportada como SEQ ID NO: 3. Diez oligonucleótidos han sido diseñados de acuerdo con la secuencia optimizada del codón para Escherichia coli (flechas). La síntesis fue mediante una reacción de PCR en la etapa 1, creando un fragmento central utilizando dos oligonucleótidos de 100 bp en tamaño complementario a su terminal 3' por 20 nucleótidos (Mecp2_syn_5'_core_F y Mecp2_syn_5'_core_R). El producto terminal fue de 180 bp en tamaño y se representa por las líneas de trazos alargadas. Una alícuota de este primer producto luego fue utilizada como plantilla para la segunda reacción de PCR en la etapa 2, utilizando los dos oligonucleótidos que flanquean Mecp2syn_5'_F1 y Mecp2syn_5'_R1 cada uno de 100 bp en tamaño. La reacción se continuó de manera similar en la etapa 3, 4 y 5. B. El producto final de la síntesis se representa junto con los tres sitios de restricción utilizados para posteriores procedimientos de clonación. C.

Representación esquemática del ADN sintético generado por PCR con los sitios de restricción relevantes utilizados para la clonación.

Figura 2. Diagrama de flujo para la generación de las construcciones de MECP2. El flujo muestra los procedimientos de clonación con todas las etapas intermedias que conducen a los vectores de expresión final que contienen los genes sintéticos para MeCP2e1 y MeCP2e2 fusionadas con el dominio de TAT.

Figura 3. A. Aumento de la proteína MeCP2e2 producido por la optimización de la secuencia de acuerdo con el codón de *Escherichia coli* utilizado. Las proteínas recombinantes de fusión strep-etiquetadas fueron separadas sobre SDS-PAGE al 10 % y se tiñeron con azul de Coomassie. La cantidad de proteína cargada sobre el gel corresponde a una cantidad igual del cultivo líquido procesado de bacterias. Carril 1, TAT-MeCP2e2-EGFP a partir de ADNc humano; carril 2, TAT-hsMeCP2e2-EGFP a partir de una secuencia de ADNc de MeCP2 parcialmente optimizada del codón E. coli utilizado. Carril 3, His-TAT-hsMeCP2 a partir de una secuencia de ADNc de MeCP2 parcialmente optimizada del codón de *Escherichia coli* utilizado. Carril 4, His-TAT-sMeCP2 producida a partir del gen sintético completo de MECP2. La imagen muestra claramente un incremento fuerte de la proteína producida utilizando la secuencia de ADNc optimizada del codón.

B.-D. La expresión y distribución de MeCP2e2-EGFP in vitro. B. Fila superior: microfotografías de una línea celular NIH3T3 estable que expresa la proteína de fusión TAT-MeCP2e2-EGFP. Aproximadamente 40% de las células tienen la expresión de la proteína TAT-MeCP2e2-EGFP. Las flechas apuntan a una célula (se muestra a una mayor amplificación en el recuadro) con distribución heterocromática típica (DAPI) de la proteína MeCP2e2. La fila inferior: casi el 100% de las células HeLa que expresan la proteína MeCP2e2. La localización está por lo general en el núcleo sin ninguna tinción de la proteína citosólica. Los recuadros revelan la distribución heterocromática de MeCP2. C. Western Blot de 100 µg de extracto de proteína a partir de controles no-transfectados de HeLa y NIH3T3 (wt) y las correspondientes líneas celulares estables que expresan TAT-MeCP2e2-EGFP (st) con anticuerpo contra histona H3 acetilada, anti-MeCP2 policlonal y anti-alfa tubulina como un control de carga. En ambas líneas celulares estables la proteína de fusión tiene un peso molecular aparente de 100 kDa. D. La cuantificación densitométrica de las señales Western Blot muestra una reducción en la acetilación de la histona H3 de 50 a 60% de las líneas celulares que sobre expresan la proteína de fusión TAT-MeCP2e2-EGFP versus las de tipo salvaje.

Figura 4. A. La cinética de transducción y los patrones de distribución de TAT-MeCP2e2-EGFP en varios tipos de células. Las células NIH3T3 se incubaron con 50 µg/ml de TAT-MeCP2e2-EGFP para 3 (a,b) o 12 horas, respectivamente (c,d). Después de 3 horas, las células solo fueron transducidas parcialmente y la proteína recombinante fue localizada principalmente en el citoplasma visible como manchas gruesas (a,b). Después de 12 horas de incubación la proteína recombinante realizó la transducción de todas las células y se localizaron principalmente en la localización fisiológica, el núcleo. e. La representación de la imagen confocal confirma que la proteína principalmente se localiza en el núcleo. f. La proteína EGFP recombinante sin TAT no fue capaz de penetrar las células en ningún momento y solo fue visible como mancha extracelular escatimada (12 horas de incubación). g y h. TAT-MeCP2e2-EGFP también fue utilizada para probar su eficiencia en la transducción en fibroblastos primarios de un paciente con Rett con el p.T158M. La imagen combinada muestra que la proteína ha transducido todos los fibroblastos eficientemente. La localización está principalmente en el núcleo pero alguna proteína quedo aún en el citoplasma (recuadro). i y j. Las neuronas del hipocampo primarias de ratones del tipo salvaje se incubaron con la proteína de fusión TAT-MeCP2e2-EGFP. La proteína MeCP2e2 es fácilmente detectable en el núcleo.

B., C. El tiempo de persistencia de la proteína TAT-MeCP2e2 en las células NIH3T3 transducidas. Los cultivos de células NIH3T3 se han incubado independientemente con la misma cantidad de proteína TAT-MeCP2e2. Los extractos de proteína a continuación han sido recolectados a partir de los cultivos de células tratadas en diferentes puntos de tiempo. B. El análisis Western blot muestra la presencia de la proteína recombinante a 2, 24, 48, 72, 96 (casi visible) pero no a 120 horas después de la incubación (carril 1 a 6 respectivamente). C. El análisis densitométrico muestra la reducción en la concentración de la proteína durante el tiempo. La caída máxima de aproximadamente 77% ha sido observada entre las 24 y 48 horas. El valor relativo ha sido calculado estableciendo el valor absoluto en el carril 1 como el 100%. Los valores en los diferentes puntos de tiempo. Por consiguiente luego han sido cambiados.

Figura 5. Mecp2 influye la acetilación de las histonas H3 y H4K16. a. Los extractos de proteína a partir de cultivos de células monoalélicas que expresan el wt (1) y la MeCP2 mutada (2) (mutación p.T158M) han sido analizados por el estado de acetilación de la histona H3 y H4K16. Los cultivos celulares independientes de la línea celular monoalélica que expresa el alelo mutado, han sido incubados respectivamente con 300 pmol de TAT-MeCP2e2 (3), MeCP2e2 (4) y TAT-EGFP (5) proteínas recombinantes durante 64 horas. La proteína MeCP2 solo fue detectable en la línea celular incubada con TAT-MeCP2e2 (3) pero no con MeCP2e2. TAT-EGFP exitosamente transduce las células y fue detectada por el anticuerpo anti-GFP (5). b. El análisis densitométrico normalizado del western blot utilizando tubulina como referencia de la carga de proteína, reveló una leve reducción de la histona H3 no-acetilada y una hiperacetilación de las histonas H3 y H4K16 en la línea celular monoalélica que expresa el alelo mutado (Mut) versus el tipo salvaje (WT) (barras blancas versus las negras). La incubación con TATMeCP2e2 de la línea celular mutada indujo una reducción de la hiperacetilación de ambas H3 y H4K16 y un leve incremento de la forma no-acetilada de H3 (barras grises). Ningún cambio significativo de la acetilación de la histona fue observado en los

cultivos celulares independientes por la incubación con una dosificación equimolar de MeCP2 sin proteínas TAT y TAT-EGFP (barras discontinuas oblicuas y horizontales). Estos resultados demuestran que la TAT-MeCP2e2 es biológicamente activa. c. Western blot de extractos de fibroblastos de un ratón wt (1), un ratón Meep2^{-/-} (2) y un ratón MECP2^{-/-} incubados con 300 pmol de TATMeCP2e2 (3). El anticuerpo anti-MeCP2 reveló una transducción eficiente de los fibroblastos mediante la proteína recombinante. La tubulina fue utilizada como referencia. d. El análisis densitométrico normalizado utilizando tubulina como proteína referencia del Western blot mostrado en c. reveló una reducción de la forma histona H3 no-acetilada, sin incremento de la forma acetilada de la histona H3 pero un incremento de la forma acetilada de la histona H4K16 de Mecp2^{-/-} (ko) versus los ratones de tipo salvaje (wt) (barra blancas versus negras). La incubación del cultivo celular de fibroblastos a partir de ratones Mecp2^{-/-} con TAT-MeCP2e2 (ko +) indujo un incremento de la histona H3 no-acetilada (barras grises) y una disminución del nivel de hiperacetilación de H4K16.

Figura 6. MeCP2 puede ser dirigida a neuronas de CNS in vivo. a. La inmunotransferencia con anticuerpo anti-MeCP2 de 50 µg de lisado de proteínas de cerebro de tres ratones wt sacrificados 20 horas después de una inyección intraperitoneal de forma independiente con TATMeCP2e2-EGFP (carril 1), TAT-MeCP2e2 (carril 2) o MeCP2e2 sin proteínas TAT (carril 3). En el carril 1, la presencia de TAT-MeCP2e2-EGFP puede ser bien reconocida por el peso molecular superior, en lo que respecta a la proteína Mecp2 endógena. El ratón inyectado con TAT-MeCP2e2 reveló una señal de la proteína MeCP2e2 mucho más fuerte (carril 2) como en el carril 1 y 3, donde el nivel de la Mecp2 endógena no es muy diferente. b. inmunofluorescencia GFP en el cerebro de ratón del tipo salvaje inyectado con TAT-MeCP2e2-EGFP y EGFP sin proteínas TAT 20 horas después de la inyección. La señal de GFP se localiza en el núcleo de casi todas las células en la corteza, la capa de células granulares de cerebelo y meninges externas en ratones inyectados con TAT-MeCP2e2-EGFP (1 a 6). EGFP no es detectable en los cerebros de ratón inyectado con EGFP (7 y 8). c. Inmunofluorescencia de dos animales Mecp2^{-/-} inyectados cada uno con una isoforma de proteínas recombinantes utilizando un anticuerpo policlonal anti-MeCP2. La primera y segunda filas representan las secciones de la corteza del ratón Mecp2^{-/-} tratado durante 20 días con TAT-Mecp2e1 recombinante (1,2,3) y e2 (4,5,6). La presencia de MeCP2 principalmente en los núcleos de las células es claramente evidente en los recuadros. Cortes del cerebro de unos ratones no inyectados Mecp2^{-/-} (7,8,9) y Mecp2^{-/-} (10,11) sirvieron como controles.

Figura 7. A. Experimentos de coimmunoprecipitación en cultivos celulares de fibroblastos de animales Mecp2^{-/-} transducidos por TAT-MeCP2e1 muestran una recuperación de HDAC1. En la fila superior es un Western blot de las fracciones de proteínas inmunoprecipitadas utilizando un anticuerpo policlonal anti MeCP2 ("+" fracción precipitada en la presencia y "-" en la ausencia del anticuerpo anti-MeCP2). En la fila de abajo es un análisis Western blot a partir del mismo inmunoprecipitado utilizando un anticuerpo anti-HDAC1. Los carriles 1 y 2: fracción de la proteína precipitada a partir de fibroblastos de un animal de tipo salvaje. Los carriles 3,4 y carriles 5,6: fracción de la proteína precipitada a partir de fibroblastos de ratones Mecp2^{-/-} transducidos con TAT-MeCP2e1 y TAT MeCP2e2, respectivamente. Los carriles 7 y 8: fracción de la proteína precipitada a partir de fibroblastos de un animal Mecp2^{-/-}. En las fracciones de inmunoprecipitación, la presencia de ambas MeCP2 también HDAC1 es visible en la fracción del control positivo (carril 1) también en las fracciones de células transducidas por ambas isoformas TAT-MeCP2 (carriles 3 y 5). Ninguna Mecp2 detectable, así como la proteína HDAC1 es visible en la fracción precipitada de los controles negativos (carril 7). El inmunoprecipitado en la ausencia de anti-MeCP2 no revela la presencia de MeCP2 ni de HDAC1.

B., C. las isoformas TAT-MeCP2 modulan la hiperacetilación de H3 y H4K16 en el cerebro. B. ratones deficientes de Mecp2 fueron inyectados i.p. por 14 días con PBS (carril 2), 20 µg/g (carril 3) o 30µg/g (carril 4) de TAT-MeCP2e1. 50 µg de extracto de proteínas de cerebro de todos los ratones inyectados (2 a 4) y un ratón no inyectado del tipo salvaje (1) fueron inmunotransferidos con anticuerpos contra la histona H3 (H3), histona H3 acetilada, histona H4K16 acetilada y MeCP2. El anticuerpo anti alfa-tubulina fue utilizado como el control de carga. Los ratones Mecp2^{-/-} no mostraron ninguna Mecp2 o proteína recombinante detectable (carriles 2, 3 y 4). No es detectable la hiperacetilación evidente ni de H3 ni de H4K16 en ratones con deficiencia de MeCP2 inyectados con PBS en comparación con los ratones del tipo salvaje. Sin embargo, la inyección de proteína recombinante reduce la acetilación de la histona H4K16. No fue observada mucha diferencia para la histona H3 acetilada y no acetilada. C. El análisis densitométrico que muestra una actividad bioquímica dependiente de la dosis de la proteína MeCP2. Experimentos análogos se han llevado a cabo con la proteína TAT-MeCP2e2 con resultados consistentemente similares. El valor relativo representa los valores densitométricos expresados como porcentaje del valor de los animales wt definidos como el 100%.

Figura 8. Las isoformas de MeCP2 entregadas al cerebro prolongan la vida útil y rescata la patología neuronal en ratones Mecp2^{-/-}. a. La gráfica de Kaplan-Meier que representa las curvas de supervivencia de ratones Mecp2^{-/-} no tratados (n=11), simulacro de tratamiento (n=6) o tratado con TAT-MeCP2e1 (n=5) o TAT-MeCP2e2 (n=5), respectivamente. b. La prueba de t-Student de dos colas reveló un valor p de < 0.05 por un valor alfa de 0.05 para ambos grupos no inyectado/simulacro de inyección versus TAT-MeCP2e1 y versus TAT-MeCP2e2. Ninguna diferencia estadística se presentó entre los grupos TAT-MeCP2e1/TAT-MeCP2e2 (p> 0.8) así como en los grupos de ratones no inyectados/simulacro de inyección. c. La tinción Niss1 de las neuronas del hipocampo CA2 reveló neuronas más pequeñas y más densamente pobladas en los ratones Mecp2^{-/-} (1) comparación con los ratones del tipo salvaje (2). En contraste, TAT-MeCP2e1 (3) tratamiento de destrucción neuronal revertido en ratones Mecp2^{-/-}. En (4) está la imagen del hipocampo del ratón tratado con TAT-MeCP2e2, que no cambia el tamaño de las

neuronas. d. Cuantificación del rescate celular en neuronas CA2 del hipocampo (n=3 para wt, n=3 para Mecp2^{-ly}, n=4 para ratones tratados TAT-MecP2e1 y n=3 para TAT-MecP2e2).

SECCIÓN DE EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos tienen la intención de ilustrar más, pero no limitar, la invención. Los ejemplos comprenden características técnicas y será apreciado que también las combinaciones de las características técnicas presentadas en esta sección de ejemplos se contemplan.

1. Generación de la construcción

Con el fin de establecer si una secuencia optimizada del codón inducirá una mejora en la producción de la proteína, una estrategia de dos etapas fue utilizada en la planificación de la optimización del codón. En primer lugar, solo aproximadamente la mitad de la secuencia codificante de la MECP2 fue optimizada, como se describe a continuación, mediante la selección de los codones con el uso de frecuencias en la *E. coli* de al menos 8-10%. A continuación, una evaluación de la expresión mejorada se realizó. Un incremento significativo de la producción de la proteína con la MecP2 "mitad sintética" confirmó la validez de esta estrategia, y en una segunda etapa, la secuencia fue completamente optimizada del codón, como se ilustra en Fig. 3A. La región solapante de los cebadores fue por lo general de una longitud de 20 nucleótidos con una temperatura de fusión de normalmente al menos 50°C, pero en muchos casos, regiones solapantes más grandes tuvieron que ser creadas con el fin de asegurar una hibridación eficiente durante la síntesis de PCR mediada. Un diagrama de flujo para la generación de las siguientes construcciones se proporciona en la Figura 2.

1. Dos oligonucleótidos complementarios en su terminal 3' de 20 bases fueron diseñados (TAT-core-F y TAT-core-R, SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8). Veinte pmol de cada oligonucleótido luego fueron alargados utilizando polimerasa Pfu (Stratagene, La Jolla, USA) bajo las siguientes condiciones: 15 min de desnaturalización a 96°C, seguido por una etapa de alargamiento a 60 °C durante 30 min. El producto luego se clonó en el vector pBluescript (Stratagene, La Jolla, USA) y fue secuenciado. A continuación dos cebadores adicionales (TAT-new-F y TAT-new-R, SEQ ID NO 9 y SEQ ID NO 10) fueron utilizados para amplificar la previa generación del inserto de un producto con unos sitios de restricción EcoRI y HindIII en los terminales genómicos 5' y 3', respectivamente. Este producto digerido con EcoRI y HindIII, luego fue subclonado en el vector puc18 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) generando la construcción pTAT-Strep. Los ADNc codificantes de la TAT y Strep tag-II contenida en la construcción pTAT-Strep se proporciona en la SEQ ID NO 5 (etapa 1, fig 2).

2. La secuencia de la clonación de EGFP fue retirada del vector pEGFP-C1 (Clontech, CA, USA) en la construcción pTAT-Strep, denominada puc18-TAT-EGFP-Strep (etapa 2, fig 2).

3. La secuencia de ADNc del gen MECP2 fue amplificado a partir del clon pCR-hMecP2 (W. Stratling, Universitätsklinik Eppendorf, Hamburg, Germany) por polimerasa Pfu utilizando los cebadores NotI-3 G-MecP2-F y R-MecP2-3 G-NcoI (SEQ ID NO 11 y SEQ ID NO 12). El producto de PCR fue medido con las secuencias de los sitios de restricción NotI y NcoI en los terminales genómicos 5' y 3' y se clonó en puc18-TAT-EGFP-Strep. La construcción del derivado fue el pTAT-MecP2e2-EGFP-Strep (etapa 3, fig 2).

4. El vector de expresión eucariota pTri-EX-TAT-MecP2e2-EGFP-Strep-His (etapa 4, fig 2) fue generado mediante la amplificación de la secuencia TAT-MecP2e2-EGFP-Strep a partir de la secuencia de la construcción pTAT-MecP2e2-EGFP mediante la polimerasa Pfu, utilizando los cebadores BspHI-TAT-F (SEQ ID 38) y XhoI-EGFP-R (SEQ ID 39). El producto de PCR fue digerido por BspHI/XhoI y se clonó en el vector pTri-Ex-Neo.1.1 (Novagen, Darmstadt, Germany) linearizado con NcoI/XhoI.

5. Una estrategia similar a la construcción 1 fue empleada para generar la construcción pET28-PTD4-6his utilizando los oligonucleótidos PTD4_core_F (SEQ ID NO 40), PTD4_core_R (SEQ ID NO 41), PTD4_amp_F (SEQ ID NO 42) y PTD4_amp_R (SEQ ID NO 43) generando una secuencia codificante del péptido PTD4 (Ho A et al. Cancer Res. 2001 Jan 15;61(2):474-7.) El producto resultante fue digerido con NcoI y XhoI y se clonó en el vector pET28a(+) digerido de forma similar (Novagen, Merck, Darmstadt, Germany), generando el plásmido pET 28-PP4-6His (etapa 5, fig2). La secuencia codificante generada contenida en el plásmido pET 28-PP4-6His se proporciona en SEQ ID 6.

6. El fragmento NdeI/BspEI a partir del pTAT-MecP2e2-EGFP-Strep se clonó en el pET28-PP4-6His digerido con NdeI y AgeI. La construcción resultante fue denominada pET28-TAT-MecP2e2-EGFP-6His. (etapa 6, fig 2)

7. Un fragmento NotI/XhoI a partir de pTri-EX-MecP2-EGFP-Strep-6His fue retirado y se clonó en el pET28-TAT-MecP2e2-EGFP-6His digerido con las mismas endonucleasas de restricción. La construcción resultante fue el pET28-TAT-MecP2e2-EGFP-Strep-6His.

8. Parte de la secuencia humana de MecP2 fue amplificada utilizando los cebadores Mecp2-His-F1 (SEQ ID 44) y Mecp2_His_rev (SEQ ID 45). Este producto se clonó en pBluescript generando el plásmido pBlue-6His (etapa 8, fig 2).

9. El fragmento NdeI/DraI que contiene la secuencia 6 His y parte de la secuencia codificante de MeCP2 fue liberada a partir del fragmento pBlue que contiene el His-tag y se clonó en pET28-TAT-MECP2e2-EGFP-Strep-6His digerido de forma similar. El plásmido generado fue denominado pET28-6HisTAT-MeCp2e2-EGFP-Strep-6His (etapa 9, fig 2).

10. El fragmento XhoI y DraIII a partir del pET28-6HisTAT-MeCp2e2-EGFP-Strep-6His fue liberado del vector. A continuación el mismo fragmento pero sin la secuencia codificante de la secuencia 6His fue amplificado utilizando los cebadores Mecp2_pet_XhoI (SEQ ID 46) y Mecp2_pet_DraIII (SEQ ID 47). Este producto de PCR luego fue utilizado para reconstituir el fragmento en pET28-6HisTAT-MECP2e2-EGFP-Strep-6His. El plásmido resultante fue el pET28-6HisTAT-MECP2e2-EGFP-Strep (etapa 10, fig 2).

10 LO1.1 Generación de genes sintéticos:

Los intentos para producir proteínas recombinantes utilizando el vector pET28-TAT-MECP2e2-EGFP-Strep-His que contiene el ADNc de MECP2 humano fueron insatisfactorios. La producción de la proteína fue de aproximadamente 0.1 mg/litro de cultivo de bacterias. Con el fin de superar esta insuficiente expresión de la proteína en *Escherichia coli*, una MeCP2 sintética optimizada de este organismo específico fue diseñada para eludir las restricciones de las preferencias condónicas. La secuencia de aminoácido de ambas isoformas e1 y e2 de la MeCP2 humana fue retrotraducida de acuerdo con el codón preferido de uso de la *Escherichia coli*. El contenido de GC de las secuencias de ADNc también fue reducido, lo que puede ser una fuente adicional de represión de la producción de la proteína. Esta secuencia artificial luego fue creada por síntesis mediada de PCR utilizando una serie de nucleótidos solapantes. Se sintetizó la secuencia codificante de MECP2e2 en dos reacciones separadas utilizando polimerasa de ADN Pfu Ultra de alta-fidelidad (Stratagene, La Jolla) con 18 oligo-nucleótidos complementarios. En una primera etapa un conjunto de 10 oligonucleótidos (SEQ ID NO 13 a SEQ ID NO 22) generó la secuencia SEQ ID NO. 3 de 810 bp que contiene también las secuencias codificantes del dominio de TAT y los sitios de restricción para la subclonación. La estrategia básica para la síntesis se esquematiza en la Figura 1. En la primera etapa, los dos oligonucleótidos centrales que tienen 20 bp de complementariedad fueron hibridizados y extendidos. Otra extensión del gen sintético se llevó a cabo utilizando los otros oligonucleótidos complementarios con el producto de PCR generado como una plantilla.

Componentes de la reacción (para 50µl):

Cebadores: Tat_core_F/Tat_core_R (100 pmol/µl)	1µl de cada uno
Mezcla dNTPs (2.5 mM cada nucleótido/µl)	8µl
10X solución reguladora de Polimerasa de ADN	5µl
Polimerasa de ADN Ultra Pfu (2.5 Unidades/µl)	2µl
dd H ₂ O	33µl

Condiciones del termociclador para la generación del primer fragmento:

Primera etapa: Desnaturalización Inicial 96°C durante 30 seg; Seguido por 10 ciclos: 96°C durante 20 seg; 55°C durante 30 seg; 72°C durante 1 min;

Segunda etapa: 20 ciclos: 96°C durante 30 seg; 72°C durante 1 min; Extensión final a 72°C durante 5 min.

El producto resultante fue purificado sobre la columna de limpieza de PCR (Millipore) Montage. Para las posteriores etapas de reacción, 1µl del producto de PCR purificado y 10 pmol de cada uno de los siguientes pares de cebadores fueron utilizados en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 96°C durante 2 min seguido de 25 ciclos a 96°C durante 20 seg; 55°C durante 30 seg; 72°C por 1 min. Cada siguiente etapa de amplificación, se realizó bajo las mismas condiciones utilizando como ADN de entrada el fragmento generado previamente por el incremento del tiempo de extensión con 10 seg para posteriores etapas de amplificación (Fig. 1).

11. La secuencia generada se clonó en el pBluescript y se compararon los errores de secuencia. Un clon libre a partir de los errores fue seleccionado y denominado pBlue-MECP2 e2-syn (etapa 11, fig 2).

12. El fragmento EcoRI/XcmI fue liberado a partir de pBlue-MECP2 e2-syn y se clonó en pTAT-MECP2e2-EGFPStrep digerido previamente con las mismas enzimas de restricción. El plásmido resultante fue denominado pTAT-MECP2 e2 syn-EGFP-Strep (etapa 12, fig 2).

13. Un fragmento NotI/SacI a partir de pTAT-MECP2 e2 syn-EGFP-Strep se liberó y se clonó en pET28-6His-TATMECP2-EGFP-Strep digerido de forma similar. El plásmido resultante fue el pET28- His-TAT-MECP2 e2(mitad)syn-EGFPStrep (etapa 13, fig 2).

14. El EGFP fue liberado a partir del vector pET28- His-TAT-MECP2 e2(mitad)syn-EGFP-Strep por la digestión con Sac II y BsrGI. Un producto de PCR generado utilizando el cebador reverso Mecp2_BsrGI (SEQ ID NO 31) y el

cebador hacia adelante Mecp2_1282_1306 (SEQ ID NO 32) regenerando la MeCP2 suprimida en parte, fue producido y se clonó en los sitios de restricción SacII/BsrGI de pET28- His-TAT-MECP2 e2(mitad)syn-EGFP-Strep. El vector resultante fue denominado pET28-His-TAT-MECP2 e2(mitad)syn-Strep, que no es codificante de EGFP (etapa 16 fig 2).

- 5 Un segundo conjunto de 8 oligonucleótidos (SEQ ID NO 23 a SEQ ID NO 30) fue empleado para generar la secuencia SEQ ID NO 4 utilizando una estrategia similar representada en la Figura 1 y anteriormente.

15. El producto de PCR se clonó en pBluescript y fue denominado pBlue-MECP2 e2-syn_3part (etapa 14, fig2).

- 10 16. El XcmI/BsrGI a partir de pBlue-MECP2 e2-syn_3part fue liberado a partir del vector y se clonó en pTAT-MECP2 e2 syn-EGFP-Strep generando el pTAT-MECP2 e2 syn. Este vector contiene la secuencia optimizada completamente mostrada en SEQ ID NO 2 (etapa 15, fig 2).

17. La secuencia MeCP2e2 sintética completa contenida en pTAT-MECP2 e2 syn fue retirada con NotI/BsrGI y se clonó en pET28-His-TAT-MECP2 e2(mitad)syn-Strep digerido de forma similar. El fragmento resultante contiene la secuencia sintética completa de MeCP2 y fue denominado pET28a-6His-TAT-MECP2 e2 syn-Strep, que es una de las construcciones utilizada para la producción de la proteína a gran escala.

- 15 18. Un producto de PCR fue generado con los oligonucleótidos utilizando Mecp2b_syn_F(SEQ ID NO 33), Mecp2b_syn_core (SEQ ID 34) y Mecp2b_syn_R (SEQ ID 35) que contiene las secuencias de la isoforma MeCP2e1.

Componentes de la reacción (para 50µl):

Cebadores: Mecp2b_syn_core /Mecp2b_syn_R (100 pmol/µl)	µl de cada uno
Mezcla dNTPs (2.5 mM cada nucleótido/µl)	8µl
10X solución reguladora de Polimerasa de ADN	5µl
Polimerasa de ADN Ultra Pfu (2.5 Unidades/µl)	2µl
dd H ₂ O	33µl

Condiciones del termociclador para la generación del primer fragmento:

- 20 Primera etapa: Desnaturalización Inicial 96°C durante 30 seg; seguido de 10 ciclos: 96°C por 20 seg; 55°C durante 30 seg; 72°C por 1 min;

Segunda etapa: 20 ciclos: 96°C durante 30 seg; 72°C durante 1 min; extensión final a 72°C durante 5 min.

Un µl del fragmento de PCR generado fue utilizado como ADN de entrada para la siguiente reacción:

Componentes de la reacción (por 50µl):

Cebadores: Mecp2b_syn_F /Mecp2b_syn_R (10 pmol/µl)	1 µl de cada uno
Un µl del producto de PCR a partir del primer PCR	1 µl
Mezcla dNTPs (2.5 mM cada nucleótido/µl)	8 µl
10X solución reguladora de Polimerasa de ADN	5 µl
Polimerasa de ADN Ultra Pfu (2.5 Unidades/µl)	2 µl
dd H ₂ O	32 µl

- 25 Desnaturalización inicial:

96°C durante 1 min

Seguido por 30 ciclos en las siguientes condiciones:

96°C durante 20 seg; 60°C durante 30 seg; 72°C durante 30 seg

Etapas de extensión final: 72°C durante 5 min.

- 30 Este fragmento de PCR reemplazó el fragmento del EagI con los sitios PstI del pET28a-6His-TAT-MECP2e2syn generando el pET28a-6His-TAT-MECP2e1syn Strep (etapa 18, fig 2). 19. Un producto de PCR generado utilizando los cebadores Mecp2 -syn -Nde I_F (SEQ ID 36 y Mecp2 -syn -BsrG I_R SEQ ID 37) amplificó la secuencia sintética

de MECP2 completa pero sin el dominio de TAT luego se clonó en pET28-His-TAT-MECP2 e2(mitad)syn-Strep digerido de forma similar. El plásmido resultante fue denominado pET28a-6His-MECP2 e2 syn-Strep (etapa 19, fig 2).

2. Expresión y Purificación de las Proteínas

- 5 Las etapas cruciales en este estudio fueron para lograr una eficiente producción de proteínas recombinantes. Como se ha señalado anteriormente, hemos creado una secuencia de ADNc de MECP2 sintética para ambas isoformas e1 y e2 de acuerdo con el codón de *Escherichia coli* de uso para aumentar la producción de las proteínas recombinantes (Fig. 3 A). Varias investigaciones in vitro se muestran a continuación, se demuestra la actividad bioquímica de las isoformas de fusión TAT-MeCP2 a pesar de la presencia de los dominios adicionales (ver también la Fig 5 y Fig. 7). En contraste con la estrategia más común para extraer las proteínas fusionadas con dominios de transducción bajo condiciones de desnaturalización, se decidió extraer las proteínas recombinantes bajo condiciones nativas con el fin de retener completamente su actividad funcional y para reducir la degradación intracelular debido al plegado incorrecto. Los experimentos in vitro mostrados a continuación apuntan que también estas proteínas extraídas de forma nativa tienen alta eficiencia en la transducción.
- 10 Para la expresión de la proteína, la cepa de *Escherichia coli* Rosette 2 (DE3) (Novagen) fue transformada con vectores de plásmidos a través de la electroporación. Una única colonia fue inoculada en 10ml de LB suplementado con 50µg/ml de kanamicina y se cultivó durante la noche a 37°C con agitación. El precultivo se diluyó 1:25 y se cultivó en 250 ml de LB suplementado con 50 µg/ml de kanamicina, durante 5 horas a 37°C y después se mantiene a 4°C por una hora. El cultivo además fue diluido 1:10 en 2.5 Litros de medio rico (2.5 g de extracto de carne por litro de LB), suplementado con 50 µg/ml de kanamicina e inducido con IPTG 1mM durante aproximadamente 12 horas a 30°C. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 7000g durante 10 min, 4°C. El pellet fue resuspendido en solución reguladora de lisis bacteriana (15 ml/l cultivo del pellet) con 100µg/ml de PMSF, 1 µl/ml de cóctel de inhibidor de la Proteasa (CALBIOCHEM), Lisozima 500 µg/ml, 1 Unidad/ml de Benzonasa (Merck Biosciences) y se lisaron con el vortex. El lisado se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, luego sobre hielo durante 15 minutos antes de que sea sometido a ultrasonido (ciclos de trabajo de 50-60 segundos, 5-6 de salida) 6 veces, 1 minuto cada una con un intervalo de 2 minutos para evitar el calor. El lisado fue centrifugado a 18,000xg durante 25 min, 4°C, luego el sobrenadante se filtró utilizando filtros de 0.45 µm (Millipore) y se purificó sobre columnas de afinidad de strep-tactina (IBA, Goettingen, Germany) utilizando el protocolo del proveedor. La proteína luego fue sometida a una solución reguladora de intercambio utilizando las columnas de desalación PD-10 (GE Healthcare, Freiburg, Germany). La composición de la solución reguladora fue: HEPES 20 mM, NaCl 300 mM, CaCl₂ 0.1 mM y glicerol al 10%. Los lipopolisacáridos bacterianos se han retirado por columnas EndoTrap (Profos, Regensburg; Germany) de acuerdo con los protocolos del proveedor después de equilibrar las columnas con la solución reguladora descrita previamente.

3. Cultivo celular y transducción de proteínas de fusión

35 3.1 Líneas celulares

Las células NIH3T3 (Fibroblasto de ratón, ATCC CCL 92) fueron cultivados en medio Eagle modificado de Dulbecco (PAN Biotech), que contiene 10% de suero fetal bovino (PAN Biotech) y los antibióticos penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) (PAN Biotech) a 37°C con 5% de CO₂.

- 40 Los fibroblastos a partir de una biopsia de piel de paciente femenina con Rett, que tiene una de las mutaciones del gen MECP2 más frecuente (T158M) fueron cultivados en RPMI 1640 con suero fetal bovino al 15%, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y L-glutamato (100 ng/ml) a 37°C con 7% de CO₂.

- 45 Los fibroblastos a partir de ratones Mecp2^{-/-} fueron establecidos a partir del día 7 postnatal (P7), utilizando las extremidades posteriores/punta de la cola. El tejido fue aclarado con DPBS y fue picado en pequeños pedazos con un bisturí estéril en placas de 35mm que contienen el medio bajo flujo de aire laminar. Con cuidado, el medio fue aspirado y se reemplazó con medio nuevo y la placa se incubó por una semana sin cambiar el medio a 37°C con 10% de CO₂ además las células de fibroblastos fueron mantenidos en medio Eagle modificado de Dulbecco, que contiene 20% de suero fetal bovino y los antibióticos penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) a 37°C con 7% de CO₂.

- 50 El cerebro de cachorros de 7 días postnatal (P7) disecado bajo flujo laminar, fue utilizado para aislar el hipocampo y la corteza cerebral de cultivo de neuronas de acuerdo con un protocolo publicado (Ray, J., et al., 1993, PNAS 90:3602-6).

3.2 Establecimiento de líneas celulares estables que expresen la proteína TAT-MeCP2e2-EGFP

- 55 Para establecer las líneas celulares estables que expresan TAT-MeCP2-EGFP, utilizamos células NIH3T3 (fibroblastos de ratón) y HeLa (carcinoma cervical humano). Las células HeLa fueron cultivadas en MEM-alfa (PAN Biotech, Aidenbach, Germany), con suero fetal bovino al 10%, penicilina (100 U/ ml), estreptomycin (100 µg/ml), y L-glutamato (100 ng/ml). NIH3T3 fueron cultivadas en DMEM con suero fetal bovino al 10%, penicilina (100 U/ ml), estreptomycin (100 µg/ml). Las células fueron transfectados con pTriEx TAT-MeCP2e2-EGFP-Strep-His utilizando el

reactivo de transfección de jugo Gene, de acuerdo con el protocolo del proveedor (Novagen). Dos días después de la transfección, las células fueron seleccionadas en medio que contiene 500 µg/ml de neomicina (GIBCO) durante 6 semanas y se mantuvieron después de esto en medio con 200 µg/ml de neomicina. Las imágenes fueron tomadas por las células de crecimiento durante un día en dos portaobjetos para cultivo de dos cámaras (Falcon, BD bioscience, Heidelberg, Germany). Las células se lavaron y montaron con medio de montaje de cambio de Vector que contiene DAPI (Vector laboratories, Burlingame, CA) y la distribución de la fluorescencia fue analizada en un microscopio Olympus BX60 (Olympus Optical Co. LTD, Japan) a 200 x de aumento en cinco campos diferentes utilizando el software de análisis SIS (Soft Imaging System GmbH, Münster).

3.3 Establecimiento de la línea celular monoalélica de paciente con Rett

Los fibroblastos de pacientes fueron transfectados con el plásmido pCI-neo-hTERT (Counter, C.M. et al., 1998, Oncogene 16:1217-22 and Lundberg, A.S. et al., 2002, Oncogene 21:4577-86) que contiene hTERT (subunidad de la Transcriptasa Reversa de Tolomerasa Humana) que codifica el gen utilizando Reactivo de transfección SuperFect de acuerdo con el protocolo del proveedor (Qiagen, Hilden, Germany). Las células transfectadas fueron seleccionadas durante 6 semanas en medio que contiene G418 (200 µg/ml) (Calbiochem, San Diego, USA) y se mantuvieron después de esto en medio con 100 µg/ml de G418. Para establecer una línea celular de expresión monoalélica, las células fueron tripsinizadas y se diluyeron con medio, las células sencillas fueron micro-pipeteadas bajo visualización con microscopio directa, las células individuales fueron transferidas a placas de 24 pozos que contienen medio acondicionado filtrado a partir del cultivo de forma exponencial de las células primarias suplementado con 20 ng/ml de bFGF (Factor de Crecimiento de Fibroblasto básico) (Sigma, Deisenhofen, Germany). En la confluencia del pozo, las células fueron tripsinizadas y expandidas. El ARN total fue extraído utilizando el kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany) y el ADNc fue sintetizado utilizando Transcriptasa Reversa Superscript-II y cebador Oligo (dT) 12-18 (Invitrogen). La región que contiene la mutación fue analizada por RT-PCR utilizando los cebadores flanqueantes (Rett_EX3-F y Rett_EX4-R, SEQ ID NO 48 y SEQ ID NO 49). La clonalidad fue confirmada por análisis de secuencias de los productos de RT-PCR.

4. Transducción of proteínas de fusión y análisis de las células transducidas

Para la transducción de proteínas TAT-MeCP2-EGFP y EGFP, las células fueron cultivadas para confluir en dos portaobjetos de cultivo de cámara (Falcon, BD Bioscience, USA). Los cultivos fueron suplidos con medio fresco y luego fueron tratados con varias concentraciones de proteínas de fusión (500-1500 pmol/ml) de diferentes intervalos de tiempo. La transducción de TATMeCP2e1 y TAT-MeCP2e2 así como proteínas MeCP2 se llevó a cabo después de marcarlas con la etiqueta de NHS-rodamina de acuerdo con el protocolo del fabricante (Pierce biotechnology, IL, USA), seguido de filtración en gel sobre una columna PD-10 para remover la rodamina sin incorporar. Para visualizar la distribución de la fluorescencia, las células fueron lavadas suavemente con PBS frío y se fijaron en paraformaldehído al 4% recién preparado en PBS durante 5 min a RT. Las células fueron lavadas de nuevo con PBS antes de ser montadas con medio de montaje de cambio de Vector que contiene DAPI (Vector laboratories, Burlingame, CA) y la distribución de la fluorescencia fue analizada bajo un microscopio fluorescente BX-60 (Olympus Optical Co. LTD, Japan) a 200 x de aumento en cinco campos diferentes utilizando el software de análisis SIS (Soft Imaging System GmbH, Münster) y también imágenes confocales fueron tomadas en un microscopio de exploración láser Leica TCS SP2 AOBS.

5. Creación de líneas celulares establemente que sobre expresan la proteína MeCP2e2 y transducción exitosa de las células primarias

Hemos establecido las líneas celulares HeLa y NIH3T3 estables que expresan la proteína de fusión TAT-MeCP2e2-EGFP etiquetado en el C-terminal con las etiquetas de afinidad Strep-II y 6-His, utilizando la construcción pTri-Ex-MECP2-EGFP=Strep-His. Después de la transfección de las células con esta construcción, la proteína se localizó predominantemente en las regiones heterocromáticas del núcleo, como particularmente evidente para la línea celular de ratón NIH3T3 (Fig. 3B). Particularmente en las células NIH3T3 detectaron una fuerte reducción de acetilación de la histona H3 que se conoce por ser mediada mediante MeCP2 (Fig. 3 C y D). Estos resultados indican que la proteína TAT-MeCP2e2-EGFP es activo funcionalmente, sin relacionarse de los dominios de proteína adicionales, que fueron introducidos.

Hemos creado una serie de construcciones para expresar ambas isoformas de MeCP2 con y sin la proteína EGFP en el C-terminal y se fusiona en el N-terminal con el dominio de TAT (Fig. 2). Otras construcciones contuvieron un gen sintético de MECP2 completamente optimizada del codón de Escherichia coli. El uso de la secuencia sintética de ADNc de MECP2 aumentó la producción de la proteína en *E. coli* de hasta 200-veces. (Fig. 3A). Probamos la entrega de las proteínas de fusión TAT y encontramos que la eficiencia más alta in vitro a 500 pmoles de proteínas recombinantes. Después de tres horas de incubación con la proteína TAT-MeCP2e2-EGFP, aproximadamente 40% de las células NIH3T3 mostraron la presencia de manchas fluorescentes similares a ampollas gruesas. La proteína estuvo sobre todo en el citosol (Fig. 4A a, b). Después de 12 horas, casi el 100% de las células fueron fluorescentes (Fig. 4A c, d) y la proteína se concentró en los núcleos de las células (Fig. 4A e). La transducción fue estable por 24 horas en las células transducidas (Fig. 4 B y C). Los experimentos utilizando la proteína EGFP sin un dominio de TAT como control no resultaron en ninguna absorción en las células (Fig. 4A f). Las proteínas recombinantes TAT

también fueron capaces de transducir fibroblastos humanos primarios (Fig. 4A g y h) y neuronas primarias a partir de cerebro de ratón (Fig. 4A i y j).

6. MeCP2 puede ser sustituida en fibroblastos derivados de un paciente con síndrome de RTT y en fibroblastos de Mecp2^{-/-} murina.

A continuación estudiamos la actividad biológica de las proteínas de fusión MeCP2 después de la entrega en células deficientes MeCP2. Detectamos una hiperacetilación de las histonas H3 y H4K16 en las líneas celulares monoclonales que expresan un alelo de MeCP2 mutado (T158M) en contraste con la línea celular que expresa el alelo del tipo salvaje (Fig 5 a). Una línea celular que expresa el alelo mutado fue tratada con 300 pmol de proteínas TAT-MeCP2e1 TAT-MeCP2e2, MeCP2, o TAT-EGFP durante 64 horas. Una reversión de la hiperacetilación de las histonas H3 y H4K16 fue observada solo después del tratamiento con ambas isoformas TAT-MeCP2 (Fig. 5 a y b). Hemos conseguido resultados similares dirigidos a los fibroblastos de ratones Mecp2^{-/-} (Fig. 5 c). Experimentos de coimmunoprecipitación en fibroblastos transducidos de ratones Mecp2^{-/-} directamente demostraron la recuperación de la histona deacetilasa 1 (HDAC1) por las isoformas TAT-MeCP2 (Fig. 7A). Estos resultados demuestran que las isoformas TAT-MeCP2 son capaces de rescatar los cambios bioquímicos causados por una pérdida de función de la MeCP2 endógena.

7. Estabilidad intracelular de las proteínas MeCP2-TAT

Para examinar la estabilidad y persistencia de la proteína transducida en las células, las células fueron incubadas por 2 horas con 1 nmol de TAT-MeCP2e1 y TAT-MeCP2e2 por separado. Luego fueron lavadas con medio y se incubaron con medio de cultivo nuevo para otro cultivo. Las células fueron cultivadas a intervalos de tiempo indicados y las proteínas fueron extraídas mediante la suspensión de 10⁷ células en 200 µl de solución reguladora de lisis celular (Tris-HCl 125mM pH 6.8, 2% de SDS, NaH₂PO₄ 50mM, 20% de glicerol, DTT 1mM, PMSF 1mM) y la incubación sobre hielo durante 20 min, la sonicación suavemente para fragmentar el ADN. El lisado fue centrifugado a 9000xg durante 10 min, 4°C, y la concentración total de la proteína del sobrenadante fue cuantificada utilizando el método Bradford y se almacenó a -80°C hasta su uso. 100 µg de las muestras de proteína fueron calentados a 75°C con 4 X SDS solución reguladora de carga (Tris-HCl 1M pH-6.8, 2% de SDS, 0.02% de azul de bromofenol, beta-2-mercaptoetanol 5mM, 5% de glicerol) y se resolvieron en 4-20% de geles de proteínas Precise (Pierce Biotechnology, USA). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa optimizada para transferencia de proteínas (Amersham Biosciences, GE Healthcare). La membrana fue tratada con potenciador de señal Western Blot (Pierce Biotechnology, USA) siguiendo el protocolo del proveedor. La membrana fue bloqueada con 5% de leche descremada en PBS con 0.05% de Tween-20 (PBS-T) durante 1 hr. A continuación la membrana se incubó por separado con anticuerpo de MeCP2 que contiene solución bloqueadora (Upstate, USA) diluida 1:2,000 durante la noche a 4°C. Anti-alfa tubulina monoclonal de ratón (Sigma, Taufkirchen, Germany) diluido 1:4,000 fue utilizado como un control positivo. La membrana fue lavada 3 veces durante 5 minutos cada vez con PBS-T y luego se incubó con la misma solución reguladora que contiene los respectivos anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina (Sigma) diluida 1:30,000 por 1hr. El exceso de anticuerpos fue lavado completamente con PBST tres veces y se desarrolló con BCIP/NBT (Carl-Roth, Germany). La concentración intracelular de la proteína transducida permaneció alta por 24 horas, después de lo cual el nivel decayó a menos de un cuarto de la concentración inicial durante las próximas 24 horas (Fig. 4B y C).

8. Análisis Western Blot

8.1 Extractos de proteínas de cultivos celulares: El contenido de proteína total a partir de las líneas celulares y los cultivos celulares de fibroblastos primarios fue extraído mediante la suspensión de 10⁷ células en 200 µl de solución reguladora de lisis celular y se incuban sobre hielo durante 20 min, se sonicar suavemente para fragmentar el ADN. El lisado fue centrifugado a 9000xg durante 10 min, 4°C. El Western Blot fue hecho como se describe anteriormente. La membrana se incubó durante la noche a 4°C por separado con solución bloqueadora que contiene anticuerpos policlonales de conejo contra histona-H3 a una dilución de 1:4,000, histona H3 acetilada, histona H4K16 acetilada (Upstate) diluida 1:10,000 y 1:500 respectivamente. El anti-alfa tubulina monoclonal de ratón (Sigma) diluido 1:4,000 fue utilizada como un control positivo.

8.2 Extractos de proteínas de tejidos: Los ratones fueron inyectados con 100µg/g (peso corporal) de TAT-MeCP2-EGFP, TAT-MeCP2 y MeCP2. Después de 20 horas los ratones fueron sacrificados. El cerebro fue retirado y lavado en PBS frío. El cerebro luego fue homogeneizado en solución reguladora de extracción (Tris-Cl 62mM pH6.8, 2% de SDS, Mercaptoetanol 5mM, NaCl 0.15mM), 5X cóctel inhibidor de la proteasa (Sigma) y se sonica suavemente. El lisado fue peletizado a 15,000xg durante 15 min, 4°C. Cincuenta µg fueron empleados para realizar el Western blotting como se menciona anteriormente utilizando un anticuerpo policlonal anti-MeCP2 (Upstate). En experimentos independientes, se inyectaron los ratones con 100 µg/g (peso corporal) de TAT-EGFP y de TATMeCP2e2-EGFP. La inmunotransferencia fue hecha sobre el extracto de proteína total a partir del cerebro, hígado, riñón y corazón utilizando el anticuerpo anti GFP (Sigma). La densidad de las señales Western Blot fue cuantificada mediante el Olympus S-100 Imaging Densitometer. Las relaciones de intensidad de banda fueron medidas utilizando la señal alfa-tubulina como un control interno.

9. Inmunohistoquímica

Los ratones inyectados i.p. con TAT-MeCP2e2-EGFP y EGFP fueron perfundidos transcárdialmente con paraformaldehído frío al 4% (PFA) en solución reguladora de PBS 20 horas después de la inyección. Los cerebros fueron retirados y después se fijaron con (PFA 4%) durante 4 horas, fueron crioprottegidos con 30% de sacarosa a 4°C y se almacenaron a -80°C. La inmunohistoquímica se realizó sobre criosecciones utilizando anticuerpo anti-GFP de conejo (Sigma). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio Olympus BX60 (Olympus Optical Co. LTD, Japan). Experimentos análogos se llevaron a cabo en cortes fijados en formalina de ratones *MeCP2^{-/-}* inyectados durante 20 días con TATMeCP2e1 y e2 (20 µg/g de peso corporal, cada segundo día). Los cortes fueron probados con un anticuerpo policlonal anti-MeCP2e2 de conejo. Este anticuerpo ha sido establecido en conejo utilizando la proteína MeCP2e2 recombinante humana.

10. Terapia de proteínas in vitro e in vivo

10.1 Terapia de proteína in vitro

Hemos probado que las proteínas recombinantes en líneas celulares monoalélicas que expresan la mutación T158M MeCP2. Estas células muestran una hiperacetilación de H3 y H4K16. La incubación con ambas isoformas TAT-MeCP2e1 y e2 revirtió la hiperacetilación patológica en un nivel similar a las líneas celulares de tipo salvaje (Fig. 5).

10.2 Entrega eficiente de las proteínas MeCP2 en el cerebro

Luego se abordó la cuestión de entrega de proteína in vivo en ratones de tipo salvaje NMRI que reciben una inyección intraperitoneal única de proteína TAT-MeCP2e2-EGFP, TAT-EGFP, o EGFP (60 µg/g de peso corporal en PBS/10% de glicerol o HEPES 20mM/10% de glicerol). Los ratones inyectados con TAT-EGFP y EGFP no desarrollaron ningún efecto secundario aparente. Sin embargo, los ratones inyectados con isoforma TAT-MeCP2e2-EGFP mostraron una hipomovilidad transitoria de las extremidades traseras, que desaparece una a dos horas después de la inyección. El análisis Western Blot del cerebro, hígado y riñón reveló la absorción de proteínas TAT-EGFP y TAT-MeCP2-EGFP 20 horas después de la inyección (los datos no se muestran). En experimentos análogos, los ratones fueron inyectados en la dosificación de 100 µg/g de peso corporal independientemente con las proteínas TAT-MeCP2e2, TAT-MeCP2e2-EGFP y MeCP2e2. El análisis western blot reveló la presencia de las proteínas recombinantes TAT en los extractos de cerebro de los ratones sacrificados 20 horas después de la inyección (Fig. 6 a). La inmunohistoquímica de cortes del cerebro utilizando un anticuerpo anti-EGFP reveló la presencia de la proteína TAT-MeCP2e2-EGFP en neuronas piramidales del neocórtex, en las neuronas de células granulares de cerebelo, y en las meninges (Fig. 6 b). Sin embargo, aumentando la dosificación de ambas isoformas TATMeCP2 hasta 130 µg/g de peso corporal, observamos la aparición de efectos secundarios graves tales como síntomas similares a las convulsiones dentro de los 10 a 20 minutos después de la inyección que dan lugar a la parálisis completa de las cuatro extremidades. Como consecuencia, dos de cada 5 ratones NMRI inyectados murieron dentro de 2 horas. En contraste, los ratones inyectados con proteínas TAT-EGFP y MeCP2 no presentaron ningún efecto secundario serio en cualquier dosificación probada (Tabla 1, a continuación). Estos datos indican que la entrega exitosa de proteínas MeCP2 a los cerebros es en principio posible, sin embargo, la dosificación tiene que ser estrechamente controlada.

En la siguiente serie de experimentos, determinamos la entrega de proteínas de fusión MeCP2 en el cerebro de ratones deficientes de *MeCP2*, un modelo de ratón de Rett creado en el laboratorio de A. Bird (Chen et al. 2001, Nat Genet, 27 (3):327-31). Los animales fueron adquiridos del Jackson Laboratory, USA (cepa B6.129P2(C)-*MeCP2tm1.1Bird/J*), y otros cultivos fueron hechos en las instalaciones de animales del Institute of Human Genetics, Göttingen. Los ratones control fueron tomados de las instalaciones de animales mencionadas anteriormente. Dos ratones *MeCP2^{-/-}* fueron inyectados i.p. durante 20 días con 20 µg/g de peso corporal cada segundo día con TAT-MeCP2e1 y TAT-MeCP2e2, respectivamente. Al igual que en los ratones del tipo salvaje, pudimos detectar las proteínas TAT-MeCP2 por inmunohistoquímica en cortes del cerebro de ratones *MeCP2^{-/-}* (Fig. 6 c). Estos experimentos demuestran que las proteínas de fusión TAT cruzan la barrera del hematoencefálica y llega al cerebro. En el régimen terapéutico de 20 µg/g de peso corporal cada segundo día, no se observó ningún síntoma neurológico diferido o inmediato o muerte repentina de los ratones *MeCP2^{-/-}* tratados. La inyección de solución reguladora por administración intraperitoneal fue Hepes 20 mM, CaCl₂ 100µM, NaCl 300 mM y 10% de glicerol.

10.3 Terapia de proteína in vivo: Los efectos terapéuticos de las isoformas de TAT-MeCP2 recombinante en un modelo de ratón del síndrome de Rett

A continuación se probó si las proteínas MeCP2 administradas in vivo son funcionalmente activas en el cerebro de ratones deficientes de MeCP2. Inyectamos diariamente i.p. TAT-MeCP2e1 o TAT-MeCP2e2 en ratones *MeCP2^{-/-}* a una dosificación de 20 o 30 µg/g, respectivamente. A estas dosificaciones ningún efecto secundario clínico fue aparente. Los animales fueron sacrificados después de dos semanas de terapia y los extractos de proteína total del cerebro fueron analizados por Western Blot. La inyección de 20 o 30 µg/g de proteína redujo notablemente el nivel de acetilación de H4K16 (Fig 7 B y C). Después de haber demostrado la actividad bioquímica de las proteínas administradas in vivo, hemos querido evaluar si la terapia podría rescatar el fenotipo de ratones con deficiencia de MeCP2. Se inyectaron ratones *MeCP2^{-/-}* i.p. con 20 µg/g de peso corporal utilizando ambas isoformas TAT-MeCP2.

Cinco ratones *Mecp2^{-/-}* recibieron la TAT-MeCP2e1 y cinco la TAT-MeCP2e2. Una ratón *Mecp2^{-/-}* fue inyectado con PBS, un ratón con MeCP2 y 4 ratones recibieron la proteína TAT-EGFP en la misma dosificación. Once ratones *Mecp2^{-/-}* no fueron tratados y sirvieron como controles adicionales. El tratamiento inició en el día postnatal 30. La supervivencia media de los ratones *Mecp2^{-/-}* inyectados con MeCP2 (n=10) fue 88.7 días (92.6 para la isoforma e1 y 84.8 para la e2, respectivamente), de ratones *Mecp2^{-/-}* no tratados 55.6 días y los de inyección de simulacro 57.0 días (Tabla 2 a continuación). Esto representa un aumento de la vida útil de casi 66% (TATMeCP2e1) y 53% (TAT-MeCP2e2) de los ratones tratados versus los no tratados. La prolongación de supervivencia es estadísticamente muy significativa (Fig. 8 a y b). Un ratón macho del tipo salvaje tratado por tres meses con 20 µg/g de MeCP2 no desarrolló ningún efecto secundario clínico e incluso estuvo saludable a los 300 días de tratamiento.

Tabla 1. Efecto de alta dosificación de proteínas recombinantes en ratones de tipo salvaje

	<i>MeCP2e1</i> n=3	<i>TAT-MeCP2e2</i> n=3	<i>TAT-MeCP2e2-EGFP</i> n=3	<i>TAT-EGFPa</i> n=5	<i>EGFPa</i> n=3
Una hora después de la inyección	Normal	Espasmo y parálisis de extremidades traseras	Espasmo y parálisis de extremidades traseras	Malestar físico Normal Inespecífico	Normal
Veinticuatro horas después de la inyección	Normal	Ligeramente recuperado *	Ligeramente recuperado*	Normal	Normal
a. Todas las proteínas fueron inyectadas en la dosificación de 130 µg/g de peso corporal. Las proteínas TAT-EGFP y EGFP tenían, debido al peso molecular inferior, aproximadamente el doble número de moléculas que las proteínas MeCP2-TAT.					
* En 2 experimentos los ratones murieron. Una dosificación de 30 µg/g de proteínas recombinantes no tuvieron ningún efecto particular en los ratones sin tener en cuenta cual proteína fue inyectada.					

Tabla 2. Supervivencia en días de ratones *Mecp2^{-/-}* inyectados y control

<i>Sin inyectar</i>	<i>Inyección simulacro</i>	<i>TATMeCP2e1</i>	<i>TAT MeCP2e2</i>
45	52 (a)	71	70
46	61 (b) 76 80		
47	51 (c) 80 83		
52	56 (c) 108 (d) 85		
54	57 (c) 128 106		
56	65 (c)		
56			
59			
62			
65			
69			
Media	Media	Media	Media
55.5	57	92.6	84.8
a. Inyectado con PBS			
b. Inyectado con MeCP2			
c. inyectado con TAT-EGFP			
d. Este animal estaba aún móvil y activo pero fue sacrificado debido a una muy severa y no tratable infección de la piel que causa un comportamiento automutilante de mordida.			

11. la administración de la proteína TAT- MeCP2 rescata daño neuronal in vivo. Se ha descrito que la delección de MeCP2 en neuronas de CNS postnatales causa graves cambios neuropatológicos, tales como alteraciones en procesos dendríticos y contracción neuronal (Armstrong DD. 2002., Ment Retard Dev Disabil ResRev 8:72-6). Con el fin de investigar si el tratamiento con proteína TAT-MeCP2 también protege las neuronas de los cambios morfológicos, neuronas del hipocampo y del cerebelo fueron examinadas histológicamente. El tamaño neuronal se evaluó cuantitativamente en secciones teñidas con Nissl (Fig. 8c) en la región CA2 del hipocampo o en células de Purkinje del cerebelo teñidas con Calbindin. Las neuronas mutantes en el hipocampo fueron más pequeñas en tamaño y fueron más densas que las neuronas del tipo salvaje (Fig. 8c, 1 y 2). Considerablemente, los animales tratados con MeCP2 mostraron neuronas más grandes sin ningún cambio morfológico aparente (Fig. 8c 3). La cuantificación reveló que el tamaño neuronal no fue distinguible en neuronas del hipocampo tratado con TAT-MeCP2e1 en comparación con la de tipo salvaje, mientras que la isoforma MeCP2e2 no tuvo efecto en el tamaño neuronal (Fig. 8c 4). Las mediciones de neuronas corticales piramidales de la capa V en ratones con deficiencia de MeCP2 de 50 días de edad no mostraron diferencias con la situación del tipo salvaje. Además, las células de Purkinje del cerebelo fueron preservadas en ratones MeCP2^{+/y} y no mostraron anomalías morfológicas graves después del tratamiento con TAT-MeCP2 (los datos no se muestran). En conjunto, la reducción del tamaño neuronal en el hipocampo puede ser revertida mediante la aplicación de MeCP2e1.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Georg-August-Universität Göttingen

<120> Secuencia de MeCP2 Sintética para la Terapia de Sustitución de la Proteína

<130> K63999PC

<160> 54

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<212> 1494

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia optimizada de codón

<400> 1

```

atggctgctg ctgctgctgc tgctccgtcc ggtggtggtg gtggtggtga agaagaacgt      60
ctggaagaaa aatccgaaga ccaggacctg cagggtctga aagacaaacc gctgaaattc      120
aaaaaagtta aaaaagacaa aaaagaagaa aaagaaggta aacacgaacc ggttcagccg      180
tccgctcacc actccgctga accggctgaa gctggttaaag ctgaaacctc cgaagggttc      240
ggttccgctc cggctgttcc ggaagcttcc gttccccga aacagcgtcg ttccatcatc      300
cgtgaccgtg gtccgatgta cgacgacctg accctgccgg aaggttgga ccgtaaactg      360
aaacagcgta aatccggtcg ttccgctggt aaatacgacg tttacctgat caaccgcag      420
ggtaaagctt tccgttccaa agttgaactg atcgcttact tcgaaaaagt tggtagacacc      480
tccctggacc cgaacgactt cgacttcacc gttaccggtc gtggttcccc gtcccgctcg      540
gaacagaaac cgccgaaaaa accgaaatcc ccgaaagctc cgggtaccgg tcggtggtcg      600
ggcgtccga aaggttccgg taccaccggt ccgaaagctg ctacctccga aggtgttcag      660
gttaaactgt ttctggaaaa atccccgggt aaactgctgg ttaaaatgcc gttccagacc      720
tccccgggtg gtaaagctga aggtggtggt gctaccacct ccaccaggt tatggttatc      780

```

aaacgtccgg gtcgtaaacg taaagctgaa gctgacccgc aggctatccc gaaaaaacgt	840
ggtcgtaaac cggttccgt tgttgctgct gctgctgctg aagctaaaaa aaaagctggt	900
aaagaatcct ccatccgttc cgttcaggaa accgttctgc cgatcaaaaa acgtaaaacc	960
cgtgaaaccg tttccatcga agttaaagaa gttgttaaac cgctgctggt ttccaccctg	1020
ggtgaaaaat ccggtaaagg tctgaaaacc tgcaaattccc cgggtcgtaa atccaaagaa	1080
tcctccccga aaggctggtc ctctccgct tcctccccgc cgaaaaaaga acaccaaccac	1140
caccaccacc actccgaatc cccgaaagct ccggttccgc tgctgccgcc gctgccgccg	1200
ccgccgccgg aaccggaatc ctccgaagac ccgacctccc cgccggaacc gcaggacctg	1260
tcctcctccg tttgcaaaga agaaaaaatg ccgcgtgggt gttccctgga atccgaagggt	1320
tgcccgaaag aaccggctaa aaccagccg gctgttgcta ccgctgctac cgctgctgaa	1380
aaatacaaac accgtggtga aggtgaacgt aaagacatcg tttcctctc catgccgcgt	1440
ccgaaccgtg aagaaccggt tgactccgt accccggtta ccgaacgtgt ttcc	1494

<210> 2

<211> 1458

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia optimizada de codón

<400> 2

atggttgctg gtatgctggg tctgctgaa gaaaaatccg aagaccagga cctgcagggt	60
ctgaaagaca aaccgctgaa attcaaaaaa gtaaaaaaag acaaaaaaga agaaaaagaa	120
ggtaaacacg aaccggttca gccgtccgt caccactccg ctgaaccggc tgaagctggt	180
aaagctgaaa cctccgaagg ttccggttcc gctccggtg ttccggaagc ttccgcttcc	240
ccgaaacagc gtggttccat catccgtgac cgtgggtccga tgtacgacga cccgaccctg	300
ccggaagggt ggaccgtaa actgaaacag cgtaaattccg gtcgttccgc tggtaaatac	360
gacgtttacc tgatcaacct gcagggtaaa gctttccgtt ccaaagttga actgatcgt	420
taattcgaaa aagttggtga cacctccctg gaccogaacg acttcgactt caccgttacc	480
ggtcgtgggt ccccgctccg tcgtgaacag aaaccgccga aaaaaccgaa atccccgaaa	540
gctccgggta ccggtcgtg tcgtggtcgt ccgaaagggt ccggtaccac ccgtccgaaa	600
gctgctacct ccgaagggtg tcagggtaaa cgtgttctgg aaaaatcccc gggtaaactg	660
ctgggttaaaa tgccgttcca gacctcccg ggtggtaaaag ctgaagggtg tgggtgctacc	720

```

acctccaccc aggttatggt tatcaaactg cccgggtcgta aacgtaaagc tgaagctgac 780
ccgcaggcta tcccgaaaaa acgtgggtcg aaaccggggt ccgttggtgc tgctgctgct 840
gctgaagcta aaaaaaaagc tgttaaagaa tcctccatcc gttccgttca ggaaaccggt 900
ctgccgatca aaaaacgtaa aaccctgtaa accgtttcca tcgaagttaa agaagttggt 960
aaaccgctgc tggttttccac cctgggtgaa aaatccggta aaggtctgaa aacctgcaaa 1020
tccccgggtc gtaaatacaa agaatactcc ccgaaagggtc gttcctcctc cgcttcctcc 1080
ccgccgaaaa aagaacacca ccaccaccac caccactccg aatccccgaa agctccgggt 1140
ccgtgctgc cgccgtgccc gccgccgccg ccggaaccgg aatcctccga agaccggacc 1200
tccccgccgg aaccgcagga cctgtcctcc tccgtttgca aagaagaaaa aatgccgcgt 1260
ggtggttccc tggaatccga cgggtgcccg aaagaaccgg ctaaaaccca gccggctggt 1320
gctaccgctg ctaccgctgc tgaaaaatac aaacaccgtg gtgaagggtga acgtaaagac 1380
atcgtttcct cctccatgcc gcgtccgaac cgtgaagaac cggttgactc ccgtaccccg 1440
gttaccgaac gtgtttcc 1458

```

<210> 3

<211> 810

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia optimizada de codón

<400> 3

```

atcacgaatt cctacggtcg taaaaaacgt cgtcagcgta ggccggccgca ggggtggtggt 60
atggttgctg gtatgctggg tctgcgtgaa gaaaaatccg aagaccagga cctgcagggt 120
ctgaaagaca aaccgctgaa attcaaaaaa gttaaaaaag acaaaaaaga agaaaaagaa 180
ggtaaacacg aaccggttca gccgtccgct caccactccg ctgaaccggc tgaagctggt 240
aaagctgaaa cctccgaagg ttccggttcc gctccggtg ttccggaagc ttccgcttcc 300
ccgaaacagc gtcgttccat catccgtgac cgtgggtccga tgtacgacga cccgaccctg 360
ccggaagggt ggacccgtaa actgaaacag cgtaaatacc gtcgttccgc tggtaaatac 420
gacgtttacc tgatcaaccc gcagggtaaa gctttccggt ccaaagttga actgatcgt 480
tacttcgaaa aagttggtga cacctccctg gaccogaacg acttcgactt caccgttacc 540
ggtcgtgggt ccccgctccc tcgtgaacag aaaccgccga aaaaaccgaa atccccgaaa 600
gctccgggta ccggtcgtgg tcgtggtcgt ccgaaagggt ccggtaccac ccgtccgaaa 660

```

gctgctacct ccgaagggtgt tcagggttaaa cgtgttcttg aaaaatcccc gggtaaactg 720
 ctgggttaaaa tgccgttcca gacctccccg ggtggttaaag ctgaagggtg tggtgctacc 780
 acctccaccc aggttatggt tatcaaactg 810

<210> 4

<211> 785

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia optimizada de codón

<400> 4

ccccccctgc taccacctcc acccagggtta tggttatcaa acgtccgggt cgtaaactgta 60
 aagctgaagc tgacccgcag gctatcccg aaaaactggt tcgtaaaccg ggttccgttg 120
 ttgctgctgc tgctgctgaa gctaaaaaaa aagctgttaa agaactctcc atccgttccg 180
 ttcaggaaac cgttctgccc atcaaaaaac gtaaaacccg tgaaaccgtt tccatcgaag 240
 ttaaagaagt tgtaaaccg ctgctggttt ccacctggg tgaaaaatcc ggtaaaggctc 300
 tgaaaacctg caaatccccg ggtcgtaa atccaaagaatc ctccccgaaa ggtcgttcct 360
 cctccgcttc ctccccgccg aaaaaagaac accaccacca ccaccaccac tccgaatccc 420
 cgaaagctcc ggttccgctg ctgccgccgc tgcgccgccg gccgcgggaa ccggaatcct 480
 ccgaagacct gacctccccg ccggaaccgc aggacctgtc ctctccgtt tgcaaagaag 540
 aaaaaatgcc gcgtggtggt tccctggaat ccgacggttg ccgaaagaa ccggctaaaa 600
 cccagccggc tgttgctacc gctgctaccg ctgctgaaaa atacaaacac cgtggtgaag 660
 gtgaacgtaa agacatcggt tctctctcca tgccgcgtcc gaacogtgaa gaaccggttg 720
 actcccgtag ccggttacc gaacgtgttt ccggtggtct gtacaaatcc ggttggtccc 780
 ccccc 785

10 <210> 5

<211> 114

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> secuencia artificial

<400> 5

atgattacga attcatatgg acgtaagaag cgtcgtcaac gtaggcggcc gcaatcta ga 60
 ctcgagccca tggccagatc ttccggatgg agccacccgc agttcgaaaa ataa 114

<210> 6

<211> 90
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> secuencia artificial
 <400> 6
 atggcatatg caggtaccta tgetcgcgcc gotgcccgcc aggctcgcgc cggtagccggt 60
 ggtggcctcg agcaccacca ccaccaccac 90
 <210> 7
 <211> 60
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 7
 15 agctaagaag cgtcgtcaac gtaggcggcc gcaatctaga ctcgagccca tggccagatc 60
 <210> 8
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> cebador
 <400> 8
 ttcgaactgc ggggggctcc atccggaaga tctggccatg ggctcgagtc tagattgcgg 60
 <210> 9
 25 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 9
 aaacccgaat tcatatggac gtaagaagcg tcg 33
 <210> 10
 <211> 33
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador
 <400> 10 aaaccaagc tttatttt cgaactgcgg gtg 33
 <210> 11
 5 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 10 <400> 11
 cccgcggccg caaggcggcg gcatggtagc tgggatgta ggg 43
 <210> 12
 <211> 43
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 12 43 gggcaccatg gcgccgccgc cgtaactct ctcggttcac ggg 43
 <210> 13
 20 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 13
 gtcgttccat catccgtgac cgtggtccga tgtaogacga cccgaccctg ccggaagggtt 60
 ggacccgtaa actgaaacag cgtaaatccg gtcgttccgc 100
 <210> 14
 <211> 100
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 14
 cgtaaatccg gtcgttccgc tggtaaatac gacgtttacc tgatcaaccc gcagggtaaa 60
 gctttccggt ccaaagttga actgatcgct tacttcgaaa 100

<210> 15
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> cebador
 <400> 15
 tgaagctggt aaagctgaaa cctccgaagg ttccggttcc gtcocggctg ttccggaagc 60
 ttccggttcc ccgaaacagc gtcgttccat catccgtgac 100
 10 <210> 16
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> cebador
 <400> 16
 gttaaaaaag acaaaaaaga agaaaaagaa ggtaaacacg aaccggttca gccgtccgct 60
 caccactccg ctgaaccggc tgaagctggt aaagctgaaa 100
 <210> 17
 <211> 100
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 17
 tctgcggtgaa gaaaaatccg aagaccagga cctgcagggc ctgaaagaca aaccgctgaa 60
 attcaaaaaa gttaaaaaag acaaaaaaga agaaaaagaa 100
 25 <210> 18
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <400> 18

atcacgaatt cctacggtcg taaaaaacgt cgtcagcgtc gtcgtccgca gggtagtggt 60
atggttgctg gtatgctggg tctgctgaa gaaaaatccg 100

<210> 19
<211> 100
<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 19

actgatcgt tacttcgaaa aagttggtga cacctccctg gacccgaacg acttcgactt 60
caccgttacc ggtcgtggtt ccccgctccg tcgtgaacag 100

10 <210> 20
<211> 100
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

15 <223> cebador
<400> 20

ccccgtccg tcgtgaacag aaaccgccga aaaaaccgaa atccccgaaa gtcccgggta 60
ccggtcgtgg tcgtggtcgt ccgaaagggt ccggtaccac 100

<210> 21
<211> 100

20 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 21

ccgaaagggt ccggtaccac ccgtccgaaa gctgctacct ccgaagggtg tcagggtaaa 60
cgtgttctgg aaaaatcccc gggtaaactg ctggttaaaa 100

25 <210> 22
<211> 100
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> cebador

<400> 22

gggtaaactg ctgggttaaaa tgccgttcca gacctccccg ggtggtaaag ctgaaggtgg 60

tggtgctacc acctccaccc aggttatggt tatcaaactg 100

<210> 23

<211> 123

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 23

gaaaaatccg gtaaagggtct gaaaacctgc aaatccccgg gtcgtaaatc caaagaatcc 60

tccccgaaaag gtcgttccctc ctccgcttcc tccccgccga aaaaagaaca ccaccaccac 120

10 cac 123

<210> 24

<211> 123

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> cebador

<400> 24

caggaaaccg ttctgccgat caaaaaacgt aaaacccgtg aaaccgtttc catcgaagtt 60

aaagaagttg ttaaaccgct gctggtttcc accctgggtg aaaaatccgg taaaggctctg 120

aaa 123

<210> 25

20 <211> 122

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

25 <400> 25

tccccgaaaaa acgtggctcg aaaccggggt ccgttggtgc tgctgctgct gctgaagcta 60

aaaaaaagct gttaaagaat cctccatccg ttccgttcag gaaaccgttc tgccgatcaa 120

aa 122

<210> 26

	<211> 96		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
5	<223> cebador		
	<400> 26		
	cacctccacc caggttatgg ttatcaaacg tccgggtcgt aaacgtaaag ctgaagctga	60	
	cccgagggt atcccgaaaa aacgtggtcg taaacc	96	
	<210> 27		
	<211> 123		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 27		
	gcggggaggt cgggtcttcg gaggattccg gttccggcgg cggcggcggc agcggcggca	60	
	gcagcggaac cggagctttc ggggattcgg agtggtggtg gtggtggtgg tgttcttttt	120	
15	tcg	123	
	<210> 28		
	<211> 123		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
20	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 28		
	tttagccggt tctttcgggc aaccgtcgga ttccaggga ccaccaacgc gcattttttc	60	
	ttctttgcaa acggaggagg acaggtcctg cggttccggc ggggagggtcg ggtcttcgga	120	
	gga	123	
	<210> 29		
25	<211> 123		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
30	<400> 29		

cgcgccatgg aggaggaaac gatgtcttta cggtcacctt caccacggtg tttgtatttt 60
 tcagcagcgg tagcagcgg agcaacagcc ggctggggtt tagccgggtt ttcggggcaa 120
 ccg 123

<210> 30
 <211> 98
 <212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 30

ggattttgtac agaccacgg aaacacgttc ggtaaccggg gtacgggagt caaccggttc 60
 ttcacggttc ggacgcggca tggaggagga aacgatgt 98

10 <210> 31
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

15 <223> cebador
 <400> 31 cccctgtgta caggccgccc ctaactctct cgg 33

<210> 32
 <211> 25
 <212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 32

ggctgcccc aggagccagc taaga 25

25 <210> 33
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

30 <223> cebador
 <400> 33

acgtaagaag cgctgtcaac gtaggcggcc gcaggg 36

<210> 34
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> cebador
 <400> 34
 caacgtaggc ggccgcaggg tgggtggtgct gctgctgctg ctgctgctcc gtccggtggt 60
 ggtggtggtg gtgaagaaga acgtctggaa gaaaaatccg 100
 <210> 35
 10 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 15 <400> 35
 ttcagcgggtt tgtctttcag accctgcagg tcctggtctt cggatttttc ttccagacgt 60
 tcttc 65
 <210> 36
 <211> 40
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 36
 cccccgcac atggagttgc tggatgctg ggtctgcgtg 40
 25 <210> 37
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> cebador
 <400> 37
 cccccccctt gtacagaccg ctaactctct cggtcacggg cgt 43
 <210> 38
 <211> 39

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 5 <400> 38
 cccccctcat gaagtatgga cgtaagaagc gtcgtcaac 39
 <210> 39
 <211> 44
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 39
 ggggggctcg aggccgcctt ttcgaactg cgggtggctc catc 44
 15 <210> 40
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> cebador
 <400> 40
 catatgcagg tacctatgct cgcgccgctg cccgccaggc tcgcgccggt acc 53
 <210> 41
 <211> 30
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 41 gccaccaccg gtaccggcgc gagcctggcg 30
 30 <210> 42
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> cebador
 <400> 42
 ccccccattgg catatgcagg tacctatgca cgcgccg 37

<210> 43
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> cebador
 <400> 43
 ttccctcga ggccaccacc ggtaccggcg c 31
 <210> 44
 10 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 15 <400> 44
 cccccccat atggacacca ccatcaccac catccacca tg 42
 <210> 45
 <211> 25
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 45
 ctgcacgggc tcatgcttgc cctct 25
 25 <210> 46
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> cebador
 <400> 46
 ctcgagtgag atccggctgc taacaaag 28
 <210> 47
 <211> 27
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> cebador
 <400> 47
 ggactccaac gtcaaagggc gaaaaac 27
 <210> 48
 5 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 10 <400> 48
 cagaagacca ggacctccag ggcc 24
 <210> 49
 <211> 23
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 49
 ctctcgggct caggtggagg tgg 23
 20 <210> 50
 <211> 1539
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia optimizada de codón
 <400> 50

tatggacgta	agaagcgtagg	tcaacgtagg	cggccgcagg	gtggtggtgc	tgctgctgct	60
gctgctgctc	cgctccggtgg	tggtggtggt	ggtgaagaag	aacgtctgga	agaaaaatcc	120
gaagaccagg	acctgcaggg	tctgaaagac	aaaccgctga	aattcaaaaa	agttaaaaaa	180
gacaaaaaag	aagaaaaaga	aggtaaacac	gaaccggttc	agccgtccgc	tcaccactcc	240
gctgaaccgg	ctgaagctgg	taaagctgaa	acctccgaag	gttccggttc	cgctccggct	300
gttccggaag	cttccgcttc	cccgaaacag	cgctcgtcca	tcacccgtga	ccgtggtccg	360
atgtacgacg	acccgaccct	gccggaaggt	tggaccgcta	aactgaaaca	gcgtaaatcc	420
ggctcgttccg	ctggtaaata	cgacgtttac	ctgatcaacc	cgcagggtaa	agctttccgt	480
tccaaagtgtg	aactgatcgc	ttacttcgaa	aaagttggtg	acacctccct	ggaccggaac	540
gacttcgact	tcaccgttac	cggctcgtgg	tccccgtccc	gtcgtgaaca	gaaaccgccg	600
aaaaaaccca	aatccccgaa	agctccgggt	accggtcgtg	gtcgtggtcg	tccgaaaggt	660
tccggtacca	cccgccgaa	agctcgtacc	tccgaaggtg	ttcagggtta	acgtgttctg	720
gaaaaatccc	cgggtaaact	gctggttaaa	atgccgttcc	agacctcccc	gggtggtaaa	780
gctgaaggtg	gtggtgctac	cacctccacc	caggttatgg	ttatcaaacg	tccgggtcgt	840

aaacgtaaag	ctgaagctga	cccgcaggt	atccccgaaa	aacgtggtcg	taaaccgggt	900
tcogttgttg	ctgctgctgc	tgctgaagct	aaaaaaaaag	ctgttaaaga	atcctccatc	960
cgttccgttc	aggaaaccgt	tctgcgatc	aaaaaacgta	aaaccgctga	aaccgtttcc	1020
atcgaagtta	aagaagttgt	taaaccgctg	ctggtttcca	ccctgggtga	aaaatccggt	1080
aaaggtctga	aaacctgcaa	atccccgggt	cgtaaatecca	aagaatcctc	cccgaaggt	1140
cgttcctcct	ccgcctcctc	cccgccgaaa	aaagaacacc	accaccacca	ccaccactcc	1200
gaatccccga	aagctccggt	tccgctgctg	ccgccgctgc	cgcgccgcc	gccggaaccg	1260
gaatcctcog	aagaccgcac	ctccccgccg	gaaccgcagg	acctgtcctc	ctccgtttgc	1320
aaagaagaaa	aatgccgcg	tggtggttcc	ctggaatccg	acggttgccc	gaaagaaccg	1380
gctaaaaccc	agccggtgtg	tgctaccgct	gctaccgctg	ctgaaaaata	caaacaccgt	1440
ggtgaaggtg	aacgtaaaga	catcgtttcc	tcctccatgc	cgcgtccgaa	ccgtgaagaa	1500
ccggttgact	cccgtacccc	ggttaccgaa	cgtgtttcc			1539

<210> 51

<211> 1506

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia optimizada de codón

<400> 51

tatggacgta agaagcgtcg tcaacgtagg cggccgcagg gtggtggtat ggttgctggt	60
atgctggggtc tgcgtgaaga aaaatccgaa gaccaggacc tgcagggtct gaaagacaaa	120
ccgctgaaat tcaaaaaagt taaaaaagac aaaaaagaag aaaaagaagg taaacacgaa	180
ccggttcagc cgctccgctca ccactccgct gaaccggctg aagctggtaa agctgaaacc	240
tccgaagggtt ccggttccgc tccggctgtt ccggaagctt ccgcttcccc gaaacagcgt	300
cgttccatca tccgtgaccg tgggtccgatg tacgacgacc cgaccctgcc ggaagggttg	360
acccgtaaac tgaaacagcg taaatccggt cgttccgctg gtaaatacga cgtttacctg	420
atcaaccgcg agggtaaagc tttccgttcc aaagttgaac tgatcgctta cttcgaaaaa	480
gttggtgaca cctccctgga ccggaacgac ttcgacttca ccggtaccgg tcggtggttcc	540
ccgtcccgtc gtgaacagaa accgccgaaa aaaccgaaat ccccgaaagc tccgggtacc	600
ggtcgtgggtc gtgggtcgctc gaaagggttcc ggtaccaccc gtccgaaagc tgctacctcc	660
gaagggtgtc aggttaaacg tgttctggaa aaatccccgg gtaaactgct ggttaaaatg	720

ccgttccaga cctccccggg tggtaaagct gaagggtggtg gtgctaccac ctccaccag	780
gttatgggta tcaaacgtcc gggtcgtaaa cgtaaagctg aagctgaccc gcaggctatc	840
ccgaaaaaac gtgggtcgtaa accgggttcc gttggtgctg ctgctgctgc tgaagctaaa	900
aaaaaagctg ttaaagaatc ctccatccgt tccgttcagg aaaccgttct gccgatcaaa	960
aaacgtaaaa cccgtgaaac cgtttccatc gaagttaaag aagttggtta accgctgctg	1020
gtttccaccc tgggtgaaaa atccggtaaa ggtctgaaaa cctgcaaata cccgggtcgt	1080
aatccaaag aatcctcccc gaaaggctgt tctcctccg catcctcccc gccgaaaaa	1140
gaacaccacc accaccacca ccactccgaa tccccgaaag ctccggttcc gctgctgccg	1200
ccgctgccgc cgccgccgcc ggaaccggaa tcctccgaag acccgacctc cccgccggaa	1260
ccgcaggacc tgtcctcctc cgtttgcaaa gaagaaaaaa tgccgcgtgg tggttccctg	1320
gaatccgacg gttgcccgaa agaaccggct aaaaccagc cggctgttgc taccgctgct	1380
accgctgctg aaaaatacaa acaccgtgggt gaagggtgaac gtaaagacat cgtttccctc	1440
tccatgccgc gtccgaaccg tgaagaaccg gttgactccc gtaccccggt taccgaacgt	1500
gtttcc	1506

<210> 52

5 <211> 513

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> proteína de fusión

<400> 52

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu
20 25 30

Glu Glu Arg Leu Glu Glu Lys Ser Glu Asp Gln Asp Leu Gln Gly Leu
35 40 45

Lys Asp Lys Pro Leu Lys Phe Lys Lys Val Lys Lys Asp Lys Lys Glu
50 55 60

Glu Lys Glu Gly Lys His Glu Pro Val Gln Pro Ser Ala His His Ser
65 70 75 80

Ala Glu Pro Ala Glu Ala Gly Lys Ala Glu Thr Ser Glu Gly Ser Gly
 85 90 95
 Ser Ala Pro Ala Val Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Lys Gln Arg Arg
 100 105 110
 Ser Ile Ile Arg Asp Arg Gly Pro Met Tyr Asp Asp Pro Thr Leu Pro
 115 120 125
 Glu Gly Trp Thr Arg Lys Leu Lys Gln Arg Lys Ser Gly Arg Ser Ala
 130 135 140
 Gly Lys Tyr Asp Val Tyr Leu Ile Asn Pro Gln Gly Lys Ala Phe Arg
 145 150 155 160
 Ser Lys Val Glu Leu Ile Ala Tyr Phe Glu Lys Val Gly Asp Thr Ser
 165 170 175
 Leu Asp Pro Asn Asp Phe Asp Phe Thr Val Thr Gly Arg Gly Ser Pro
 180 185 190
 Ser Arg Arg Glu Gln Lys Pro Pro Lys Lys Pro Lys Ser Pro Lys Ala
 195 200 205
 Pro Gly Thr Gly Arg Gly Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Gly Thr Thr
 210 215 220
 Arg Pro Lys Ala Ala Thr Ser Glu Gly Val Gln Val Lys Arg Val Leu
 225 230 235 240
 Glu Lys Ser Pro Gly Lys Leu Leu Val Lys Met Pro Phe Gln Thr Ser
 245 250 255
 Pro Gly Gly Lys Ala Glu Gly Gly Gly Ala Thr Thr Ser Thr Gln Val
 260 265 270
 Met Val Ile Lys Arg Pro Gly Arg Lys Arg Lys Ala Glu Ala Asp Pro
 275 280 285
 Gln Ala Ile Pro Lys Lys Arg Gly Arg Lys Pro Gly Ser Val Val Ala
 290 295 300
 Ala Ala Ala Ala Glu Ala Lys Lys Lys Ala Val Lys Glu Ser Ser Ile
 305 310 315 320
 Arg Ser Val Gln Glu Thr Val Leu Pro Ile Lys Lys Arg Lys Thr Arg
 325 330 335

Glu Thr Val Ser Ile Glu Val Lys Glu Val Val Lys Pro Leu Leu Val
340 345 350

Ser Thr Leu Gly Glu Lys Ser Gly Lys Gly Leu Lys Thr Cys Lys Ser
355 360 365

Pro Gly Arg Lys Ser Lys Glu Ser Ser Pro Lys Gly Arg Ser Ser Ser
370 375 380

Ala Ser Ser Pro Pro Lys Lys Glu His His His His His His His Ser
385 390 395 400

Glu Ser Pro Lys Ala Pro Val Pro Leu Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro
405 410 415

Pro Pro Glu Pro Glu Ser Ser Glu Asp Pro Thr Ser Pro Pro Glu Pro
420 425 430

Gln Asp Leu Ser Ser Ser Val Cys Lys Glu Glu Lys Met Pro Arg Gly
435 440 445

Gly Ser Leu Glu Ser Asp Gly Cys Pro Lys Glu Pro Ala Lys Thr Gln
450 455 460

Pro Ala Val Ala Thr Ala Ala Thr Ala Ala Glu Lys Tyr Lys His Arg
465 470 475 480

Gly Glu Gly Glu Arg Lys Asp Ile Val Ser Ser Ser Met Pro Arg Pro
485 490 495

Asn Arg Glu Glu Pro Val Asp Ser Arg Thr Pro Val Thr Glu Arg Val
500 505 510

Ser

<210> 53

<211> 502

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> proteína de fusión

<400> 53

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

Thr Ser Thr Gln Val Met Val Ile Lys Arg Pro Gly Arg Lys Arg Lys
260 265 270

Ala Glu Ala Asp Pro Gln Ala Ile Pro Lys Lys Arg Gly Arg Lys Pro
275 280 285

Gly Ser Val Val Ala Ala Ala Ala Ala Glu Ala Lys Lys Lys Ala Val
290 295 300

Lys Glu Ser Ser Ile Arg Ser Val Gln Glu Thr Val Leu Pro Ile Lys
305 310 315 320

Lys Arg Lys Thr Arg Glu Thr Val Ser Ile Glu Val Lys Glu Val Val
325 330 335

Lys Pro Leu Leu Val Ser Thr Leu Gly Glu Lys Ser Gly Lys Gly Leu
340 345 350

Lys Thr Cys Lys Ser Pro Gly Arg Lys Ser Lys Glu Ser Ser Pro Lys
355 360 365

Gly Arg Ser Ser Ser Ala Ser Ser Pro Pro Lys Lys Glu His His His
370 375 380

His His His His Ser Glu Ser Pro Lys Ala Pro Val Pro Leu Leu Pro
385 390 395 400

Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Glu Pro Glu Ser Ser Glu Asp Pro Thr
405 410 415

Ser Pro Pro Glu Pro Gln Asp Leu Ser Ser Ser Val Cys Lys Glu Glu
420 425 430

Lys Met Pro Arg Gly Gly Ser Leu Glu Ser Asp Gly Cys Pro Lys Glu
435 440 445

Pro Ala Lys Thr Gln Pro Ala Val Ala Thr Ala Ala Thr Ala Ala Glu
450 455 460

Lys Tyr Lys His Arg Gly Glu Gly Glu Arg Lys Asp Ile Val Ser Ser
465 470 475 480

Ser Met Pro Arg Pro Asn Arg Glu Glu Pro Val Asp Ser Arg Thr Pro
485 490 495

Val Thr Glu Arg Val Ser
500

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> dominio de transducción de la proteína

5 <400> 54

Tyr	Gly	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg
1				5					10	

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende (i) una proteína MeCP2 o fragmento biológicamente activo o un derivado de dicha proteína o fragmento, y (ii) un dominio de transducción de la proteína, en donde la proteína MeCP2 se fusiona con el dominio de transducción de la proteína,
 5 para utilizar en un método para tratar una enfermedad neurodegenerativa o una enfermedad del desarrollo neurológico; en donde dicho fragmento comprende al menos 150 aminoácidos de la proteína MeCP2; y en donde dicho derivado de dicha proteína o fragmento tiene al menos 60% de identidad con dicha proteína MeCP2 o fragmento de esta; y en donde dicho fragmento o dicho derivado tiene al menos 60 % de dicha actividad biológica, según se determina por un ensayo de transcripción in vitro descrito por Nan, X et al., Cell 88: 471-481 (1997).
- 10 2. Un polipéptido que comprende (i) una proteína MeCP2 o un fragmento biológicamente activo o un derivado de dicha proteína o fragmento, y (ii) un dominio de transducción de la proteína, en donde la proteína MeCP2 se fusiona con el dominio de transducción de la proteína,
 15 para utilizar en un método para tratar el síndrome de Rett; en donde dicho fragmento comprende al menos 150 aminoácidos de la proteína MeCP2; y en donde dicho derivado de dicha proteína o fragmento tiene al menos 60 % de identidad con dicha proteína MeCP2 o fragmento de esta; y en donde dicho fragmento o dicho derivado tiene al menos 60% de dicha actividad biológica, según se determina por un ensayo de transcripción in vitro descrito por Nan, X et al., Cell 88: 471-481 (1997).
3. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde la enfermedad del desarrollo neurológico se debe a una reducción de la expresión de MeCP2 o a una función deteriorada de MeCP2.
- 20 4. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el dominio de transducción de la proteína se deriva de la proteína transactivador transcripcional del virus-1 de inmunodeficiencia humana (proteína TAT).
5. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la proteína MeCP2 o fragmento biológicamente activo o derivado de esta es de origen humano.
- 25 6. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la proteína MeCP2 o el fragmento biológicamente activo o derivado de esta, es la isoforma e1 de MeCP2 humana o la isoforma e2 de MeCP2 humana o un fragmento biológicamente activo de esta, o un derivado de dichas isoformas o dichos fragmentos.
7. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicho dominio de transducción de la proteína tiene al menos 60%, en particular al menos 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido del dominio de transducción de la proteína TAT (SEQ ID NO.54).
- 30 8. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el tratamiento comprende la administración del polipéptido a un mamífero.
9. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho polipéptido está incluido en una composición farmacéutica.
10. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dicha composición farmacéutica se administra a una dosificación de 0.1-200 µg de polipéptido por g de peso corporal del mamífero.
- 35 11. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde dicha composición farmacéutica se administra al menos una vez al día o cada dos días
12. Uso de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para la fabricación de una composición farmacéutica para la prevención y/o terapia de una enfermedad neurodegenerativa o del desarrollo neurológico.
- 40 13. El uso de la reivindicación 12, en donde la enfermedad del desarrollo neurológico se debe a una reducción de la expresión de MeCP2 o con una función deteriorada de MeCP2, particularmente en donde la enfermedad del desarrollo neurológico es el síndrome de Rett.

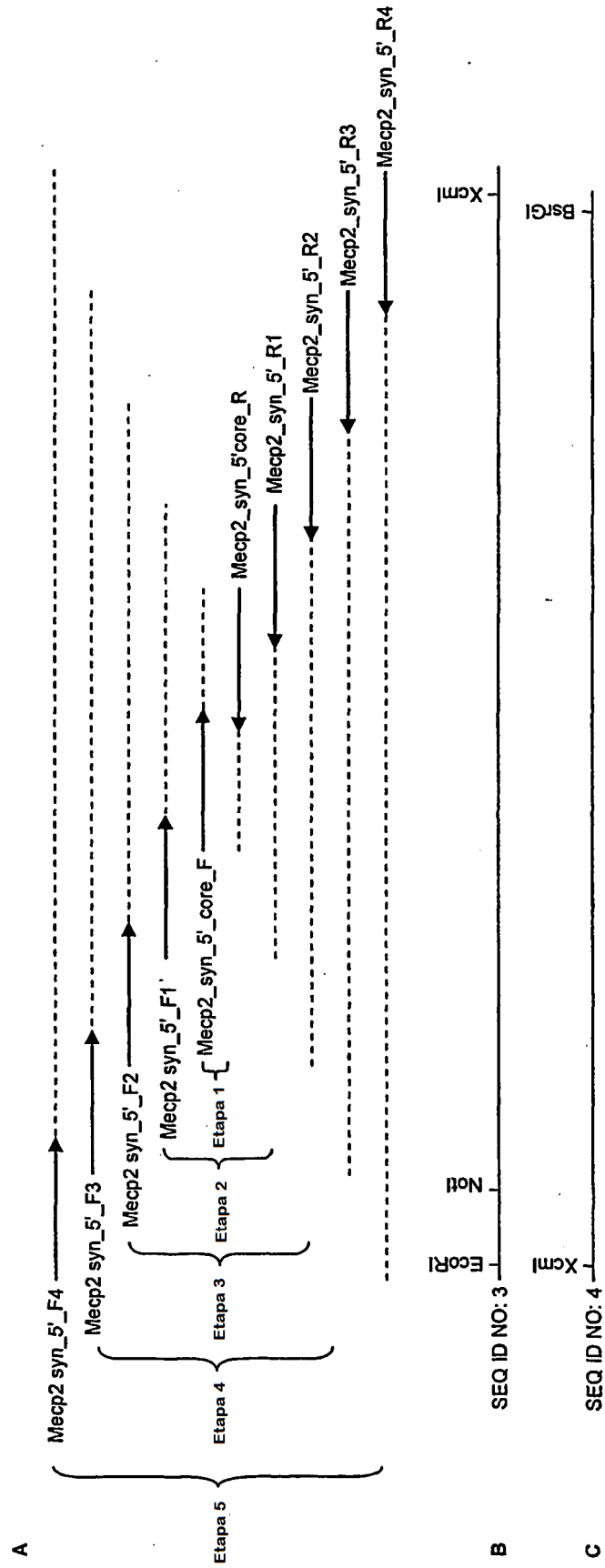


Figura 1

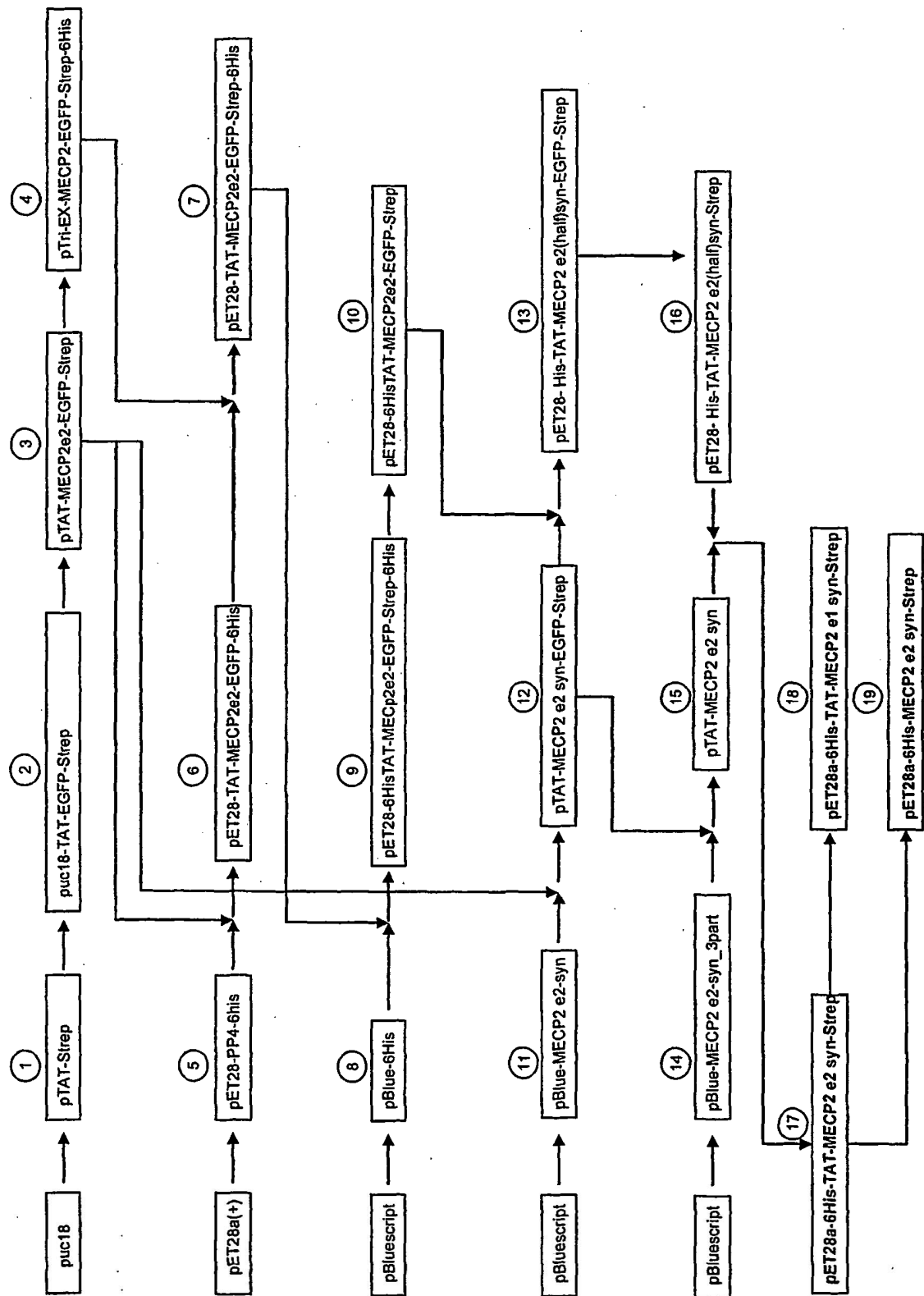


Figura 2

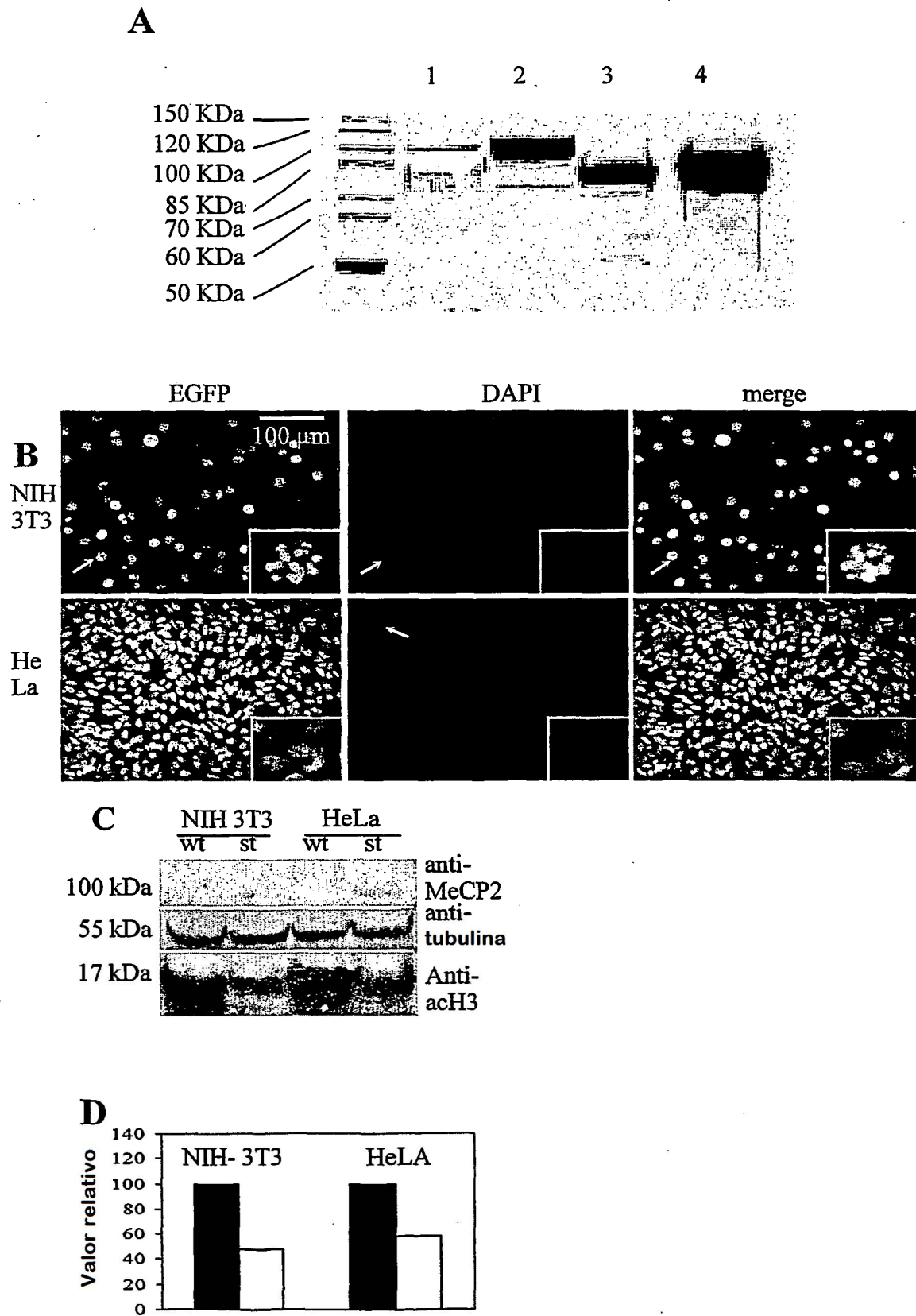


Figura 3

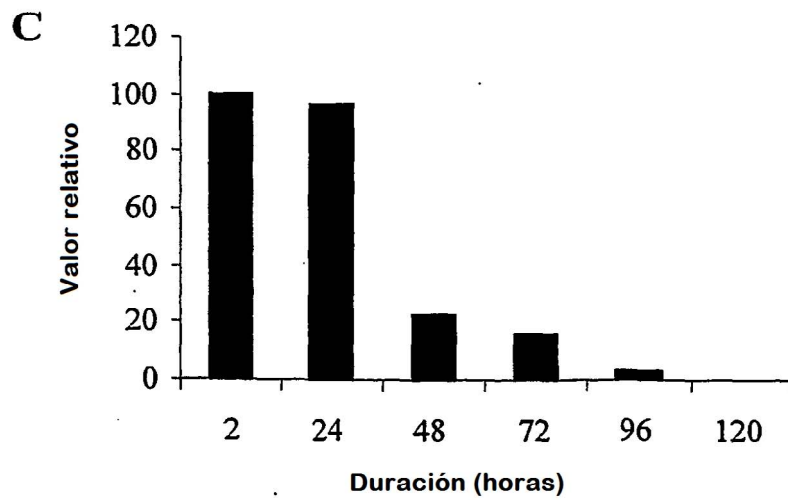
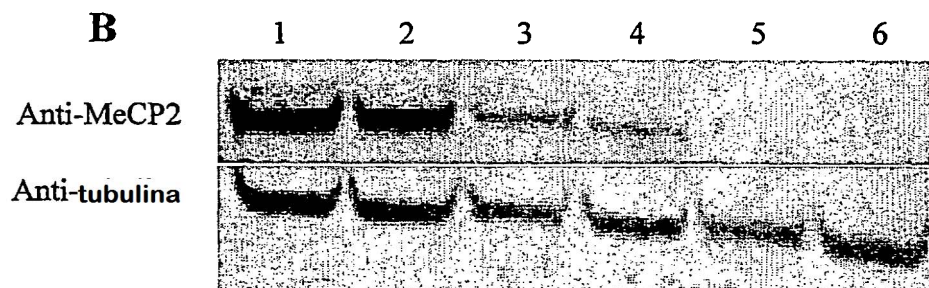
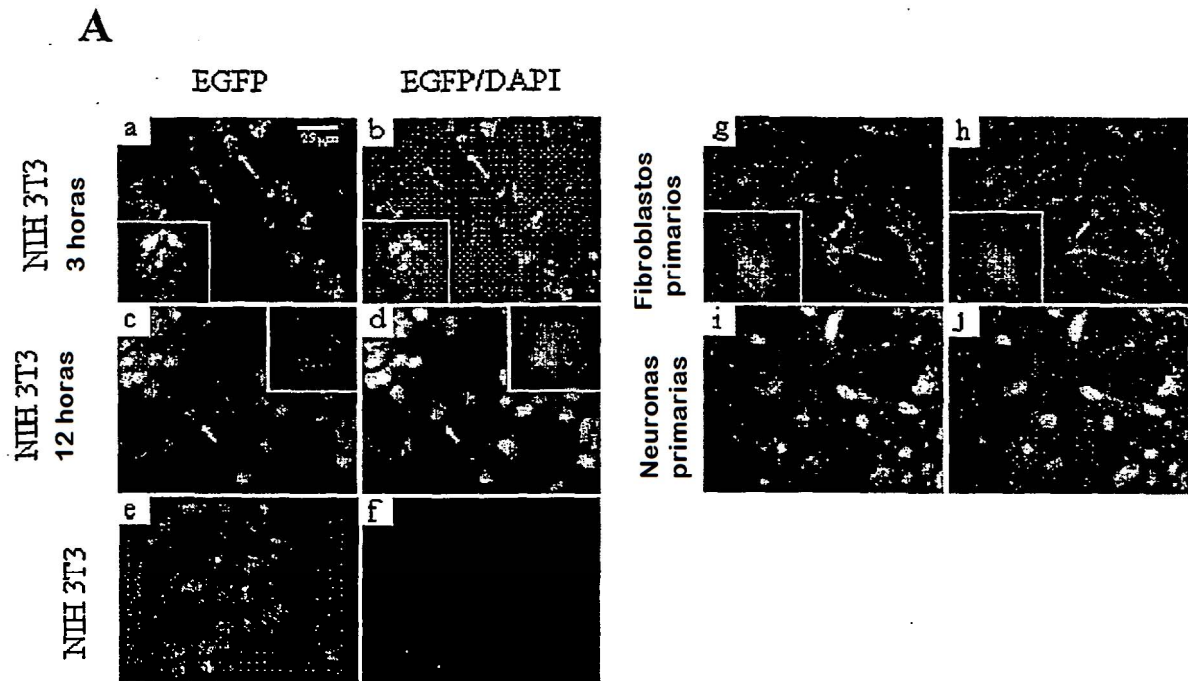


Figura 4

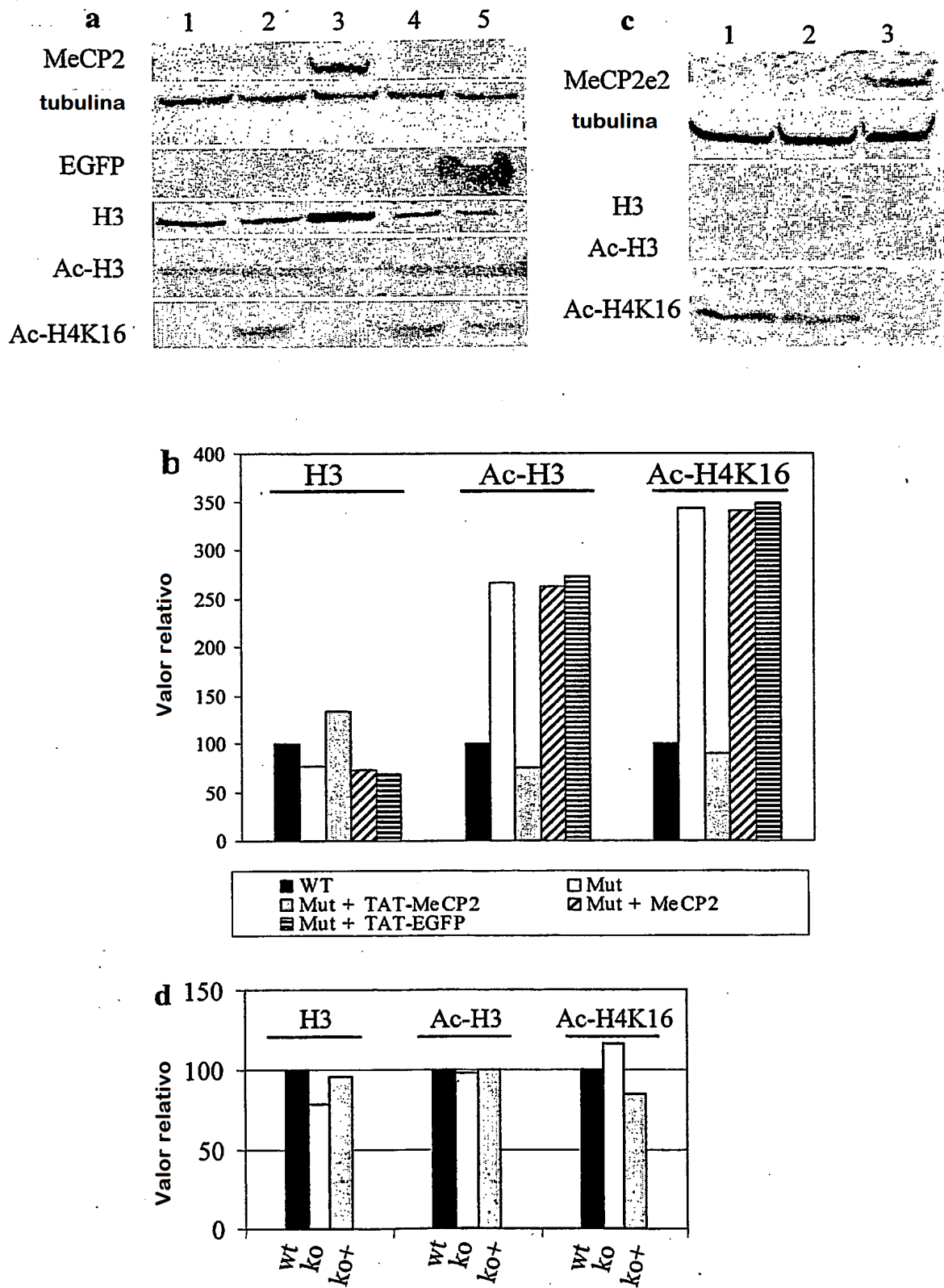


Figura 5

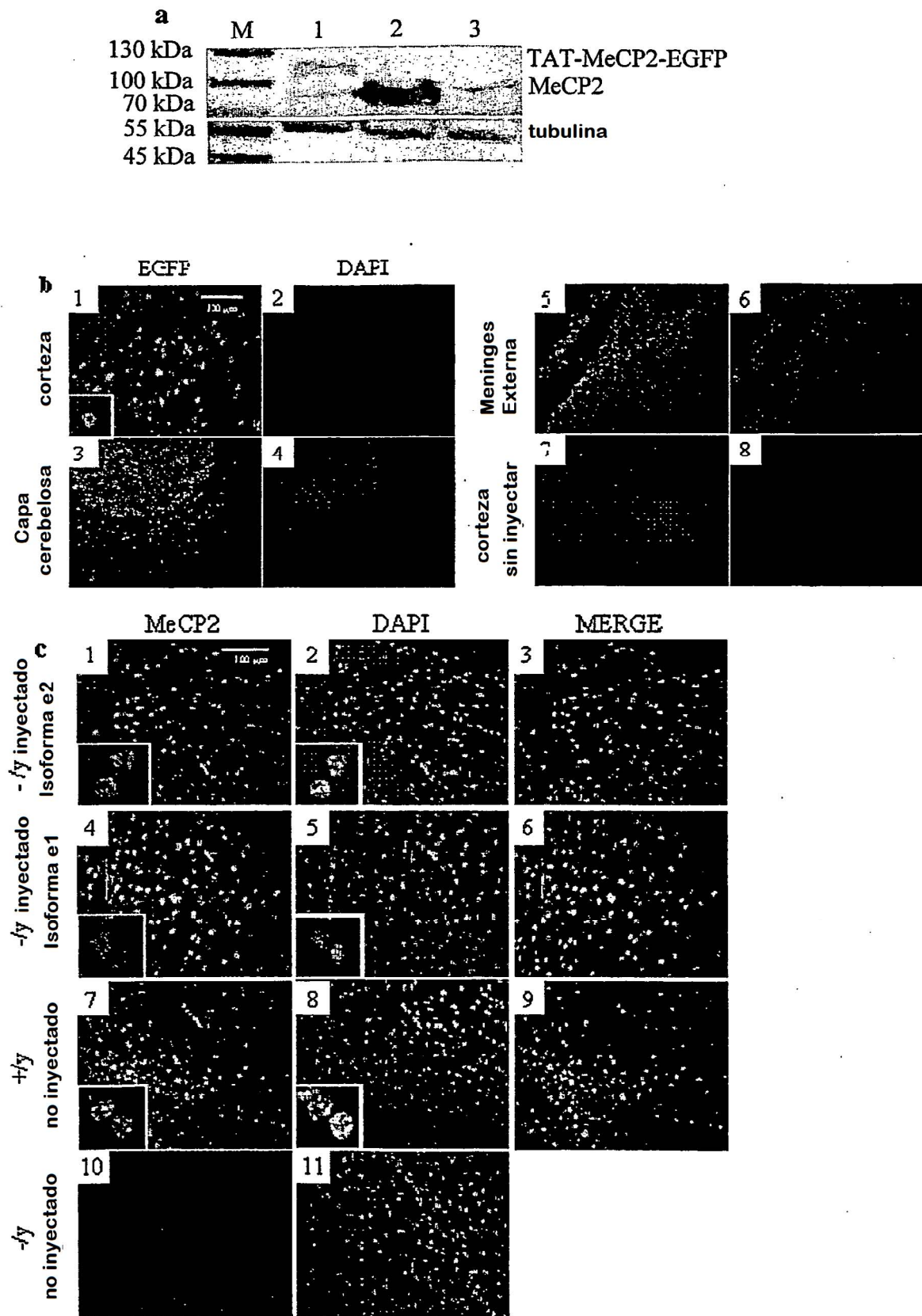


Figura 6

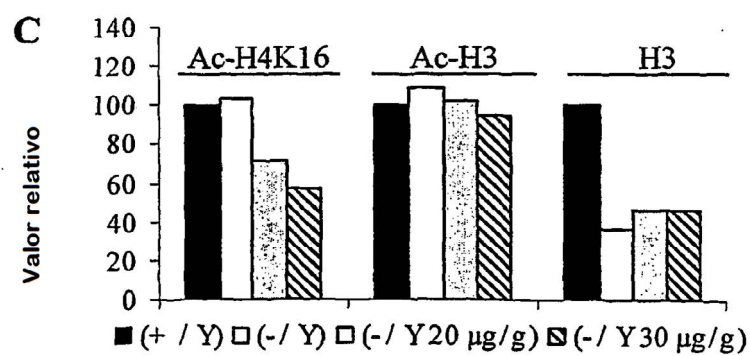
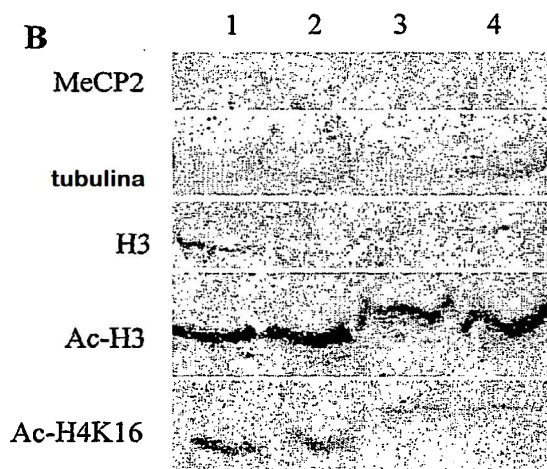
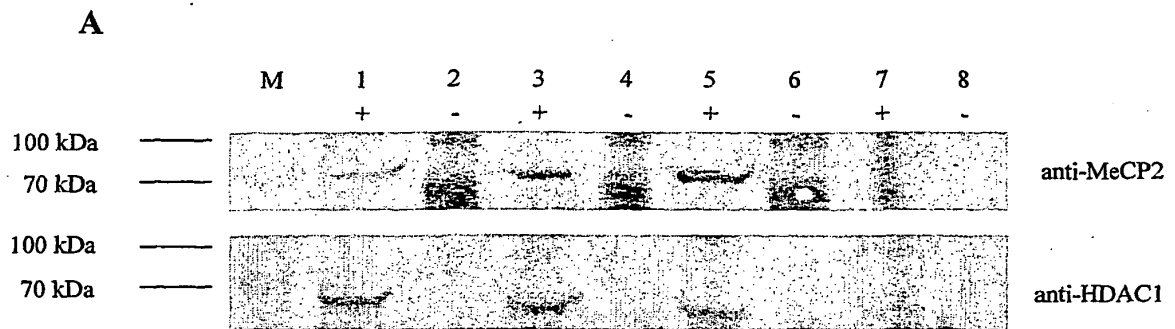


Figura 7

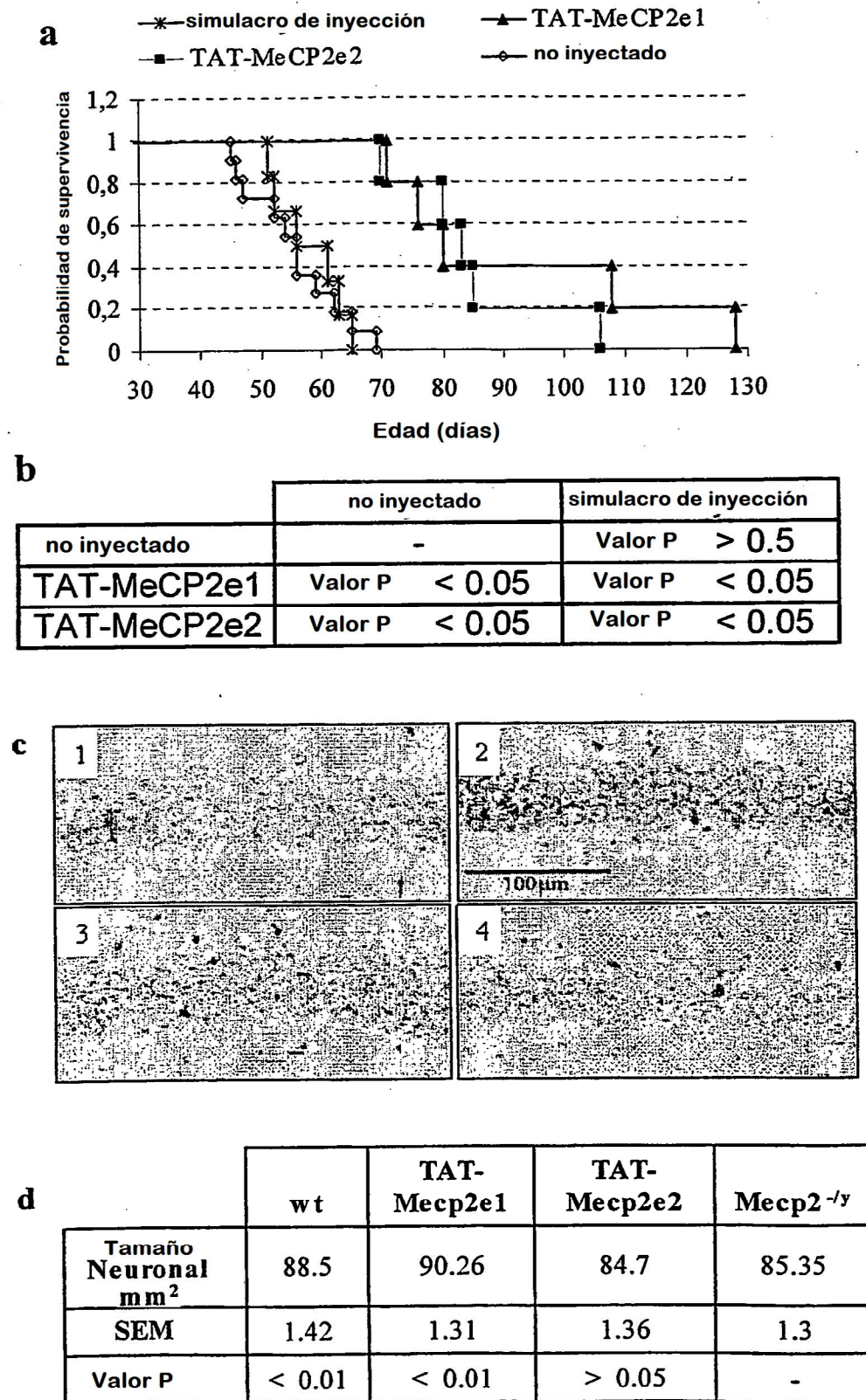


Figura 8

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCION

Esta lista de referencias citada por el aspirante es solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de la patente Europea. Aún cuando se ha tenido gran cuidado en recopilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO desconoce toda responsabilidad a este respecto.

5 Documentos de patentes citadas en la descripción

- WO 0062067 A, Dowdy [0006]
- WO 2005078099 A [0008]

Literatura no-patente citada en la descripción

- Rett. *Wien Med Wochenschr*, 1966, vol. 116, 723-6 [0002]
- 10 • Armstrong. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 2002, vol. 8, 72-6 [0002]
- Amir et al. *Nat Genet*, 1999, vol. 23, 185-8 [0002]
- L. S. Weaving et al. *Journal of Medical Genetics*, 2005, vol. 42, 1-7 [0002] [0004]
- G. Miltenberger-Miltenyi ; F. Laccone. *HumanMutation*, 2003, vol. 22 (2), 107-115 [0002]
- Adler. *MammGenome*, 1995, vol. 6 (8), 491-2 [0003]
- 15 • Mnatzakanian et al. *Nat Genet*, 2004, vol. 36, 339-41 [0003]
- Lam et al. *J Med Genet*, 2000, vol. 37 (12), E41 [0004]
- Lee et al. *Brain Dev*, 2001, vol. 23, 138-43 [0004]
- G. Miltenberger-Miltenyi ; F. Laccone. *HumanMutation*, 2003, vol. 22 (2), 107-115 [0004]
- Schwarze et al. *Science*, 1999, vol. 285, 1569-1572 [0005]
- 20 • Kosai et al. *Molecular Therapy*. Academic Press, 15 August 2008, vol. 11, 24 [0007]
- Kane. *Curr Opin Biotechnol*, 1995, vol. 6 (5), 494-500 [0009]
- Lithwick. *Genome Res*, 2003, vol. 13 (12), 2665-2673 [0009]
- Nan, X et al. *Cell*, 1997, vol. 88, 471-481 [0019]
- Yusufzai T.M. ; Wolffe, A.P. *Nucl. Acids Res.*, 2000, vol. 28, 4172-4179 [0019]
- 25 • Yu F. et al. *Nucl. Acids Res.*, 2001, vol. 29 (21), 4493-501 [0019]
- Henaut ; Danchin. *Analysis and Predictions from Escherichia coli sequences in: Escherichia coli and Salmonella*. ASM press, 1996, vol. 2, 2047-2066 [0020]
- Grote A. et al. *Nucleic Acids Research*, 2005, vol. 33, <http://www.pordoric.de/JCat> [0020]
- Mol. Cell Proteomics., 2004, vol. 3 (8), 746-69 [0026]
- 30 • Derossi et al. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 10444 [0026]
- Elliot ; O'Hare. *Cell*, 1997, vol. 88, 223 [0026]
- Jones S.W. et al. *Br. J. Pharmacol.*, 2005, vol. 145 (8), 1093-1102 [0026]
- Ho A. et al. *Cancer Res.*, 2001, vol. 61 (2), 474-477 [0026]
- Maniatis, T. ; Fritsch, E. F. ; Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982 [0028]
- 35 • Terpe K. *AppL Microbiol. Biotechnol.*, 2003, vol. 60 (5), 523-533 [0029]
- Xiong A.S. et al. *Nucl. Acids Res.*, 2004, vol. 32 (12), e98 [0038]
- Protein Purification Applications: A Practical Approach. Oxford University Press, 2001 [0040]

- **Yusufzai T.M. ; Wolffe A.P.** *Nucl. Acids Res.*, 2000, vol. 28 (21), 4172-4179 **[0045]**
- **Kudo S. et al.** *Brain Dev.*, 2001, 165-73 **[0045]**
- **Ballestar E. et al.** *Hum. Genet.*, 2005, vol. 116 (1-2), 91-104 **[0045]**
- **Hagberg B. et al.** *Eur. J. Paediatr. Neurol.*, 2002, vol. 6 (5), 293-7 **[0046]**
- 5 • **Ho A et al.** *Cancer Res.*, 15 January 2001, vol. 61 (2), 474-7 **[0060]**
- **Ray, J. et al.** *PNAS*, 1993, vol. 90, 3602-6 **[0079]**
- **Counter, C.M. et al.** *Oncogene*, 1998, vol. 16, 1217-22 **[0081]**
- **Lundberg, A.S. et al.** *Oncogene*, 2002, vol. 21, 4577-86 **[0081]**
- **Chen et al.** *Nat Genet*, 2001, vol. 27 (3), 327-31 **[0091]**
- 10 • **Armstrong DD.** *Ment Retard Dev Disabil ResRev*, 2002, vol. 8, 72-6 **[0093]**