



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 982 270**

⑫ Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**C12N 9/64** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**A01K 67/027** (2014.01)  
**A61P 27/16** (2006.01)  
**C12N 15/86** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2018** PCT/US2018/022873

⑧7 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2018** WO18170402

⑨6 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2018** E 18768248 (9)

⑨7 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024** EP 3595634

⑮ Título: **Constructos y procedimientos de terapia génica para el tratamiento de la pérdida de audición**

⑩ Prioridad:

**17.03.2017 US 201762472790 P**  
**12.07.2017 US 201762531522 P**

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.10.2024**

⑯ Titular/es:

**RESCUE HEARING INC (100.0%)**  
**2148 NW 29 Ave**  
**Gainesville, FL 32605, US**

⑯ Inventor/es:

**STAECKER, HINRICH;**  
**LIU, XUE, ZHONG;**  
**CHEN, ZHENG-YI y**  
**AYALA, CAESAR, JAMES**

⑯ Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo**

**ES 2 982 270 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Constructos y procedimientos de terapia génica para el tratamiento de la pérdida de audición

5 **REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

En la presente solicitud se reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE.UU. No. 62/472,790, presentada el 17 de marzo de 2017, y la Solicitud Provisional de EE.UU. No. 62/531,522, presentada el 12 de julio de 2017.

10 **CAMPO DE LA DIVULGACIÓN**

Se divultan composiciones farmacéuticas y procedimientos útiles en el tratamiento y/o prevención de la pérdida de audición y la sordera causadas por mutación genética del gen TMPRSS3 o del gen LOXHD1.

15 **ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN**

La pérdida de audición es el déficit sensorial más común en los seres humanos. De acuerdo con las estimaciones de 2012 sobre la magnitud de la pérdida de audición discapacitante publicadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), hay 360 millones de personas en todo el mundo que viven con pérdida de audición discapacitante (328 millones de adultos y 32 millones de niños) y el 89% (o 322 millones) de esas personas residen en países de bajos ingresos (Estimaciones mundiales de la OMS sobre la prevalencia de la pérdida auditiva; *Mortality and Burden of Diseases and Prevention of Blindness and Deafness*, WHO 2012).

Actualmente no existen agentes terapéuticos aprobados para prevenir o tratar la pérdida de audición o la sordera. La opción de tratamiento actual para las personas con pérdida de audición discapacitante es el implante coclear. El implante coclear es un procedimiento frecuente con un elevado coste sanitario asociado, más de 1.000.000 de dólares de coste de por vida por paciente (Mohr PE, et al. (2000). The societal costs of severe to profound hearing loss in the United States; *Int J Technol Assess Health Care*; 16(4):1120-35).

La demanda actual de implantes cocleares supera la oferta. El ritmo de producción de unidades de implante coclear fabricadas es de 50.000 unidades cada año. Teniendo en cuenta las tasas de natalidad actuales y la incidencia y prevalencia de la pérdida de audición discapacitante en recién nacidos, se necesitan 134.000 implantes cocleares al año para proporcionar 1 implante coclear a cada niño afectado. Esta cifra aumenta si se incluyen los pacientes que necesitan implantes cocleares bilaterales (2).

El coste de por vida de un implante coclear es prohibitivo para la mayoría de las personas y, en particular, para las que viven fuera de los países desarrollados, donde reside la mayoría de las personas con pérdida de audición discapacitante. Se necesitan opciones terapéuticas que ofrezcan alternativas rentables a los implantes cocleares, especialmente para las personas que viven fuera de los países desarrollados.

Más del 50% de las sorderas prelingüales son genéticas, es decir, hereditarias (Centers for Disease Control and Prevention- *Genetics of Hearing Loss*). La hipoacusia y la sordera hereditarias pueden ser conductivas, neurosensoriales o una combinación de ambas; sindrómicas (asociadas a malformaciones del oído externo u otros órganos o a problemas médicos que afectan a otros sistemas orgánicos) o no sindrómicas (sin anomalías visibles asociadas del oído externo ni problemas médicos relacionados); y prelingüales (antes de que se desarrolle el lenguaje) o postlingüales (después de que se desarrolle el lenguaje) (Richard JH Smith, MD, A Eliot Shearer, Michael S Hildebrand, PhD, y Guy Van Camp, PhD, *Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview*, GeneReviews Initial Posting: 14 de febrero de 1999; Última revisión: 9 de enero de 2014. Más del 70% de las pérdidas de audición hereditarias no son sindrómicas. Los diferentes loci genéticos de la sordera no sindrómica se designan DFN (por DeafNess). Los loci se nombran con base en el modo de herencia: DFNA (autosómica dominante), DFNB (autosómica recesiva) y DFNX (ligada al cromosoma X). El número que sigue a las designaciones anteriores refleja el orden de cartografía y/o descubrimiento de los genes. En la población general, la prevalencia de la pérdida de audición aumenta con la edad. Este cambio refleja el impacto de la genética y el medio ambiente y las interacciones entre los desencadenantes ambientales y la predisposición genética de un individuo.

La pérdida auditiva neurosensorial (SNHL) es la enfermedad neurodegenerativa más común en humanos y actualmente no existen intervenciones farmacológicas aprobadas. La SNHL puede estar causada por trastornos genéticos, así como adquirida a través de lesiones tales como traumatismos sonoros y ototoxicidad. Los diagnósticos genéticos han demostrado que existen al menos 100 genes causantes de la SNHL no sindrómica. Los recientes avances en genética y técnicas de terapia génica han demostrado que es posible rescatar varios tipos recesivos de sordera mediante terapia génica (Akil et al., 2012; Askew et al., 2015). La administración de genes a largo plazo en el oído interno se ha logrado utilizando vectores virales adenoasociados (AAV) (Shu, Tao, Wang, et al., 2016). A pesar de que la primera de estas observaciones se describió hace varios años, aún no se ha traducido en un ensayo clínico en humanos. Una enfermedad ideal para la investigación traslacional en este campo es una pérdida de audición genética recesiva que afecta a un grupo definido de células del oído interno y

se produce en el periodo postnatal, tras el desarrollo del habla. La prevalencia de la mutación es una consideración adicional.

Como se describe en el presente documento, evaluando cuidadosamente tanto la incidencia de las causas recesivas comunes de pérdida de audición como teniendo en cuenta el tamaño del gen, es posible desarrollar un programa de terapia génica que tenga una población de pacientes accesible y bastante común. Por ejemplo, aunque menos frecuente que otras mutaciones, TMPRSS3 es una causa bastante común de pérdida de audición lo suficientemente grave como para justificar un implante coclear. Además, es posible que los pacientes con mutaciones en TMPRSS3 no respondan al implante coclear tan bien como los pacientes con otras mutaciones (Shearer et al., 2017). Esto presenta la oportunidad de dirigirse a TMPRSS3, o a otros genes tales como LOXHD1, como terapia independiente o en combinación con otros agentes terapéuticos y/o la implantación coclear para mejorar los resultados de la implantación de este trastorno. La Tabla 1 (adaptada de (Miyagawa, Nishio, & Usami, 2016)) demuestra que las mutaciones en TMPRSS3 pueden ser la causa más común de hipoacusia recesiva postlingual que tiene una distribución bastante limitada dentro de la cóclea y, debido al tamaño del gen, puede incorporarse a los vectores AAV existentes.

Tabla 1: Incidencia de diferentes mutaciones en 176 pacientes adultos con implante coclear

MUTACIÓN	ONSET		113				DOM/REC
	PRE	POST	TOTAL	% DEL TOTAL	GEN SZ	CÉLULA CAPILAR	
GJB2	26	3	29	17%	2347	NO	AMBOS
CDH23	6	7	13	8%	4843	SÍ	REC
SLC26A4	8	0	8	5%	4930	NO	REC
MYO7A	3	4	7	4%	7463	SÍ	AMBOS
OTDF	4	0	4	2%	6973	SÍ	REC
MYO15A	2	2	4	2%	11876	SÍ	REC
WARDNB SYN	3	0	3	2%	1504	NO	DOM
TMPRSS3	0	3	3	2%	2460	SÍ	REC
ACTG1	0	2	2	1%	2123	SÍ	DOM
UJIER (1=CDH23, 1=PCDH15)					4843,		
1=PCDH15)	2	0	2	1%	7042	?	REC
Mit1555A>G	0	2	2	1%	h7k	?	?
GYRM	0	1	1	1%	1559	NO	DOM
DFNA5	0	1	1	1%	2276	SÍ	DOM
COCH	0	1	1	1%	2882	NO	DOM
WHRN	0	1	1	1%	2915	SÍ	REC
LOXHD1	1	0	1	1%	3978	SÍ	REC
Mit3243A>G	0	1	1	1%	NA	?	?

La proteasa transmembrana humana, serina 3 (TMPRSS3; también denominada DFNB10, DFNB8, ECHOS1, TADG12; Acc: HGNC:11877) se identificó por su asociación tanto con la sordera congénita (presente al nacer) como con la sordera autosómica recesiva de aparición en la infancia. Las mutaciones en el gen TMPRSS3 están asociadas con la Deficiencia Auditiva Autosómica Recesiva No Sindrómica tipo DFNB8 y 10. TMPRSS3 es un gen de 1646 pares de bases que codifica para una proteasa de serina y se asocia con DFNA 8/10 y puede constituir hasta el 1-5% de los pacientes con hipoacusia sometidos a implante coclear (Weegerink et al., 2011). La pérdida de función de este gen parece dar lugar a un amplio espectro de fenotipos auditivos dependiendo del lugar de la mutación. Tanto la pérdida de audición congénita como la progresiva de aparición en la edad adulta se han asociado a la pérdida de este gen.

La aparición de la pérdida auditiva DFNB8 es postlingual (edad 10-12 años), mientras que la aparición de la pérdida auditiva DFNB10 es prelingual (congénita). Esta diferencia fenotípica refleja una diferencia genotípica. La variante causante de DFNB8 es una variante del lugar de empalme, lo que sugiere que un empalme ineficiente se asocia con una cantidad reducida de proteína normal que es suficiente para prevenir la sordera prelingual pero no suficiente para prevenir la pérdida de audición eventual. (Ver, Richard JH Smith, MD, et al. (2014). Genes Known to Cause Autosomal Recessive Nonsyndromic Hearing Impairment: Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview; GeneReviews).

Las mutaciones de TMPRSS3 en el cromosoma 21 que se sabe que causan pérdida de audición se describen en la Tabla 2.

TABLA 2. MUTACIONES TMPRSS3 (CROMOSOMA 21)		
#	NOMBRE DE LA MUTACIÓN	REFERENCIA
1	TMPRSS3, IVS4AS, G-A, -6	Scott HS, et al. (2001) Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. <i>Nat Genet.</i> 27(1):59-63.
2	TMPRSS3, 8-BP DEL, REPETICIÓN SATÉLITE INS	Scott HS, et al. (2001) Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. <i>Nat Genet.</i> 27(1):59-63.
3	TMPRSS3, 1-BP DEL, 207C	Wattenhofer M, et al. (2002) Mutations in the TMPRSS3 gene are a rare cause of childhood nonsyndromic deafness in Caucasian patients. <i>J Mol Med (Berl).</i> 80(2):124-31.
4	c.753G>C (p.Trp251Cys)	Masmoudi S, et al. (2001) Novel missense mutations of TMPRSS3 in two consanguineous Tunisian families with non-syndromic autosomal recessive deafness. <i>Hum Mutat.</i> 18(2):101-8.
5	c.308A>G (p.Asp103Gly)	Wattenhofer M, et al. (2002) Mutations in the TMPRSS3 gene are a rare cause of childhood nonsyndromic deafness in Caucasian patients. <i>J Mol Med (Berl).</i> 80(2):124-31.
6	c.1211C>T (p.Pro404Leu)	Wattenhofer M, et al. (2005) A novel TMPRSS3 missense mutation in a DFNB8/10 family prevents proteolytic activation of the protein. <i>Hum Genet.</i> 117(6):528-35.
7	c.647G>T (p.Arg216Leu)	Wattenhofer M, et al. (2005) A novel TMPRSS3 missense mutation in a DFNB8/10 family prevents proteolytic activation of the protein. <i>Hum Genet.</i> 117(6):528-35.
8	c.579dupA (p.Cys194Metfs)	Duzkale H, et al. (2013) A systematic approach to assessing the clinical significance of genetic variants. <i>Clin Genet.</i> 84(5):453-63.
9	c.1192C>T (p.Gln398Ter)	Wattenhofer M, et al. (2005) A novel TMPRSS3 missense mutation in a DFNB8/10 family prevents proteolytic activation of the protein. <i>Hum Genet.</i> 117(6):528-35.
10	c.323-6G>A	Scott HS, et al. (2001) Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. <i>Nat Genet.</i> 27(1):59-63.
11	c.916G>A (p.Ala306Thr)	Chung J, et al. (2014) A novel mutation of TMPRSS3 related to milder auditory phenotype in Korean postlingual deafness: a possible future implication for a personalized auditory rehabilitation. <i>J Mol Med (Berl).</i> 92(6):651-63.
12	c.208delC (p.His70Thrfs)	Battelino S, et al. (2015) TMPRSS3 mutations in autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. <i>Eur Arch Otorhinolaryngol.</i> 273(5):1151-4.
13	c.1276G>A (p.Ala426Thr)	Weegerink NJ, et al. (2011) Genotype-phenotype correlation in DFNB8/10 families with TMPRSS3 mutations. <i>J Assoc Res Otolaryngol.</i> 12(6):753-66.
14	c.413C>A (p. Ala 13 8Glu)	Eppsteiner RW, et al. (2012) Prediction of cochlear implant performance by genetic mutation: the spiral ganglion hypothesis. <i>Hear Res.</i> 292(1-2):51-8.
15	c.325C>T (p.Arg109Trp)	Lee YJ, Park D, Kim SY, Park WJ (2003) Pathogenic mutations but not polymorphisms in congenital and childhood onset autosomal recessive deafness disrupt the proteolytic activity of TMPRSS3. <i>J Med Genet.</i> 40(8):629-31.
16	c.346G>A (p.V116M)	Ganapathy A, et al. (2014) Non-syndromic hearing impairment in India: high allelic heterogeneity among mutations in TMPRSS3, TMC1, USHIC, CDH23 and TMIE. <i>PLoS One.</i> 9(1):e84773.
17	c.727G>A (p.G243R)	Ganapathy A, et al. (2014) Non-syndromic hearing impairment in India: high allelic heterogeneity among mutations in TMPRSS3, TMC1, USHIC, CDH23 and TMIE. <i>PLoS One.</i> 9(1):e84773.

<b>TABLA 2. MUTACIONES TMPRSS3 (CROMOSOMA 21)</b>		
#	NOMBRE DE LA MUTACIÓN	REFERENCIA
18	c.1156T>C (p.C386R)	Ganapathy A, et al. (2014) Non-syndromic hearing impairment in India: high allelic heterogeneity among mutations in TMPRSS3, TMC1, USHIC, CDH23 and TMIE. <i>PLoS One</i> . 9(1):e84773.

El gen de los dominios de homología de la lipoxigenasa 1 (LOXHD1; también denominado LH2D1, DFNB77, FLJ32670; OMIM: 613072; Acc:HGNC:26521) codifica una proteína muy conservada formada en su totalidad por dominios PLAT (policistina/lipoxigenasa/alfa-toxina), que se cree que intervienen en la orientación de las proteínas a la membrana plasmática. Los estudios en ratones demuestran que este gen se expresa en las células ciliadas mecanosensoriales del oído interno, y las mutaciones en este gen provocan defectos auditivos, lo que indica que este gen es esencial para el funcionamiento normal de las células ciliadas. El cribado de familias humanas que segregan sordera identificó una mutación en este gen que causa DFNB77, una forma progresiva de hipoacusia autosómica recesiva no sindrómica (ARNSHL). Para este gen se han observado variantes de transcripción empalmadas alternativamente que codifican diferentes isoformas.

Características clínicas de LOXHD1:

- Autosómico recesivo
- Pérdida auditiva neurosensorial bilateral (pérdida auditiva más leve en frecuencias bajas)
- Inicio congénito que conduce a implantes cocleares entre 7-10 años de edad en familias judías asquenazíes
- Aparición a los 7-8 años de edad que progresa a una pérdida de moderada a grave de frecuencias medias y altas durante la edad adulta en una familia consanguínea iraní

Evidencia de que la hipoacusia autosómica recesiva no sindrómica-77 (DFNB77) está causada por una mutación homocigota en el gen LOXHD1 (613072) en el cromosoma 18q21.

La hibridación in situ detectó la expresión de Loxhd1 en el oído interno de ratón en desarrollo en los días embrionarios 13,5 y 16, pero no en ningún otro tejido. En el día 4 postnatal, se detectó expresión en las células ciliadas cocleares y vestibulares, con la mayor concentración en el núcleo. Loxhd1 se localizó progresivamente en el citoplasma, y en el adulto, Loxhd1 se expresó en las células ciliadas a lo largo de la longitud de los estereocilios.

Utilizando una pantalla de mutagénesis con N-etil-N-nitrosourea (ENU), Grillet et al. (2009) desarrollaron la línea de ratones "samba", que se vuelven hipoacústicos a las 3 semanas de vida y sordos a las 8 semanas. Los ratones homocigotos samba no mostraron ninguna otra anomalía neurológica o vestibular, y los ratones heterocigotos samba parecían completamente normales. El desarrollo estereociliar no se vio afectado en los ratones homocigotos samba, pero la función de las células ciliadas se vio perturbada y éstas acabaron degenerando.

Grillet et al. (2009) descubrieron que samba era una mutación en el gen Loxhd1 de ratón que desestabilizaba la estructura beta-sándwich del dominio 10 de PLAT. La mutación no alteró la estabilidad del ARNm o de la proteína ni la localización de la proteína Loxhd1 a lo largo de la longitud de los estereocilios. Sin embargo, en el día 21 postnatal, algunas células ciliadas mostraban defectos morfológicos con estereocilios fusionados y membrana erizada en la superficie apical de la célula. Los profundos cambios degenerativos eran evidentes en el día 90 postnatal, incluida la pérdida de células ciliadas y una reducción de las neuronas ganglionares espirales. Grillet et al. (2009) plantearon la hipótesis de que la degeneración de las neuronas ganglionares espirales era probablemente secundaria a perturbaciones en la función y el mantenimiento de las células ciliadas.

Las mutaciones de LOXHD1 en el cromosoma 18 que se sabe que causan pérdida de audición se describen en la Tabla 3.

<b>TABLA 3. MUTACIONES LOXHD1 (CROMOSOMA 18)</b>		
#	NOMBRE DE LA MUTACIÓN	REFERENCIA
1	c.2008C>T (p.Arg670Ter)	Grillet N, et al. (2009) Mutations in LOXHD1, an evolutionarily conserved stereociliary protein, disrupt hair cell function in mice and cause progressive hearing loss in humans. <i>Am J Hum Genet</i> . 85(3):328-37.

(continuación)

**TABLA 3. MUTACIONES LOXHD1 (CROMOSOMA 18)**

#	NOMBRE DE LA MUTACIÓN	REFERENCIA
2	c.3169C>T (p.Arg1057Ter)	Edvardson S, et al. (2011) A deleterious mutation in the LOXHD1 gene causes autosomal recessive hearing loss in Ashkenazi Jews. Am J Med Genet A. 155A(5):1170-2. Grillet N, et al. (2009) Mutations in LOXHD1, an evolutionarily conserved stereociliary protein, disrupt hair cell function in mice and cause progressive hearing loss in humans. Am J Hum Genet. 85(3):328-37.
3	c.2303delG (p.Gly768Alafs)	Edvardson S, et al. (2011) A deleterious mutation in the LOXHD1 gene causes autosomal recessive hearing loss in Ashkenazi Jews. Am J Med Genet A. 155A(5):1170-2. Grillet N, et al. (2009) Mutations in LOXHD1, an evolutionarily conserved stereociliary protein, disrupt hair cell function in mice and cause progressive hearing loss in humans. Am J Hum Genet. 85(3):328-37.
4	c.4099G>T (p.Glu1367Ter)	Edvardson S, et al. (2011) A deleterious mutation in the LOXHD1 gene causes autosomal recessive hearing loss in Ashkenazi Jews. Am J Med Genet A. 155A(5):1170-2. Grillet N, et al. (2009) Mutations in LOXHD1, an evolutionarily conserved stereociliary protein, disrupt hair cell function in mice and cause progressive hearing loss in humans. Am J Hum Genet. 85(3):328-37.
5	c.2497C>T (p.Arg833Ter)	Edvardson S, et al. (2011) A deleterious mutation in the LOXHD1 gene causes autosomal recessive hearing loss in Ashkenazi Jews. Am J Med Genet A. 155A(5):1170-2. Grillet N, et al. (2009) Mutations in LOXHD1, an evolutionarily conserved stereociliary protein, disrupt hair cell function in mice and cause progressive hearing loss in humans. Am J Hum Genet. 85(3):328-37.
6	c.4714C>T	Edvardson S, et al. (2011) A deleterious mutation in the LOXHD1 gene causes autosomal recessive hearing loss in Ashkenazi Jews. Am J Med Genet A. 155A(5):1170-2.

La Publicación de Solicitud de EE.UU. No. 2013/0095071, incorporada por referencia en el presente documento en su totalidad, describe procedimientos de terapia génica para restaurar la pérdida de audición relacionada con la edad utilizando vectores virales adeno-asociados de tirosina mutada para entregar el inhibidor ligado al cromosoma X de la proteína de la apoptosis (XIAP) a la membrana de la ventana redonda del oído interno. Sin embargo, la publicación no contempla la administración de una secuencia de ácido nucleico que codifica TMPRSS3 o LOXHD 1 funcionales para prevenir o retrasar la aparición o restaurar la pérdida de audición o sordera causada por la mutación genética del gen TMPRSS3 o LOXHD 1, como se divulga en el presente documento.

Además, un escollo importante en el estado actual de la técnica para el desarrollo de terapias génicas clínicas para trastornos auditivos es la falta de modelos animales que reflejen la pérdida de audición humana. Muchos de los modelos de ratón disponibles para las pérdidas auditivas genéticas con aparición en la edad adulta en humanos presentan una pérdida auditiva congénita, lo que hace que los estudios de entrega sean complejos. Existe pocos modelos con aparición de pérdida de audición genética tras el desarrollo de la audición. La administración de vectores en ratones neonatos da lugar a diferentes patrones de transfección que la administración en ratones adultos (Shu, Tao, Li, et al., 2016). Se necesitan nuevos modelos animales que puedan utilizarse para evaluar el rescate de la audición utilizando diferentes sistemas de vectores y objetivos génicos.

20 Actualmente no existen tratamientos terapéuticos aprobados para prevenir o tratar la pérdida de audición o la sordera y se carece de modelos animales preclínicos útiles para probar dichos tratamientos. La presente invención describe composiciones farmacéuticas y procedimientos para la administración génica por vector viral de TMPRSS3 o LOXHD1 en el oído interno para restaurar la actividad de un gen TMPRSS3 o LOXHD1 mutado, promover la supervivencia de las células ciliadas y restaurar la audición en pacientes que sufren pérdida de audición o sordera, y modelos basados en animales para probar dichas composiciones farmacéuticas y procedimientos.

25

**BREVE SUMARIO**

Se divulga en el presente documento una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento para el tratamiento o la prevención de la pérdida de audición que incluye un vector de expresión que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:1, o una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con el ácido nucleico de SEQ ID NO:1, en la que la secuencia de ácido nucleico está operativamente unida a un promotor. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:1. El vector de expresión es un vector viral adeno-asociado AAV2. El promotor es el promotor del citomegalovirus humano (HCMV).

10 Las referencias a procedimientos de tratamiento en los siguientes párrafos de esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

15 En el presente documento se describe un procedimiento para tratar o prevenir la pérdida de audición, que incluye administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un vector de expresión que incluya la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:1, o una secuencia de ácido nucleico que tenga al menos 90% de identidad de secuencia con el ácido nucleico de SEQ ID NO:1, en el que la secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a un promotor. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:1. El vector de expresión es un vector viral adeno-asociado AAV2. El promotor es el promotor del citomegalovirus humano (HCMV). En algunas realizaciones, el vector de expresión se administra en el oído interno del sujeto, por ejemplo, mediante inyección. En algunas realizaciones, el procedimiento de administración se selecciona entre cocleostomía, membrana de ventana redonda, canalostomía o cualquier combinación de los mismos (véase, Erin E. Leary Swan, et al. (2008) Inner Ear Drug Delivery for Auditory Applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 60(15): 1583-1599). En algunas realizaciones, el vector de expresión se introduce en la escama media a través del saco endolinfático (Colletti V, et al. (2010) Evidence of gadolinium distribution from the endolymphatic sac to the endolymphatic compartments of the human inner ear. *Audiol Neurotol.* 15(6):353-63; Marco Mandalà, MD, et al. (2010) Induced endolymphatic flow from the endolymphatic sac to the cochlea in Ménière's disease. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery.* 143, 673-679; Yamasoba T, et al. (1999) Inner ear transgene expression after adenoviral vector inoculation in the endolymphatic sac. *Hum Gene Ther.* 10(5):769-74).

20 En algunas realizaciones, el sujeto tiene uno o más factores genéticos de riesgo asociados con la pérdida de audición. En algunas realizaciones, uno de los factores de riesgo genético es una mutación en el gen TMPRSS3. En algunas realizaciones, la mutación en el gen TMPRSS3 se selecciona de entre una o más mutaciones TMPRSS3 conocidas por causar pérdida de audición (véase, por ejemplo, la Tabla 2). En algunas realizaciones, uno de los factores de riesgo genético es una mutación en el gen LOXHD1. En algunas realizaciones, la mutación en el gen LOXHD1 se selecciona de entre una o más mutaciones LOXHD1 conocidas por causar pérdida de audición (véase, por ejemplo, la Tabla 3). En algunas realizaciones, el sujeto no muestra ningún indicador clínico de pérdida de audición.

40 En algunas realizaciones, un vector de expresión descrito en el presente documento se administra como terapia de combinación con uno o más vectores de expresión que comprenden otras secuencias de ácidos nucleicos y/o con uno o más agentes farmacéuticos activos para tratar la pérdida de audición. Por ejemplo, una terapia combinada puede incluir un primer vector de expresión que tenga la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 y un segundo vector de expresión que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:2, en el que ambos vectores de expresión se administran a un sujeto como parte de una terapia combinada para tratar la pérdida de audición.

45 Se divulga en el presente documento un ratón transgénico que tiene un gen TMPRSS3 humano con una mutación seleccionada de una o más mutaciones TMPRSS3 conocidas por causar pérdida de audición (véase, por ejemplo, la Tabla 2). Se divulga en el presente documento un ratón transgénico que tiene un gen LOXHD1 humano con una mutación seleccionada de una o más mutaciones LOXHD1 conocidas por causar pérdida de audición (véase, por ejemplo, la Tabla 3).

50 La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 y un ratón transgénico de acuerdo con la reivindicación 9. La siguiente discusión se proporciona para comprender las reivindicaciones, pero el alcance de la protección sólo está definido por las reivindicaciones. En particular, el uso de la palabra "realización" o "aspecto" no indica que se busque protección más allá del alcance de las reivindicaciones.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

60

La Fig. 1 muestra una secuencia de ADNc que codifica la TMPRSS3 humana de tipo salvaje (GenBank Accession No. BC074847.2).

65

La Fig. 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la TMPRSS3 humana de tipo silvestre codificada por el ADNc de la Figura 1.

La Fig. 3 muestra una secuencia de ADNc que codifica la LOXHD1 humana de tipo salvaje (GenBank Accession No. AK057232.1).

La Fig. 4 muestra la secuencia de aminoácidos de la LOXHD1 humana de tipo silvestre codificada por el ADNc de la Figura 3.

5 La Fig. 5 muestra la inmunohistoquímica de Tmprss3 en la cóclea de ratón adulto (Fasquelle, L., Scott, H. S., Lenoir, M., Wang, J., Rebillard, G., Gaboyard, S., ... Delprat, B. (2011). Tmprss3, una serina proteasa transmembrana deficiente en la sordera humana DFNB8/10, es crítica para la supervivencia de las células ciliadas cocleares al inicio de la audición. *Journal of Biological Chemistry*, 286(19), 17383-17397).

10 **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

El objeto que se considera la invención se señala en particular y se reivindica claramente en las reivindicaciones al final de la memoria descriptiva. Lo anterior y otros objetos, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada tomada en conjunto con los dibujos adjuntos.

15 Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento" abarcan una variedad de actividades dirigidas a cambios deseables en los resultados clínicos. Por ejemplo, el término "tratar", tal y como se utiliza en el presente documento, engloba cualquier actividad dirigida a lograr, o que logre, una mejora detectable en uno o más indicadores clínicos o síntomas de la pérdida de audición, tal y como se describe en el 20 presente documento.

25 La pérdida de audición causada por mutaciones TMPRSS3 o mutaciones LOXHD1 se presenta generalmente en dos poblaciones: (i) la población congénita, en la que los sujetos nacen con pérdida de audición, y (ii) la población progresiva, en la que los sujetos no tienen una pérdida de audición medible al nacer, pero muestran una pérdida de audición progresiva a lo largo de un periodo de tiempo. Por lo tanto, en algunos casos, un sujeto puede tener una mutación en el gen TMPRSS3 o en el gen LOXHD1 (por ejemplo, como se detecta en una prueba de diagnóstico genético), pero aún no muestra indicadores clínicos o síntomas de pérdida de audición, proporcionando así una ventana durante la cual se puede iniciar la intervención terapéutica. Por consiguiente, en algunas 30 realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para la intervención terapéutica durante el periodo de regresión gradual de la audición. Los procedimientos de la presente invención pueden iniciarse antes de dicho periodo de tiempo. Los procedimientos de tratamiento de la pérdida de audición proporcionados por la invención incluyen, entre otros, procedimientos para prevenir o retrasar la aparición de la pérdida de audición o la progresión de los indicadores o síntomas clínicos de la pérdida de audición.

35 Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "pérdida auditiva" se emplea para describir la capacidad reducida para oír sonidos, e incluye la sordera y la incapacidad total para oír sonidos.

40 Los términos "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a una cantidad de un agente activo, tal como se describe en el presente documento, que es suficiente para lograr, o contribuir a lograr, uno o más resultados clínicos deseables, como los descritos en la descripción de "tratamiento" anterior. La cantidad "eficaz" adecuada en cada caso concreto puede determinarse mediante técnicas 45 estándar conocidas en la técnica, tal como un estudio de escalado de dosis.

50 El término "agente activo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula (por ejemplo, un vector AAV descrito en el presente documento) que se pretende utilizar en las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento y que se pretende que sea biológicamente activa, por ejemplo, con el fin de tratar la pérdida de audición.

55 El término "composición farmacéutica", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una composición que comprende al menos un agente activo, tal como se describe en el presente documento, o una combinación de dos o más agentes activos, y uno o más componentes adecuados para su uso en la administración farmacéutica, tales como portadores, estabilizadores, diluyentes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, excipientes y similares.

60 Los términos "sujeto" o "paciente" utilizados indistintamente en el presente documento abarcan mamíferos, incluyendo, entre otros, los seres humanos, los primates no humanos, los roedores (tales como ratas, ratones y cobayas) y similares. En algunas realizaciones de la invención, el sujeto es un ser humano.

65 La dosis de un agente activo de la invención puede calcularse basándose en estudios en seres humanos u otros mamíferos realizados para determinar la eficacia y/o las cantidades efectivas del agente activo. La cantidad de la dosis y la frecuencia o el momento de la administración pueden determinarse por procedimientos conocidos en la técnica y pueden depender de factores tales como la forma farmacéutica del agente activo, la vía de administración, si se utiliza sólo un agente activo o múltiples agentes activos (por ejemplo, la dosis de un primer agente activo requerida puede ser menor cuando dicho agente se utiliza en combinación con un segundo agente activo), y las características del paciente, incluyendo la edad, el peso corporal o la presencia de cualquier condición médica que afecte al metabolismo del fármaco.

En una realización, puede administrarse una dosis única. En otra realización, se pueden administrar múltiples dosis durante un periodo de tiempo, por ejemplo, a intervalos específicos, tal como cuatro veces al día, dos veces al día, una vez al día, semanalmente, mensualmente, y similares.

5 **Características clínicas de la pérdida de audición.** La hipoacusia y la sordera hereditarias pueden ser conductivas, neurosensoriales o una combinación de ambas; sindrómicas (asociadas a malformaciones del oído externo u otros órganos o a problemas médicos que afectan a otros sistemas orgánicos) o no sindrómicas (sin anomalías visibles asociadas del oído externo ni problemas médicos relacionados); y prelocutivas (antes de que se desarrolle el lenguaje) o postlocutivas (después de que se desarrolle el lenguaje) (Richard JH Smith, MD, et al. (2104) Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview. GeneReviews).

10 **Diagnóstico/pruebas.** Las formas genéticas de pérdida de audición deben distinguirse de las causas adquiridas (no genéticas) de pérdida de audición. Las formas genéticas de la pérdida de audición se diagnostican mediante un examen otológico, audiológico y físico, los antecedentes familiares, pruebas auxiliares (por ejemplo, un TAC del hueso temporal) y pruebas genéticas moleculares. Las pruebas genéticas moleculares, posibles para muchos tipos de sordera sindrómica y no sindrómica, desempeñan un papel destacado en el diagnóstico y el asesoramiento genético.

15 20 Pruebas seleccionadas para medir la pérdida auditiva:

1. **Otoemisiones acústicas de productos de distorsión (DPOAE).** Las otoemisiones acústicas de productos de distorsión (DPOAE) son respuestas generadas cuando la cóclea es estimulada simultáneamente por dos frecuencias de tonos puros cuya relación se sitúa entre 1,1 y 1,3. Estudios recientes sobre el mecanismo de generación de las DPOAE han subrayado la presencia de dos componentes importantes en la respuesta DPOAE, uno generado por una "distorsión" de intermodulación y otro generado por una "reflexión".

25 La prevalencia de DPOAEs es del 100% en oídos adultos normales. Las respuestas de los oídos izquierdo y derecho suelen estar correlacionadas (es decir, son muy similares). En sujetos normales, las mujeres presentan DPOAEs de mayor amplitud. Los procedimientos de envejecimiento tienen un efecto sobre las respuestas DPOAE al disminuir la amplitud DPOAE y estrechar el espectro de respuesta DPOAE (es decir, las respuestas a frecuencias más altas disminuyen gradualmente). Los DPOAE también pueden registrarse en otras especies animales utilizadas en la investigación clínica, como lagartos, ratones, ratas, cobayas, chinchillas, pollos, perros y monos. (Sitio web sobre otoemisiones acústicas).

30 35 2. **Respuesta auditiva del tronco encefálico (ABR).** La prueba de respuesta auditiva del tronco encefálico (ABR) proporciona información sobre el oído interno (cóclea) y las vías cerebrales de la audición. Esta prueba también se denomina a veces potencial evocado auditivo (PEA). La prueba puede utilizarse con niños u otras personas que tengan dificultades con los procedimientos conductuales convencionales de exploración auditiva. El ABR también está indicado para una persona con signos, síntomas o quejas que sugieran un tipo de pérdida auditiva en el cerebro o en una vía cerebral. La prueba se utiliza tanto en seres humanos como en animales. El ABR se realiza pegando electrodos en la cabeza -similares a los que se colocan alrededor del corazón cuando se realiza un electrocardiograma- y registrando la actividad de las ondas cerebrales en respuesta al sonido. La persona sometida a la prueba descansa tranquilamente o duerme mientras se realiza la prueba. No es necesario responder. El ABR también puede utilizarse como prueba de cribado en los programas de cribado auditivo de recién nacidos.

40 45 Cuando se utiliza como prueba de cribado, sólo se comprueba un nivel de intensidad o sonoridad, y el bebé pasa o no pasa la prueba. (Página web de la American Speech-Language-Hearing Association).

50 **Manifestaciones clínicas de la pérdida de audición.** La pérdida de audición se describe por tipo y aparición:

**Tipo**

- La pérdida de audición conductiva es el resultado de anomalías del oído externo y/o de los huesecillos del oído medio.
- La pérdida auditiva neurosensorial es el resultado de un mal funcionamiento de las estructuras del oído interno (es decir, la cóclea).
- La pérdida auditiva mixta es una combinación de pérdida auditiva conductiva y neurosensorial.
- La disfunción auditiva central es el resultado de un daño o disfunción a nivel del octavo nervio craneal, el tronco cerebral auditivo o la corteza cerebral.

**Inicio**

- La pérdida auditiva prelingual se produce antes de que se desarrolle el habla. Todas las pérdidas auditivas congénitas (presentes al nacer) son prelinguales, pero no todas las pérdidas auditivas prelinguales son congénitas.

- La pérdida de audición postlingual se produce después del desarrollo del habla normal.

(Richard JH Smith, MD, et al.; Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview; GeneReviews; Publicación inicial: 14 de febrero de 1999; Última revisión: 9 de enero de 2014.)

- 5 **Gravedad de la pérdida de audición.** La audición se mide en decibelios (dB). El umbral o marca de 0 dB para cada frecuencia se refiere al nivel al que los adultos jóvenes normales perciben una ráfaga de tonos el 50% de las veces. Se considera que la audición es normal si los umbrales de un individuo están dentro de los 15 dB de los umbrales normales. La gravedad de la pérdida auditiva se clasifica como se indica en la Tabla 4.

Tabla 4. Gravedad de la pérdida auditiva en decibelios (dB)	
Gravedad	Umbral auditivo en decibelios
Leve	26-40 dB
Moderado	41-55 dB
Moderado Grave	56-70 dB
Grave	71-90 dB
Profundo	90 dB

- 10 **Porcentaje de discapacidad auditiva.** Para calcular el porcentaje de hipoacusia, se restan 25 dB de la media de tonos puros de 500 Hz, 1000 Hz, 2000 Hz, 3000 Hz. El resultado se multiplica por 1,5 para obtener un nivel específico para cada oído. La deficiencia se determina ponderando el mejor oído cinco veces el peor oído (véase la Tabla 5). Dado que el habla conversacional se sitúa aproximadamente a 50-60 dB HL (nivel de audición), el cálculo de la discapacidad funcional basado en promedios de tonos puros puede inducir a error. Por ejemplo, una pérdida auditiva de 45 dB es funcionalmente mucho más significativa de lo que implica un 30%. Una escala de valoración diferente es apropiada para los niños pequeños, para quienes incluso una pérdida auditiva limitada puede tener un gran impacto en el desarrollo del lenguaje [Northern & Downs 2002].

15 **Tabla 5. Porcentaje Deficiencia auditiva**

% Deterioro	Promedio de tonos puros (dB)*	% Audición residual
100%	91 dB	0%
80%	78 dB	20%
60%	65 dB	40%
30%	45 dB	70%

\* Tono puro medio de 500 Hz, 1000 Hz, 2000 Hz, 3000 Hz

**Frecuencia de la pérdida auditiva .** La frecuencia de la pérdida auditiva se designa como:

- 20 • Bajo (<500 Hz)  
• Medio (501-2000 Hz)  
• Alta (>2000 Hz)

- 25 **Terapia génica.** La terapia génica consiste en introducir ADN en un paciente para tratar una enfermedad genética. El nuevo ADN suele contener un gen funcional para corregir los efectos de una mutación causante de enfermedad en el gen existente. La transferencia de genes ya sea con fines experimentales o terapéuticos, se basa en un vector o sistema de vectores para transportar la información genética a las células objetivo. El vector o sistema vectorial se considera el principal determinante de la eficacia, especificidad, respuesta del huésped, farmacología y longevidad de la reacción de transferencia génica. Actualmente, la forma más eficiente y eficaz de lograr la transferencia de genes es mediante el uso de vectores o sistemas de vectores basados en virus que se han hecho defectuosos para la replicación (Publicación PCT No. WO 2015/054653; Methods of Predicting Ancestral Virus Sequences and Uses Thereof).

- 30 **Vectores.** Hasta la fecha, el adenovirus, el virus adenoasociado, el virus del herpes simple, el virus vaccinia, el retrovirus, el adenovirus helper dependiente y el lentivirus han sido probados para la administración de genes cocleares. De ellos, el que ha demostrado más potencial es el virus adenoasociado (AAV): no se replica, puede transferir transgenes al oído interno de forma eficaz y no causa ototoxicidad. En particular, el AAV puede transfectar eficazmente las células ciliadas internas, una característica crítica si se espera corregir defectos genéticos debidos a mutaciones específicas de las células ciliadas. Hasta la fecha, se han utilizado con éxito varios subtipos diferentes de AAV para la administración de genes cocleares, demostrando un daño mínimo o nulo en el órgano de Corti. Un

informe reciente en el que se estudiaron los serotipos 1, 2, 5, 6 y 8 del AAV demostró que la expresión génica en las células ciliadas, las células de sostén, el nervio auditivo y el ligamento espiral era satisfactoria, siendo las células ciliadas las que se transducían con mayor eficacia (Lawrence R. Lustig, MD y Omar Akil, PhD (2012) Cochlear Gene Therapy. *Curr Opin Neurol.* 25(1): 57-60). Los ejemplos de vectores AAV que pueden administrarse al oído interno se describen con más detalle en la Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2013/0095071.

5 El tamaño del gen objetivo que puede corregirse está limitado por la capacidad de carga del AAV (Wu, Yang y Colosi, 2010). A efectos de traducción, esto limita los objetivos potenciales a aquellos trastornos genéticos causados por genes relativamente pequeños (<4.6 kB) que causan pérdida de audición recesiva. Como enfoque 10 inicial para desarrollar un fármaco de terapia génica, la mutación del gen objetivo debe ser relativamente común y la pérdida de audición debe producirse después del desarrollo del lenguaje. Identificar a los pacientes con pérdidas de audición progresivas que reúnen estas características ofrece la oportunidad de intervenir y detener o posiblemente invertir la progresión de su pérdida. Se han iniciado ensayos de terapia génica del oído interno en 15 humanos para la sordera adquirida, por lo que se están abordando muchos de los problemas de seguridad y administración (identificador de ensayos clínicos NCT02132130). La creciente disponibilidad y precisión de las pruebas genéticas permitirá identificar a los pacientes que pueden beneficiarse de este tipo de intervenciones (Preciado et al., 2005).

20 **Modelos de terapia génica en ratones:** Se han rescatado varios modelos de ratón de sordera genética recesiva mediante terapia génica. Algunos ejemplos son la corrección de las pérdidas auditivas inducidas por mutaciones en VGLUT3, TLC1, whirlin, clarin 1 (Akil et al., 2012; Askew et al., 2015; Chien et al., 2016; Geng et al., 2017; Isgrig et al., 2017). Todos estos modelos requieren la administración del vector en el oído interno neonatal del ratón antes 25 de la maduración de la audición y antes de la degeneración de las células ciliadas del oído interno. Esto indica que para rescatar la audición mediante una estrategia de terapia génica, los trastornos objetivo deben ser al menos lentamente progresivos en humanos para permitir la administración de la terapia antes de la pérdida de audición y la degeneración de las células objetivo.

30 **Las mutaciones de TMPRSS3 inducen pérdida de audición:** La pérdida de audición relacionada con mutaciones en TMPRSS3 (DFNA8/10) puede presentarse en una variedad de fenotipos diferentes. Se han descrito tanto hipoacusias profundas congénitas como hipoacusias progresivas de aparición en la edad adulta (Weegerink et al., 2011). Actualmente, se desconoce el mecanismo por el que se produce la disfunción de Tmprss3. Se han desarrollado dos modelos de ratón que datan de la pérdida de audición al nacer y otro con inicio de la pérdida de audición en un momento ligeramente posterior, pero aún antes de la maduración de la audición y del ratón. 35 Fasquelle et al. generaron un ratón mutante inducido por etil-nitrosourea portador de una mutación sin sentido truncadora de proteína en Tmprss3. Esto demostró la pérdida de células ciliadas y la degeneración de la audición en el día postnatal 12, alrededor del momento de maduración de la audición. Además, las células ciliadas saculares se vieron afectadas y se observó una degeneración retardada de las células ganglionares espirales (Fasquelle et al., 2011). En el modelo de ratón no está claro si la degeneración del ganglio espiral está relacionada con la degeneración del órgano de Corti o se debe a una disfunción de Tmprss3 en el ganglio espiral. Varios estudios han 40 evaluado la distribución de Tmprss3 dentro del oído interno del ratón y demuestran en gran medida la presencia de Tmprss3 en células ciliadas y células ganglionares espirales (Fan, Zhu, Li, Ji, & Wang, 2014; Fasquelle et al., 2011). La expresión de Tmprss3 de ratón se evaluó en ratones C57Bl/6 de 1 mes de edad utilizando el anticuerpo anti-TMPRSS3 (1:100, ab167160, Abcam, Cambridge, MA). Se observó marcaje en las células ciliadas internas y externas, en la estria vascular y en aproximadamente 50% de las células ganglionares espirales (Fig. 5). Esto sugiere que la pérdida de la función de Tmprss3 podría provocar además la pérdida de la función estrial, aunque 45 no se observaron cambios en el potencial endococlear en el modelo de ratón Fasquelle (Fasquelle et al., 2011).

50 Los estudios de genotipo-fenotipo de Tmprss3 demuestran una amplia gama de diferentes formas de pérdida auditiva que van desde pérdidas auditivas congénitas profundas hasta pérdidas auditivas progresivas de aparición adulta (Chung et al., 2014; Gao et al., 2017; Weegerink et al., 2011). Los estudios sugieren que la pérdida de audición debida a mutaciones en Tmprss3 puede suponer hasta 2 hasta 5% de los pacientes sometidos a implante coclear en adultos (Jolly et al., 2012; Miyagawa, Nishio, & Usami, 2016; Sloan-Heggen et al., 2016). Muchos de los pacientes con estas mutaciones tienen cantidades significativas de audición residual. Esto la convertiría en un objetivo atractivo para una posible terapia de rescate, ya que habría un sustrato de células que podrían tratarse. 55 Existen algunos estudios divergentes sobre el éxito de la implantación coclear en pacientes con esta mutación. Al menos algunas formas de hipoacusia inducidas por la pérdida de Tmprss3 pueden no evolucionar tan bien con el implante coclear como otras formas de sordera genética (Shearer et al., 2017). Esto está potencialmente relacionado con el hecho de que este gen se expresa tanto en las células ciliadas como en hasta 50% de las células ganglionares espirales (véase la Fig. 5). Estas discrepancias deben tenerse en cuenta a la hora de elegir 60 un sistema de vectores para la administración. Se ensayarán vectores con fuerte tropismo por células ciliadas y tropismo combinado por células ciliadas y ganglios espirales. También se han observado diferencias en el tropismo del vector al comparar el punto del oído interno neonatal y adulto (Shu, Tao, Li, et al., 2016; Shu, Tao, Wang, et al., 2016a). Dado que la población clínica objetivo son los seres humanos con un sistema auditivo maduro, en el 65 presente documento se divulga un modelo de ratón con pérdida de audición de inicio posterior a la maduración de la audición que puede utilizarse como modelo tanto para la progresión de la enfermedad (véase el Ejemplo 1) como para la administración de una terapia de rescate en la cóclea adulta (véase el Ejemplo 2).

**Serotipos de AAV para su administración en el oído interno:** Se ha demostrado que una amplia variedad de serotipos diferentes de AAV son útiles para transfectar tejido del oído interno (György et al., 2017; Shu, Tao, Wang, et al., 2016b; Xia, Yin, & Wang, 2012). Existen claras diferencias en la distribución del transgén entregado por el vector en animales neonatos y adultos y, además, hay diferencias en la entrega a la perilinfa frente a la endolinfa cuando se evalúa la transfección de células ciliadas (Kilpatrick et al., 2011; Wang et al., 2013). En los modelos de ratón, la administración del vector en la endolinfa mejora la transfección de las células ciliadas, pero provoca una pérdida de audición residual, lo que dificulta la modelización de una pérdida de audición progresiva. Potencialmente, en animales más grandes o en humanos, el vector podría administrarse en el saco endolinfático sin causar pérdida de audición, aumentando así la eficacia de la transfección (Colletti et al., 2010). A efectos de los estudios previstos, la administración en la perilinfa permitiría evaluar la audición del ratón. Se ha demostrado que el AAV2 llega a las células ciliadas y a las células ganglionares espirales en animales adultos (Tao et al., 2017). Una ventaja adicional del AAV2 es que ya cuenta con un amplio historial y datos de seguridad en ensayos clínicos de terapia génica humana (Santiago-Ortiz & Schaffer, 2016). Recientemente, diversos estudios han demostrado que el AAV sintético (AAV2/Anc80) produce una entrega mejorada a las células ciliadas, pero puede no proporcionar una entrega equivalente al ganglio espiral que el AAV2 nativo (Landegger et al., 2017; Suzuki, Hashimoto, Xiao, Vandenbergh, & Liberman, 2017). La invención proporciona un modelo de ratón con pérdida de audición de inicio en la edad adulta y comparar si la terapia génica AAV2 o AAV2/Anc80 Tmprss3 produce un mejor rescate de la audición y de la función del ganglio espiral.

**Células madre pluripotentes inducidas (iPSCs).** Una célula madre pluripotente inducida (IPS o IPSC) es una célula madre que se ha creado a partir de una célula adulta, tal como una célula de la piel, el hígado, el estómago u otra célula madura, mediante la introducción de genes que reprograman la célula y la transforman en una célula que tiene todas las características de una célula madre embrionaria. El término pluripotente hace referencia a la capacidad de una célula para dar lugar a múltiples tipos celulares, incluyendo los tres linajes embrionarios que forman los órganos, el sistema nervioso, la piel, los músculos y el esqueleto del cuerpo.

**Edición genética CRISPR/Cas9.** Los procedimientos descritos en el presente documento también contemplan el uso de la edición del genoma CRISPR/Cas9 para rescatar la audición mediante la edición de la mutación del gen Tmprss3 o la mutación del gen LOXHD1. Esta tecnología se ha utilizado para rescatar con éxito la audición en dos modelos genéticos de ratón con pérdida de audición (Tmc1 y Pmca2) (Askew, C et al. (2015) Tmc gene therapy restores auditory function in deaf mice. *Sci Transl Med.* 7(295):295ra108). Aunque la tecnología se ha utilizado principalmente para tratar la pérdida de audición dominante, puede desarrollarse para tratar la pérdida de audición recesiva y restaurar la audición en el modelo de ratón activado Tmprss3 y, en última instancia, en seres humanos con pérdida de audición causada por una mutación en el gen Tmprss3 o en el gen LOXHD1. El uso de la edición genética CRISPR/Cas9 para reparar secuencias genéticas defectuosas se describe con más detalle en Publicación PCT No. WO 2016/069910, Publicación PCT No. WO 2015/048577y Publicación de Solicitud de EE.UU. No. 2015/0291 966.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1 - MODELO DE RATÓN DE LA MUTACIÓN Tmprss3 QUE REFLEJA LA PÉRDIDA DE AUDICIÓN PROGRESIVA DE APARICIÓN POSTNATAL QUE SE OBSERVA EN LOS PACIENTES

**Mutación dirigida de una mutación Tmprss3 humana [c.916G>A (p.Ala306Thr)] con el sistema CRISPR/Cas9 en el ratón:** Los modelos de ratón existentes tienen una inactivación completa del gen Tmprss3 que provoca una pérdida de audición congénita o una degeneración de las células ciliadas al inicio de la audición, el día postnatal 12 (Fasquelle et al., 2011). Este ejemplo describe el desarrollo de un ratón activado portador de una mutación Tmprss3 humana. La c.916G>A (p.Ala306Thr) en Tmprss3 es la mutación más común que se ha identificado en más de 10 familias de diferentes etnias de pacientes sordos chinos, alemanes, holandeses y coreanos, lo que sugiere que esta mutación es la principal contribuyente al fenotipo DFNB8/DFNB10 (Chung et al., 2014; Elbracht et al., 2007; Gao et al., 2017; Weegerink et al., 2011). Se generará un modelo de ratón portador de la mutación humana mediante la técnica CRISPR/Cas9, tal y como se describe en detalle en el estudio previo de Harms et al. (Harms et al., 2014). Brevemente, las herramientas de diseño de ARN guía (ARNg) se utilizan para elegir los ARNg apropiados para el gen y la mutación de interés; un proveedor de servicios elegirá y sintetizará el ARNg con la mínima edición prevista de sitios genómicos fuera del objetivo, junto con cebadores para amplificar el locus genómico de interés y otros sitios genómicos fuera del objetivo previstos.

Una vez establecidos, los ratones serán genotipados y evaluados para pérdida auditiva a las 2, 4 y 12 semanas de edad usando ABR y DPOAEs. En el caso de la pérdida de audición de aparición tardía, la comparación de las pruebas ABR y DPOAE puede demostrar si la reducción de la función de Tmprss3 afecta de forma asimétrica a la función de las células ciliadas o del ganglio espiral. Esto afectaría a la elección del vector para el desarrollo clínico, dada la observación de Shearer et al. (Shearer et al., 2017). Aunque no es un fenotipo prominente en humanos, los mutantes de ratón han mostrado una degeneración sutil de las células ciliadas saculares. La evaluación histológica del sistema vestibular y las pruebas de rotarod se utilizarán para detectar disfunciones del equilibrio. La expresión de Tmprss3 mutante en las cócleas se determinará mediante RT PCR cuantitativa. Los resultados se analizarán para ratones de tipo silvestre y homocigotos Tmprss3 c.916G>A. Se llevarán a cabo análisis histológicos

5 e inmunohistoquímicos de la cóclea de día 3 postnatal y de 2, 4 y 12 semanas de edad para identificar patrones de pérdida de células ciliadas. Basándose en los datos histológicos, se seleccionarán puntos temporales para el análisis de la supervivencia de las células ciliadas en el montaje completo, con el fin de determinar si existen gradientes de supervivencia de las células ciliadas de basales a apicales. Si está indicado, los especímenes también pueden evaluarse mediante microscopía electrónica de barrido para evaluar la morfología del haz estereociliar. El análisis estadístico se llevará a cabo mediante Graphpad Prism versión 7 utilizando ANOVA para medidas repetidas. Uso estimado de animales n=10 por punto temporal para los mutantes y n=3 para los controles.

10 El establecimiento de un curso temporal de la pérdida de audición inducida por [c.916G>A (p.Ala306Thr)] establecerá los puntos temporales para realizar estudios de rescate. Si tiene éxito, también definiría el curso temporal de los estudios preclínicos de seguridad laterales.

15 Si la mutación objetivo provoca una pérdida de audición congénita completa en el ratón, puede diseñarse un ratón inactivado inducible. Dado que los humanos muestran fenotipos muy variables, esto también puede observarse en el ratón, lo que dificulta el análisis estadístico. Para los experimentos de rescate, esto podría solucionarse utilizando la oreja contralateral no tratada como control. Alternativamente, el papel de Tmprss3 puede evaluarse en un modelo de iPSC humanas (como se describe en el Ejemplo 4). La progresión de la pérdida de audición también puede retrasarse, en cuyo caso la observación experimental se prolongará hasta los 6 meses de edad.

20 **EJEMPLO 2 - EVALUAR SI LA PÉRDIDA DE AUDIÓN Y EN ESTE MODELO DE RATÓN PUEDE DETENERSE O REVERTIRSE MEDIANTE TERAPIA GÉNICA TMPRSS3**

25 Se ha propuesto una serie de vectores para administrar genes al oído interno. Para la administración a largo plazo de genes más pequeños, se han estudiado ampliamente los vectores AAV, que son seguros y permiten la administración a una amplia gama de células. Sin embargo, se ha demostrado que la administración de AAV a las células ciliadas externas es incompleta, incluso con títulos más altos de vector. Recientemente se ha desarrollado un vector viral sintético AAV2/Anc80 asociado a adeno que proporciona una buena administración a las células ciliadas internas y externas. Se probarán dos sistemas de vectores diferentes, uno basado en la posibilidad de que la función Tmprss3 también deba rescatarse en el ganglio espiral. Se comparará el rescate de la audición en el modelo de ratón utilizando estos dos sistemas de vectores. Los resultados potenciales incluyen el rescate de DPOAEs con ABRs pobres en el caso de AAV2/Anc80, lo que indicaría la necesidad de tratar el ganglio espiral además de las células ciliadas. En resumen, el vector se administrará a una canalostomía del canal semicircular posterior entre una y dos semanas antes del inicio documentado de la pérdida de audición según los resultados del Ejemplo 1. Se inyectarán tres concentraciones diferentes de vector a diferencias logarítmicas de pliegues 30 utilizando una microbomba. La audición de los animales se evaluará con ABR seriados y DPOAEs en los puntos temporales determinados en el Ejemplo 1. Entre los 3 y los 6 meses de edad, se evaluará la supervivencia de las células ciliadas mediante histología, inmunohistoquímica y montaje completo de la cóclea. Los controles consistirán en animales tratados únicamente con vectores que expresen GFP (AAV2.hCMV.GFP o AAV2/Anc80.hCMV.GFP). 35 Si los ratones demuestran adicionalmente cualquier vestibular también serán evaluados por la histología del sistema vestibular y las pruebas de rotarod. Además, se evaluará la toxicidad del tratamiento con Tmprss3 transfectando ratones de tipo silvestre con ambos vectores que expresan Tmprss3. El análisis estadístico se llevará a cabo mediante Graphpad Prism versión 7 utilizando ANOVA para medidas repetidas. Los resultados se evaluarán en función del título de audición por vector. Uso estimado de animales n=60 por punto temporal (2 vectores, 3 concentraciones de vector; histología y evaluación de montaje completo) para mutantes y n=3 para controles. Los 40 estudios de sobreexpresión utilizarán n=5 animales con 2 vectores.

45 Se espera que la terapia génica Tmprss3 prevenga la progresión de la pérdida auditiva. Puede haber diferencias en los distintos vectores para rescatar la audición, así como efectos de dosificación.

50 Si se descubre que el rescate de la audición es incompleto, se pueden diseñar vectores diferentes. Potencialmente, puede ser necesario optimizar la expresión de Tmprss3 utilizando promotores de diferente potencia o incluyendo las regiones reguladoras de Tmprss3. Potencialmente, la terapia génica Tmprss3 puede tener que suministrarse al oído interno en un momento muy temprano.

55 **Evaluación de un sistema de administración de AAV2 TMPRSS3:** El TMPRSS3 humano (BC074847) dirigido por el promotor CMV humano (HCMV) se clonó en un sistema de vector AAV2. El vector se purificó en un gradiente de cloruro de cesio. Los títulos se determinaron mediante pPCR ( $1,1 \times 10^{13}$  GC/ml). Tras la síntesis y purificación, el vector se alicuotó en volúmenes de 20 µl y se almacenó en PBS en glicerol al 5% a -80°C.

60 **Desarrollo de un sistema de ensayo para la administración de TMPRSS3:** Con el fin de evaluar la eficacia de la función del vector, quisimos desarrollar un sistema para ensayar la producción de TMPSS3. Esto también serviría para evaluar posteriores diseños de vectores con diferentes promotores y para evaluar la estabilidad del vector. Las líneas celulares presentan diferencias en la eficiencia de transfección con diferentes serotipos de AAV (Ellis et al., 2013). Se examinaron diversas líneas celulares para comprobar su capacidad de transfección con AAV2. Por desgracia, muchas de las líneas celulares utilizadas habitualmente que son transfectables con AAV2 expresan TMPRSS3 nativa. Se examinaron diversas líneas celulares de cáncer humano en las que se había confirmado

mediante ARNseq que no expresaban TMPRSS3. Se encontraron células primarias de angiofibroma nasofaríngeo juvenil (JNA) transfectadas con AAV2hcmv.gfp. Las células se sembraron en matraces T-75 con DMEM y un 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se mantuvieron a 37 °C y un 5% de CO<sub>2</sub>. Los medios se cambiaban cada 48 horas. Cuando las células alcanzaron P4 y eran confluentes al 90-100%, 5 se añadieron 3 ml de tripsina al 0,05% para lavar, se aspiraron y luego se añadieron 3 ml de tripsina para eliminar las células. La incubación se realizó a 37 grados durante 3-5 minutos. La tripsina se neutralizó con 10%FBS/DMEM. La solución de células se recogió en un vial cónico de 15 ml y se centrifugó a 1.200 rpm durante 5 minutos a 4 10 grados. A continuación, se suspendieron las células en 10 ml de FBS/DMEM al 10% y se sembraron, dejando 24 horas para que se adhirieran. La transducción de AAV2-TMPRSS3 se realizó sembrando las células en portaobjetos Millicell EZ Slides de 4 pocillos (PEZGS0416, MilliporeSigma, Burlington, MA) con una concentración de 2ul/ml de AAV2.hcmv.TMPRSS3 en 500μl de medio. El medio celular se cambió a las 24 horas y después cada 48 horas tras la transfección hasta que se analizaron las células.

15 **Inmunocitoquímica de células transfectadas con AAV2-TMPRSS3:** Las células JNA transfectadas se lavaron inicialmente con PBS y luego se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las células se bloquearon y permeabilizaron con Tritón - X 100 al 1% / albúmina de suero bovino al 1% / suero normal al 10% durante una hora a temperatura ambiente. El anticuerpo primario (1:100, ab 167160, Abcam, Cambridge, MA 1:50, GTX81644, GeneTex, Irvine, CA) se incubó durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS y se marcaron con Alexa Fluor 488 (1:500, Invitrogen, Carlsbad, CA). Al día siguiente, 20 las células se lavaron con PBS y se marcaron con Alexa Fluor 488 (1:500, Invitrogen, Carlsbad, CA). Estas células se lavaron con PBS y se tiñeron con el medio de montaje ProLong Gold antifade (Invitrogen, Carlsbad, CA) con 0,2 pg/ml de 4',6-diamidino-2-fenilindol.

25 **Construcción de AAV/Anc80-TMPRSS3-IRES-GFP.** Clonaremos un ADNc completo de TMPRSS3 humano en un vector AAV/Anc80 con un marcador eGFP para que las células infectadas con el virus puedan rastrearse mediante la expresión de GFP. Hemos obtenido un ADNc humano de longitud completa de TMPRSS3 con la secuencia verificada. Utilizaremos el vector AAV/Anc80 para la clonación. Previamente se clonó un gen ISL1 humano en el mismo vector y se inyectó AAV/Anc80-ISL1-IRES-GFP en oídos internos de ratones neonatos y adultos mediante coeleostomía y canalostomía, respectivamente. El AAV/Anc80 permite la liberación de genes en 30 células ciliadas neonatales y adultas de forma eficaz, sin causar daños en las células ciliadas ni pérdida de audición. La expresión adicional del transgén se mantiene en el tiempo, lo que es ideal para nuestro objetivo de expresar el gen TMPRSS3 en las células ciliadas Tmprss3<sup>-/-</sup> para restaurar la expresión génica y recuperar la audición (Shu et al., 2016; Tao et al., 2017).

35 Tras la clonación de TMPRSS3 en el vector de AAV/Anc80-TMPRSS3-IRES-GFP, el vector se amplificará y empaquetará, con el objetivo de alcanzar un título viral de 10<sup>12</sup>. Primero probaremos el virus AAV/Anc80-TMPRSS3-IRES-GFP infectando células humanas. Realizaremos el inmunomarcaje con un anticuerpo anti-TMPRSS3 y lo co-localizaremos con GFP, para examinar si TMPRSS3 y GFP se expresan en las mismas células. Para el estudio *in vivo*, probaremos el vector inyectándolo en el oído interno neonatal de tipo silvestre mediante coeleostomía y en el oído interno adulto mediante canalostomía, respectivamente. Dos semanas después de la 40 inyección, se recogerán las cócleas de los ratones para examinar si las señales de GFP se limitan a las células ciliadas. En nuestros estudios anteriores, observamos una fuerte expresión de GFP en el 100% de las células ciliadas internas y una expresión moderada en más del 95% de las células ciliadas externas. Por tanto, esperamos observar un patrón de expresión similar con el gen TMPRSS3.

45 Posteriormente se inyectará AAV/Anc80-TMPRSS3-GFP en la cóclea Tmprss3<sup>-/-</sup> mediante coeleostomía y se estudiará la audición un mes después. Esperamos observar una mejor audición en los oídos internos inyectados en comparación con los oídos internos de control no inyectados. Esto será evidente sobre todo si los ratones Tmprss3<sup>-/-</sup> sufren una pérdida de audición profunda de aparición temprana. Si la pérdida de audición en los Tmprss3<sup>-/-</sup> es progresiva y de aparición tardía, es posible que comencemos a observar un rescate auditivo en una 50 fase posterior, por ejemplo, a los 2 y 3 meses de edad. Los estudios auditivos se llevarán a cabo mediante ABR y DPOAE. Si los umbrales ABR y DPOAE son significativamente más bajos en cualquier frecuencia en los oídos inyectados, es una indicación de rescate auditivo mediado por AAV en ratones Tmprss3<sup>-/-</sup>. Seguiremos la progresión del rescate auditivo durante 6 meses, para determinar si la recuperación auditiva es sostenida.

55 En los ratones Tmprss3<sup>-/-</sup>, las células ciliadas acabarán muriendo. Con la administración de genes mediada por AAV, es probable que la recuperación de la función de las células ciliadas conduzca a su supervivencia a lo largo del tiempo, lo que se confirmará mediante el recuento de células ciliadas a lo largo de la extensión de la cóclea. Esperamos ver un número significativamente mayor de células ciliadas en las cócleas inyectadas en comparación con las cócleas de control no inyectadas. La comparación de los resultados auditivos y la supervivencia celular 60 determinará cuál es el vector y la dosis de vector óptimos para la terapia de rescate.

### EJEMPLO 3 - TMPRSS3

65 **DESARROLLO DE UN MODELO DE RATÓN MUTANTE TMPRSS3.** El desarrollo de un modelo de ratón que se asemeje lo más posible a la condición humana es clave para la terapia futura. Un modelo de ratón inactivo Tmprss3 está disponible en vendedores comerciales y puede utilizarse en los experimentos descritos en estos Ejemplos,

sin embargo, será más relevante desarrollar un modelo de ratón que alberga una mutación humana conocida por causar pérdida de audición, como se ha descrito anteriormente. Se espera que el modelo demuestre que la mutación humana causa pérdida de audición en el ratón igual que en el ser humano, lo que hace que el modelo sea valioso para estudiarse con fines terapéuticos. Los procedimientos para producir líneas de ratones transgénicos se utilizan habitualmente en la técnica y son conocidos por los expertos en la técnica. Y lo que es más importante, el tiempo necesario para generar un modelo de ratón se ha acortado considerablemente, pasando de una media de 2 años hace unos pocos años a unos pocos meses en la actualidad con el uso de la tecnología CRISPR/Cas9. Así, el tiempo que se tarda en producir un modelo de ratón ya no es un factor limitante. Proponemos crear un modelo de ratón TMPRSS3 portador de una mutación humana para nuestro estudio. En los ratones sin TMPRSS3, las células ciliadas mueren y los ratones presentan una pérdida auditiva profunda. Tras la creación del modelo de ratón activador Tmprss3, estudiaremos la supervivencia de las células ciliadas y la pérdida de audición mediante ABR y DPOAE. Si el modelo de ratón muestra una pérdida de audición progresiva por la pérdida de células ciliadas, es la demostración de que hemos generado el modelo de ratón Tmprss3 para DFNB8 humano.

**15 PRODUCIR AAV-TMPRSS3 PARA TERAPIA GÉNICA.** Utilizaremos la terapia génica mediada por AAV para tratar ratones mutantes Tmprss3. Hemos identificado dos vectores AAV (Anc80 y AAV2) para el estudio, pero también pueden probarse otros vectores de expresión, tal como un vector adenoviral, un vector viral del herpes simple, un vector viral de la vaccinia, un vector adenoviral helper dependiente, un vector lentiviral u otros vectores virales adenoasociados, tales como AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh8, AA Vrh10, AAVrh39, AAVrh43, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 o AAV8. Tanto el Anc80 como el AAV2 son muy eficaces para introducir genes en las células ciliadas neonatales de mamíferos sin afectar negativamente a la audición normal. Además, recientemente se ha demostrado que ambos pueden utilizarse para liberar genes en células ciliadas de ratones adultos sin afectar a la audición normal (Zinn, E. et al., *In Silico Reconstruction of the Viral Evolutionary Lineage Yields a Potent Gene Therapy Vector*, *Cell Rep.* 2015 Ago 11;12(6): 1056-68; y Askew, C. et al., *Tmc gene therapy restores auditory function in deaf mice*, *Sci Transl Med.* 2015 Jul 8;7(295):295ra108). Clonaremos un ADNC de TMPRSS3 humano en un vector para producir virus AAV- TMPRSS3. Realizaremos un estudio para demostrar que la TMPRSS3 se produce mediante un sistema de cultivo in vitro. Tras la confirmación, el AAV-TMPRSS3 se inyectará en el oído interno de ratones neonatos de tipo silvestre para demostrar que no tiene efectos adversos, lo que se demostrará mediante el análisis celular del oído interno y el estudio de la audición (ABR y DPOAE).

**30 ESTUDIO DE AAV-TMPRSS3 EN LA RESTAURACIÓN DE LA AUDICIÓN.** Inyectaremos AAV-TMPRSS3 en el oído interno neonatal de ratones mutantes activados Tmprss3. Se realizarán análisis para los ratones inyectados y de control inyectados con AAV-GFP, que incluirán pruebas de audición, estudios celulares y moleculares y efecto a largo plazo. A nivel celular determinaremos si el AAV-TMPRSS3 promueve la supervivencia de las células ciliadas al mes de edad. En los oídos mutantes de control inyectados con AAV-GFP, esperamos ver la pérdida de células ciliadas en este punto temporal. Por el contrario, esperamos que las células ciliadas inyectadas con AAV-TMPRSS3 sobrevivan. Optimizaremos el procedimiento de inyección (cocolectomía, membrana de ventana redonda, canalostomía) y las dosis para una mejor recuperación de la audición. Es importante destacar que realizaremos la inyección en ratones adultos (de 1 a 6 meses de edad) y evaluaremos la recuperación de la audición. Los resultados de la inyección en adultos se compararán con los de neonatos, lo que nos informará sobre la ventana temporal en la que la intervención sigue siendo eficaz.

#### **EJEMPLO 4 - ESTUDIO DE CÉLULAS CAPILARES DERIVADAS DE CÉLULAS MADRE PLURIPOENTES INDUCIDAS EN PACIENTES (CÉLULAS iPS)**

**45** Un aspecto importante del estudio es demostrar que nuestra estrategia funciona con células ciliadas humanas. Como no se dispone de hueso temporal humano para el estudio, en su lugar estableceremos líneas celulares iPS de pacientes utilizando fibroblastos de pacientes, así como fibroblastos de miembros de la familia de control. Se recogerán los fibroblastos de los pacientes con la mutación más frecuente y se establecerán las líneas celulares iPS. Las líneas celulares iPS se diferenciarán en células del oído interno, incluidas las células ciliadas. Con el sistema de cultivo, se utilizará AAV-TMPRSS3 para infectar células ciliadas derivadas de iPS. Se estudiará la supervivencia de las células ciliadas infectadas y la transducción de células ciliadas mediante pinzamientos irregulares. Esperamos observar una mejora de la supervivencia y la función de las células ciliadas, en comparación con las células ciliadas de control no infectadas y no tratadas. El estudio permitirá evaluar la eficacia de la infección por AAV-TMPRSS3 en células ciliadas humanas y la expresión del gen TMPRSS3. Este logro es una demostración de que las células ciliadas humanas defectuosas pueden tratarse con AAV-TMPRSS3, lo que supone un gran paso adelante hacia futuros estudios clínicos.

#### **EJEMPLO 5 - LOXHD1**

**60 DESARROLLO DE UN MODELO DE RATÓN MUTANTE LOXHD1.** El desarrollo de un modelo de ratón que se asemeje lo más posible a la condición humana es clave para la terapia futura. Un modelo de ratón inactivo LOXHD1 será relevante para desarrollar un modelo que alberga una mutación humana conocida por causar pérdida de audición, como se ha descrito anteriormente. Se espera que el modelo demuestre que la mutación humana causa pérdida de audición en el ratón igual que en el ser humano, lo que hace que el modelo sea valioso para estudiarse con fines terapéuticos. Los procedimientos para producir líneas de ratones transgénicos se utilizan habitualmente

en la técnica y son conocidos por los expertos en la técnica. Y lo que es más importante, el tiempo necesario para generar un modelo de ratón se ha acortado considerablemente, pasando de una media de 2 años hace unos pocos años a unos pocos meses en la actualidad con el uso de la tecnología CRISPR/Cas9. Así, el tiempo que se tarda en producir un modelo de ratón ya no es un factor limitante. Proponemos crear un modelo de ratón LOXHD1 portador de una mutación humana para nuestro estudio. En los ratones sin LOXHD1, las células ciliadas mueren y los ratones presentan una pérdida auditiva profunda. Tras la creación del modelo de ratón activador LOXHD1, estudiaremos la supervivencia de las células ciliadas y la pérdida de audición mediante ABR y DPOAE. Si el modelo de ratón muestra una pérdida de audición progresiva por la pérdida de células ciliadas, es la demostración de que hemos generado el modelo de ratón LOXHD1 para DFNB77 humano.

**PRODUCIR AAV-LOXHD1 PARA TERAPIA GÉNICA.** Utilizaremos la terapia génica mediada por AAV para tratar ratones mutantes LOXHD1. Hemos identificado dos vectores AAV (Anc80 y AAV2) para el estudio, pero también pueden probarse otros vectores de expresión, tal como un vector adenoviral, un vector viral del herpes simple, un vector viral de la vaccinia, un vector adenoviral helper dependiente, un vector lentiviral u otros vectores virales adenoasociados, tales como AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh8, AA Vrh10, AAVrh39, AAVrh43, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 o AAV8. Tanto el Anc80 como el AAV2 son muy eficaces para introducir genes en las células ciliadas neonatales de mamíferos sin afectar negativamente a la audición normal. Además, recientemente se ha demostrado que ambos pueden utilizarse para introducir genes en células ciliadas de ratones adultos sin afectar a la audición normal (Zinn, E. et al. (2015) *In Silico Reconstruction of the Viral Evolutionary Lineage Yields a Potent Gene Therapy Vector*. *Cell Rep.* 11;12(6):1056-68y Askew, C. et al. (2015) *Tmc gene therapy restores auditory function in deaf mice*. *Sci Transl Med.* 7(295):295ra108). Clonaremos un ADNc de LOXHD1 humano en un vector para producir virus AAV- LOXHD1. Realizaremos un estudio para demostrar que la LOXHD1 se produce mediante un sistema de cultivo in vitro. Tras la confirmación, el AAV-LOXHD1 se inyectará en el oído interno de ratones neonatos de tipo silvestre para demostrar que no tiene efectos adversos, lo que se demostrará mediante el análisis celular del oído interno y el estudio de la audición (ABR y DPOAE).

**ESTUDIO DE AAV-LOXHD1 EN LA RESTAURACIÓN DE LA AUDICIÓN.** Inyectaremos AAV-LOXHD1 en el oído interno neonatal de ratones mutantes activados LOXHD1. Se realizarán análisis para los ratones inyectados y de control inyectados con AAV-GFP, que incluirán pruebas de audición, estudios celulares y moleculares y efecto a largo plazo. A nivel celular determinaremos si el AAV-LOXHD1 promueve la supervivencia de las células ciliadas al mes de edad. En los oídos mutantes de control inyectados con AAV-GFP, esperamos ver la pérdida de células ciliadas en este punto temporal. Por el contrario, esperamos que las células ciliadas AA V-LOXHD1 inyectadas sobrevivan. Optimizaremos el procedimiento de inyección (colectostomía, membrana de ventana redonda, canalostomía) y las dosis para una mejor recuperación de la audición. Es importante destacar que realizaremos la inyección en ratones adultos (de 1 a 6 meses de edad) y evaluaremos la recuperación de la audición. Los resultados de la inyección en adultos se compararán con los de neonatos, lo que nos informará sobre la ventana temporal en la que la intervención sigue siendo eficaz.

**ESTUDIO DE CÉLULAS CAPILARES DERIVADAS DE CÉLULAS MADRE PLURIPOENTES INDUCIDAS EN PACIENTES (CÉLULAS iPS).** Un aspecto importante del estudio es demostrar que nuestra estrategia funciona con células ciliadas humanas. Como no se dispone de hueso temporal humano para el estudio, en su lugar estableceremos líneas celulares iPS de pacientes utilizando fibroblastos de pacientes, así como fibroblastos de miembros de la familia de control. Se recogerán los fibroblastos de los pacientes con la mutación más frecuente y se establecerán las líneas celulares iPS. Las líneas celulares iPS se diferenciarán en células del oído interno, incluidas las células ciliadas. Con el sistema de cultivo, se utilizará AAV-LOXHD1 para infectar células ciliadas derivadas de iPS. Se estudiará la supervivencia de las células ciliadas infectadas y la transducción de células ciliadas mediante pinzamientos irregulares. Esperamos observar una mejora de la supervivencia y la función de las células ciliadas, en comparación con las células ciliadas de control no infectadas y no tratadas. El estudio ofrecerá la oportunidad de evaluar la eficacia de la infección por AAV- LOXHD1 en células ciliadas humanas y la expresión del gen LOXHD1. Este logro es una demostración de que las células ciliadas humanas defectuosas pueden tratarse con AAV-LOXHD1, lo que supone un gran paso adelante hacia futuros estudios clínicos.

#### EJEMPLO 6 - PROCEDIMIENTOS EJEMPLARES

**Medición ABR:** Los umbrales ABR se registraron utilizando el programa Intelligent Hearing Systems Smart EP (IHS, Miami, FL, EE. UU.). Los animales se anestesiaron como se ha descrito anteriormente y se mantuvieron calientes en una almohadilla térmica (37 °C). Se colocaron electrodos de aguja en el vértez (+), detrás de la oreja izquierda (-) y detrás de la oreja contraria (tierra). Se presentaron ráfagas de tonos a 4, 8, 16 y 32 kHz, con una duración de 500 µs utilizando un transductor de alta frecuencia. El registro se realizó con una ganancia total igual a 100K y utilizando ajustes de 100 Hz y 15 kHz para los filtros de paso alto y bajo. Se presentó un mínimo de 128 barridos a 90 dB SPL. El SPL se redujo en pasos de 10 dB. Cerca del nivel umbral, se realizaron pasos de 5 dB SPL utilizando hasta 1024 presentaciones en cada frecuencia. El umbral se definió como el NPS en el que se podía identificar al menos una de las ondas en 2 o más repeticiones del registro. El umbral preoperatorio se midió antes de la primera operación y el umbral postoperatorio final se midió antes de sacrificar a los animales. Realizamos pruebas en ratones antes de cada administración de vectores y tres días después de la última administración de vectores.

5 **Medición DPOAE:** Para evaluar el daño funcional en la OHC, se registraron las emisiones otoacústicas del producto de distorsión (DPOAE) y la función de entrada/salida (función I/O) en ambos lados utilizando el programa IHS descrito anteriormente. Los productos de distorsión se midieron para tonos puros de 2 kHz a 32 kHz utilizando el transductor de alta frecuencia IHS. La sonda Etymotic 10B+ se introdujo en el conducto auditivo externo. El nivel L1 se fijó en 65 dB El nivel L2 se fijó en 55 dB. Las frecuencias se adquirieron con una relación F2-F1 de 1,22 utilizando 16 barridos. Las funciones de E/S se adquirieron a una frecuencia de 16 kHz. Se utilizaron nueve niveles de estímulo que oscilaban entre 65 dB SPL y 31 dB SPL en pasos de 5 dB. Se realizaron pruebas en ratones antes de cada administración de vectores y tres días después de la última administración de vectores.

10 **Entrega del AAV que expresa TMPRSS3 al oído interno:** Todos los procedimientos fueron revisados y aprobados por un Comité de Cuidado y Uso de Animales apropiado. Se anestesió a ratones adultos con una inyección i.p. de una mezcla de ketamina (150 mg/kg), xilocaína (6 mg/kg) y acepromacina (2 mg/kg) en cloruro sódico al 0,9%. El vector se administró en el canal semicircular posterior. Se realizó una incisión dorsal postauricular y se expuso el canal semicircular posterior o lateral. Utilizando un microtaladro, se creó una canalostomía, exponiendo el espacio perilynártico. A continuación, se inyectaron 0,5  $\mu$ l de vector utilizando una microjerlinga Hamilton con graduaciones de 0,1  $\mu$ l y una aguja de calibre 36. La canalostomía se sellará con cera ósea y se dejó que los animales se recuperaran.

15 **Protocolo para el entrenamiento y prueba del Rotarod (RR) en ratones:** Para el entrenamiento, los ratones se colocan en el Rotarod RR (ENV-575M, Med Associated Inc., Georgia, EE. UU.), de uno en uno y el programa se inicializa a una velocidad de 4-40rpm. A medida que el ratón cae/salta/se detiene y gira en la primera ranura, se recogen y se colocan en la ranura consecutiva sin detener el programa. Despues del tratamiento, los ratones se colocan en RR, un ratón en cada ranura y se inicia el programa. Cuando un ratón se cae, se recoge y se coloca en la unidad de alojamiento de animales para esperar a que los demás ratones terminen el programa.

## REFERENCIAS

- 30 Akil, O., Seal, R. P., Burke, K., Wang, C., Alemi, A., During, M., ... Lustig, L. R. (2012). Restoration of Hearing in the VGLUT3 Knockout Mouse Using Virally Mediated Gene Therapy. *Neuron*, 75(2), 283-293.
- 35 Askew, C., Rochat, C., Pan, B., Asai, Y., Ahmed, H., Child, E., ... Holt, J. R. (2015). Tmc gene therapy restores auditory function in deaf mice. *Science Translational Medicine*, 7(295), 295ra108.
- 40 Chien, W. W., Isgrig, K., Roy, S., Belyantseva, I. A., Drummond, M. C., May, L. A., ... Cunningham, L. L. (2016). Gene Therapy Restores Hair Cell Stereocilia Morphology in Inner Ears of Deaf Whirler Mice. *Molecular Therapy*, 24(1), 17-25.
- 45 Chung, J., Park, S. M., Chang, S. O., Chung, T., Lee, K. Y., Kim, A. R., ... Choi, B. Y. (2014). A novel mutation of TMPRSS3 related to milder auditory phenotype in Korean postlingual deafness: a possible future implication for a personalized auditory rehabilitation. *Journal of Molecular Medicine*, 92(6), 651-663.
- 50 Colletti, V., Mandalà, M., Carner, M., Barillari, M., Cerini, R., Pozzi Mucelli, R., & Colletti, L. (2010). Evidence of gadolinium distribution from the endolymphatic sac to the endolymphatic compartments of the human inner ear. *Audiology & Neuro-Otology*, 15(6), 353-63.
- 55 Elbracht, M., Senderek, J., Eggermann, T., Thürmer, C., Park, J., Westhofen, M., & Zerres, K. (2007). Autosomal recessive postlingual hearing loss (DFNB8): compound heterozygosity for two novel TMPRSS3 mutations in German siblings. *Journal of Medical Genetics*, 44(6), e81.
- 60 Ellis, B. L., Hirsch, M. L., Barker, J. C., Connelly, J. P., Steininger, R. J., & Porteus, M. H. (2013). A survey of ex vivo/in vitro transduction efficiency of mammalian primary cells and cell lines with Nine natural adeno-associated virus (AAV1-9) and one engineered adeno-associated virus serotype. *Virology Journal*, 10(1), 74.
- 65 Fan, D., Zhu, W., Li, D., Ji, D., & Wang, P. (2014). Identification of a novel homozygous mutation, TMPRSS3: C.535G>A, in a tibetan family with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *PLoS ONE*, 9(12), 1-13.
- 70 Fasquelle, L., Scott, H. S., Lenoir, M., Wang, J., Rebillard, G., Gaboyard, S., ... Delprat, B. (2011). Tmprss3, a transmembrane serine protease deficient in human DFNB8/10 deafness, is critical for cochlear hair cell survival at the onset of hearing. *Journal of Biological Chemistry*, 286(19), 17383-17397.
- 75 Gao, X., Yuan, Y. Y., Wang, G. J., Xu, J. C., Su, Y., Lin, X., & Dai, P. (2017). Novel mutations and mutation combinations of TMPRSS3 cause various phenotypes in one Chinese family with autosomal recessive hearing impairment. *BioMed Research International*, 2017.
- 80 Geng, R., Omar, A., Gopal, S. R., Chen, D. H.-C., Stepanyan, R., Basch, M. L., ... Alagramam, K. N. (2017). Modeling and Preventing Progressive Hearing Loss in Usher Syndrome III. *Scientific Reports*, 7(1), 13480.
- 85 György, B., Sage, C., Indzhykulian, A. A., Scheffer, D. I., Brisson, A. R., Tan, S., ... Maguire, C. A. (2017). Rescue of Hearing by Gene Delivery to Inner-Ear Hair Cells Using Exosome-Associated AAV. *Molecular Therapy*, 25(2), 379-391.
- 90 Harms, D. W., Quadros, R. M., Seruggia, D., Ohtsuka, M., Takahashi, G., Montoliu, L., ... Gurumurthy, C. B. (2014). Mouse Genome Editing Using the CRISPR/Cas System. In *Current Protocols in Human Genetics* (p. 15.7.1-15.7.27). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

- 5 Isgrig, K., Shteamer, J. W., Belyantseva, I. A., Drummond, M. C., Fitzgerald, T. S., Vijayakumar, S., ... Chien, W. W. (2017). Gene Therapy Restores Balance and Auditory Functions in a Mouse Model of Usher Syndrome. *Molecular Therapy*, 25(3), 780-791.
- 10 5 Jolly, C., Mistrik, P., Rajan, G., Green, K., Staecker, H., Helbig, S., & Usami, S.-I. (2012). New trends with cochlear implants and atraumaticity demonstrated by deep electrode insertion and hearing preservation. *Practica Oto-Rhino-Laryngologica*, (SUPPL. 132).
- 15 10 Kilpatrick, L. A., Li, Q., Yang, J., Goddard, J. C., Fekete, D. M., & Lang, H. (2011). Adeno-associated virus-mediated gene delivery into the scala media of the normal and deafened adult mouse ear. *Gene Therapy*, 18(6), 569-578.
- 20 15 Landegger, L. D., Pan, B., Askew, C., Wassmer, S. J., Gluck, S. D., Galvin, A., ... Vandenberghe, L. H. (2017). A synthetic AAV vector enables safe and efficient gene transfer to the mammalian inner ear. *Nature Biotechnology*, 35(3), 280-284.
- 25 20 Miyagawa, M., Nishio, S.-Y., & Usami, S.-I. (2016). A Comprehensive Study on the Etiology of Patients Receiving Cochlear Implantation With Special Emphasis on Genetic Epidemiology. *Otology & Neurotology*, 37(2), e126-e134.
- 30 25 Preciado, D. a, Lawson, L., Madden, C., Myer, D., Ngo, C., Bradshaw, J. K., ... Greinwald, J. H. (2005). Improved diagnostic effectiveness with a sequential diagnostic paradigm in idiopathic pediatric sensorineural hearing loss. *Otology & Neurotology : Official Publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*, 26(4), 610-5.
- 35 30 Santiago-Ortiz, J. L., & Schaffer, D. V. (2016). Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy.
- 40 35 Shearer, A. E., Eppsteiner, R. W., Frees, K., Tejani, V., Sloan-Heggen, C. M., Brown, C., ... Smith, R. J. H. (2017). Genetic variants in the peripheral auditory system significantly affect adult cochlear implant performance. *Hearing Research*, 348, 138-142.
- 45 40 Shu, Y., Tao, Y., Li, W., Shen, J., Wang, Z., & Chen, Z.-Y. (2016). Adenovirus Vectors Target Several Cell Subtypes of Mammalian Inner Ear In Vivo. *Neural Plasticity*, 2016, 1-8.
- 50 45 Shu, Y., Tao, Y., Wang, Z., Tang, Y., Li, H., Dai, P., ... Chen, Z.-Y. (2016a). Identification of Adeno-Associated Viral Vectors That Target Neonatal and Adult Mammalian Inner Ear Cell Subtypes. *Human Gene Therapy*, 27(9), 687-699.
- 55 50 Shu, Y., Tao, Y., Wang, Z., Tang, Y., Li, H., Dai, P., ... Chen, Z.-Y. (2016b). Identification of Adeno-Associated Viral Vectors That Target Neonatal and Adult Mammalian Inner Ear Cell Subtypes. *Human Gene Therapy*, 27(9), 687-699.
- 55 55 Sloan-Heggen, C. M., Bierer, A. O., Shearer, A. E., Kolbe, D. L., Nishimura, C. J., Frees, K. L., ... Smith, R. J. H. (2016). Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with hearing loss. *Human Genetics*, 135(4), 441-450.
- 55 55 Suzuki, J., Hashimoto, K., Xiao, R., Vandenberghe, L. H., & Liberman, M. C. (2017). Cochlear gene therapy with ancestral AAV in adult mice: complete transduction of inner hair cells without cochlear dysfunction. *Scientific Reports*, 7, 45524.
- 55 55 Tao, Y., Huang, M., Shu, Y., Ruprecht, A., Wang, H., Tang, Y., ... Chen, Z.-Y. (2017). Delivery of Adeno-Associated Viral Vectors in Adult Mammalian Inner Ear Cell Subtypes without Auditory Dysfunction. *Human Gene Therapy*, hum.2017.120.
- 55 55 Wang, Y., Sun, Y., Chang, Q., Ahmad, S., Zhou, B., Kim, Y., ... Lin, X. (2013). Early postnatal virus inoculation into the scala media achieved extensive expression of exogenous green fluorescent protein in the inner ear and preserved auditory brainstem response thresholds. *The Journal of Gene Medicine*, 15(3-4), 123-133.
- 55 55 Weegerink, N. J. D., Schraders, M., Oostrik, J., Huygen, P. L. M., Strom, T. M., Granneman, S., ... Kunst, H. P. M. (2011). Genotype-phenotype correlation in DFNB8/10 families with TMPRSS3 mutations. *JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 12(6), 753-766.
- 55 55 Wu, Z., Yang, H., & Colosi, P. (2010). Effect of genome size on AAV vector packaging. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(1), 80-6.
- 55 55 Xia, L., Yin, S., & Wang, J. (2012). Inner Ear Gene Transfection in Neonatal Mice Using Adeno-Associated Viral Vector: A Comparison of Two Approaches. *PLoS ONE*, 7(8), e43218.
- 55 55 Se han descrito una o más realizaciones de la presente invención. No obstante, se entenderá que pueden realizarse diversas modificaciones sin apartarse del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento para el tratamiento o la prevención de la pérdida de audición en un sujeto que la necesita, que comprende:
- 5      un vector viral adeno-asociado seleccionado para ser AAV2 que tiene una secuencia de ácido nucleico TMPRSS3 humana seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y una secuencia de ácido nucleico que tenga al menos un 90% de identidad de secuencia con el ácido nucleico de SEQ ID NO: 1, y un promotor de citomegalovirus humano (HCMV) unido operativamente al ácido nucleico.
- 10     2. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el título del vector viral es de  $1,1 \times 10^{13}$  copias del genoma por mililitro (GC/mL), según se determina por pPCR.
- 15     3. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, comprendiendo el procedimiento: administrar al sujeto que lo necesita una cantidad de un vector viral adenoasociado seleccionado para ser AAV2 y que tiene una secuencia de ácido nucleico TMPRSS3 humana seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, y una secuencia de ácido nucleico que tenga al menos 90% de identidad de secuencia con el ácido nucleico de SEQ ID NO: 1, y un promotor de citomegalovirus humano (HCMV) unido operativamente al ácido nucleico.
- 20     4. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la cantidad eficaz es eficaz para restaurar la expresión génica en las células ciliadas del oído del sujeto.
- 25     5. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, en la que el vector viral adenoasociado se administra mediante un procedimiento de inyección, y en la que el procedimiento de inyección se selecciona del grupo que consiste en cocleostomía, inyección en la membrana de la ventana redonda, inyección en el saco endolinfático, inyección en la escala media, canalostomía, inyección en la escala media a través del saco endolinfático, o cualquier combinación de los mismos.
- 30     6. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el sujeto tiene uno o más factores genéticos de riesgo asociados con la pérdida de audición.  
S  
7. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que uno de los factores genéticos de riesgo se selecciona del grupo que consiste en una mutación en el gen TMPRSS3 o una mutación en el gen LOXHD1.
- 35     8. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el sujeto no muestra ningún indicador clínico de pérdida de audición.
- 40     9. Un ratón transgénico diseñado para tener una o más mutaciones activas que causan pérdida de audición, correspondiendo cada una de las mutaciones a una mutación en un TMPRSS3 humano que se sabe que causa pérdida de audición, en el que la una o más mutaciones activadas se seleccionan del grupo que consiste en: IVS4AS, G-A, -6; 8-BP DEL, SATELLITE REPEAT INS; 1-BP DEL 207C; c.753G>C (p.Trp251Cys); c.308A>G (p.Asp103Gly); c.1211C>T (p.Pro404Leu); c.647G>T (p.Arg216Leu); c.579dupA (p.Cys194Metfs); c.1192C>T (p.Gln398Ter); c.323-6G>A; c.916G>A (p.Ala306Thr); c.208delC (p.His70Thrfs); c.1276G>A (p.Ala426Thr); c.413C>A (p.Ala138Glu); c.325C>T (p.Arg109Trp); c.346G>A(p.V116M); c.727G>A (p.G243R); and c.1156T>C (p.C386R).
- 45     10. El ratón transgénico de la reivindicación 9. en el que la mutación es c.916G>A (p.Ala306Thr).
- 50

**FIGURA 1**

1 eggatgtcag aggccctgaa atagtcacca tgggggaaaa tgatccgcct gctgttgaag  
61 ccccccttctc attccgatcg ctttttggcc ttgatgattt gaaaataagt cctgttgcac  
121 cagatgcaga tgctgttgc gcacagsttc tgcactgtct gccattgaag ttttttccaa  
181 tcatcgatc tggatcatt gcattgatct tagcactggc cattggctcg ggcattccact  
241 tcgactgctc agggaaagtac agatgtcgct catccttaa gtgtatcgag ctgatagctc  
301 gatgtgacgg agtctcggat tgcaaaagacg gggagggacga gtacccgtgt gtccgggtgg  
361 gtggtcagaa tgccgtgttc caggtgttca cagtcgttcc gtggaaagacc atgtgttcgg  
421 atgactggaa gggtcactac gcaaattgttgc cctgtgccts actgggttcc ccaagctatg  
481 taagttcaga taacctcaga gtgagctcgc tggagggggca gttccggggag gagtttgtgt  
541 ccatcgatca cctcttgcaca gatgacaagg tgactgcatt acaccactca gtatatgtga  
601 gggagggatg tgcctctggc cacgtggtta cttgcagtgc cacagcctgt ggtcatagaa  
661 ggggtacatcg ctcaacgcattt gttgggtggaa acatgtccctt gctctcgacg tggccctggc  
721 aggccagect tcaagttccag ggctaccacc tgcgtgggggg ctctgtcatac acgccccctgt  
781 ggatcatcac tgcgtccacac tgcgtttatg acttgtaccc ccccaagtca tggaccatcc  
841 aggtgggtct agttccctg ttggacatc cagccccatc ccacttggtg gagaagattg  
901 tctaccacag caagtacaag ccaaagaggg tggcaatga ctcgcctt atgaagctgg  
961 cccggccact cacgttcaat gaaatgtcc agcctgtgtc cttgcaccaac tctgaagaga  
1021 acttccccca tggaaaagtgc tgcgtggacgt caggatgggg ggccacagag gatggagcag  
1081 gtgacgccts ccctgtccctg aaccacgggg ccgtcccttt gatttccaaac aagatctgcac  
1141 accacaggga cgtgtacggt ggcataatct cccctccat gctctgcgcg ggctacccat  
1201 cgggtggcgt ggacagctgc cagggggaca gggggggcc cttgggtgtgt caagagagga  
1261 ggctgtggaa gttagtggga ggcacccat tggcatcgg ctgcgcagag gtgaacaagg  
1321 ctgggggtgtca caccctgttc acctcccttcc tggactggat ccacgagcag atggagagag  
1381 acctaaaaaac ctqaaaaaqqa agggggacaaq taqccaccc (SEQ ID NO:1)

**FIGURA 2**

MGENDPPAVEAPPFSFRSLYGLDOLKISEVAPDADAVAAQILSLLPLKFFFPLIVIGIILALILALAIGLGLHFID  
CSCKYRCRSSFKCIELIARCDGVSDCKDGEDEYRCVRVGGQNAVQVFTAASWKIMCSDDWKGHYANVACAQ  
LGFFPSYVSSDNLRVSSLEGQFREEFVSIDHLLPDDKVTALHHSVYVREGCASGHVVTLQCTACGHRRGYSSR  
IVGGGNMSLLSQWPWQASLQFQGYHLCGGSVITPLWLTAAHCVYDLYLPKESWTIQVGLVSLLDNFAPSHLVE  
KIVYHSKYKPKRLGNDIALMKLAGPLTFNEMIQPVCLPNSEENFPDGKVCWTSGWGATEDGAGDASPVLNHA  
AVPLISNKICNHRDVYGGIISPSMLCACYLITGGVDSCQGDGGPLVCQERRLWKLVGATSGIGCAEVNKG  
VYTRVTSFLBWIHEQMERDLKT (SEQ ID NO:2)

### FIGURA 3

1 gtagaacccga ggtggggct tggtaaggc acaccaggaa gaggcaggctg cgccctcaccc  
61 tccagtggag acagagggca gacattctt ttggagcaca ctcaggcta aatggcaaaa  
121 ccccaatctc aagtgaactt catggaaacta ggggattgtc tcaacttctcc agtggattga  
181 ggcagtgttc cctctgttct ctatgaaatg acgggtgtgga caggggatgt gtgtggcggg  
241 ggcactgact ccaacatctt catgaccctc tacggcatca acggggagcac agaggagatg  
301 cagctggaca aaaagaaaagc caggtttgag cgggagcaga acgacacacccatcatatggag  
361 atcccttagaca ttgctccatt caccaagatg cggatccgga ttgtatggcct gggcagtcgg  
421 cccggagtggt tcctggagag gatccctactg aagaacatga acactggaga cctgaccatg  
481 ttctactatg gagactggcgt gtcccgccgg aaggcagaaga agacccctgt gtgtgaaatg  
541 tggcccgta tcgatgagga agaaaatgtg gagttggaccccttccacccgt cgcagttaaag  
601 accagcaca tcctggggc aggcactgtat gccaacgtgt tcatcatcat cttcgccgg  
661 aacggggata gtgggacact ggccctgaag cagtcggcaaa actggaaacaa gtttgagcgg  
721 aacaacacgg acacattcaat cttccctgac atgtctgagct tggccaccccttgcacatgt  
781 agggtctggc acgacaacaa agggatattt cttggctggc atctgagata tgcgtatgt  
841 aaggacaact ccccgacga gacccctccac ttccagtgtg actgtctggc ctccaaagagt  
901 gaggggtgacg ggcagacggc cccgcacttt gcctgtgcca acaacaagat ctgtgtatg  
961 ctggaaagaga ccacccatcgat gatogtcata gaaacggca acggaggcga aaccaggagg  
1021 aacgtctggc tcatcttggc gggcagggaaag aaccgatcca aagagtttct catggaaaat  
1081 tcttcttaggc agggggcctt taggaagggg accacagaca cgtttgtgt tgacacgcatt  
1141 taatttggggg acattgcctt cctctgtgtg ggccaccccttgc ccaaggaaaga ccggtttattc  
1201 cccaaagagag aacttgcctt gcatgtcaag accatccacca tcaaccggat ggagtacggc  
1261 aatgtgtacc tctttaactt tgactgcctt atccccctca agaggaagag gaagttacttc  
1321 aaggatattcg aggttaccaa gacgacagag agctttgcca gcaagggttcca gagcctgggt  
1381 cccgtcaagt acgaaagtcat cgtgacaaca ggctatgagc cagggccagg cactgtatgca  
1441 aacgtcttcg tgaccatctt tggggccaaac ggagacacag gcaaggggga gctgaagcag  
1501 aaaatgogca acctttcga gccccccggc acagaccgct ttttcttggc gacgctgggg  
1561 ctgggtgagc tgcccaagta gtgaccaggc tgggacttgc tgcagagtgt ggatgagaaa  
1621 tttagtcttc acccaggggg tagaagtggc gaagcagagg ccatcaagat ggtgtatccc  
1681 aagaaaaaac taatttaacac ttttcccaaa aaaagcttagg ctaatttaat tattaccaac  
1741 catatccat aaagaactca tcttagcatt tgcttgctaa gaagtgtata cttttccca  
1801 gtttcaataaa acccagggtggc aagtgg (SEQ ID NO:3)

**FIGURA 4**

MNNEITYYFPCCQRWLAVEEDDGQLSRELLPVDESYVLPOSEEGRGCCDNNPLDNLALEQK  
DKSTTFSVTIKTGVKKNAGT DANV FITLFGTQDDGMLLLKSSKTNSDKFERDSIEIFTV  
ETLDLGDILWKVRLGH DNTGKAPGWFV DVEVDAPS LGKCMTPCGRWLAKNEDDGSIIRD  
LFHAELOQTRLYTPFV PYEITLYTSDVFAAGTDANIFIIIYGCDAVCTQQKYLCTNKREQK  
QFFERKSASRFIVELEDVGEIIEKIRIGHNNTGMNP GWHCSHVDI RLLPDKG AETLTF  
PCDRWLATSEDDKKTI RELV PYDIFTEKYMKGDSL RQVYKEVEEPLDIVLYSVQIFTGNI  
PGAGTDAKVYITIYGD LGDTGERYL GKS ENRTNKF ERG TADTFII EADLGVIYKIKLRH  
DNSKWCADWYVEKVEIWN DNEDEF LFLCGRWLSLKEDGRLE RL FYEKEYTGDRSSNCS  
SPADFW EIALSSKMADVDI STVTGPMADYVQEGPII PYYVSVTGKEKDAATDSRAFIFL  
I GEDDERSKRIWLDYPRGKRGFSRGSVEEFYVAGLDVGI I KKI ELGH DASP E C W L V E E  
LCLAVPTQGTYKMLNCNCWLAKDRGDGITSRVFDLL DAMV VNI GV KV L YEMT VWTGDVVG  
GGTDSNI FMTLYG GINGSTEEMQLDKKKARF ERE QNDT FIMEI LDIAPFTKMRIRIDGLGS  
RPEWFLERILLKNMNTGDLTMFYYGDWL SQRKGKTLVCEMCAVIDEEEMMEWTSYTVAV  
KTS DILGAGT DANV FIII I FGENGDSGT LALKQ SANWNK FERNNTDT FNFPDMLSLGH LCK  
LRVWHDNKGIFPGWHL SYDVKD NSRDET FHFOC DCWLSKSEG DQTV RDFA CANN KICD  
ELEETTYEIVIETGNGGETREN V W L I L EGRKNRSKEF L M E N S SRQAFRK GTT DTF EFD S  
I YLGDIASLCVGH LAREDRFIPKRELAWHVKTIT I T E M E Y G N V Y F F N C D C L I F L K R K R K Y  
FKVFEVTKTTE SFASKVQSLVPV KYEVIVTTGYEPGAGT DANVFTI FGANGDTGKRELK  
QKMRNL FERGSTD RFFLET LELV VTR LSLAECG (SEQ ID NO:4)

**FIGURA 5**

