



"TERAPIA GENICA AAV-MEDIATA RIPRISTINANTE IL GENE
DELL'OTOFERLINA"

TRADUZIONE

5 Del testo del Brevetto Europeo n. 3 911 354, domanda n.
20701951.4 depositata il 20 gennaio 2020,
di 1) INSTITUT PASTEUR, di nazionalità francese, con sede
in 25-28, RUE DU DOCTEUR ROUX - 75015 PARIS (FRANCIA),
2) CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS), con
10 sede in 3, RUE MICHEL-ANGE - 75016 PARIS (FRANCIA)
3) INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE
(INSERM), con sede in 101 RUE TOLBIAC - 75013 PARIS
(FRANCIA)
Inventori: SAFIEDDINE Saaïd, PETIT Christine

15 RIASSUNTO

I presenti inventori riportano qui, nel modello di
topo DFNB9 (topi knock-out per OTOF), la prima prova di
principio che l'erogazione cocleare di un cDNA frammentato
attraverso un approccio a duplice vettore AAV può
20 correggere efficacemente e in maniera duratura il fenotipo
di sordità profonda di questi topi, quando la
somministrazione avviene decisamente dopo che il loro
sistema uditivo è maturato (P30). La presente invenzione
concerne, pertanto, un sistema vettore che consente
25 l'espressione del polipeptide otoferlina di lunghezza

intera, o di un suo frammento funzionale, in cellule capellute interne, per uso nel trattare pazienti affetti da sordità DFNB9 o nel prevenire la sordità DFNB9 in pazienti aventi mutazioni DFNB9, in cui detti pazienti
5 sono pazienti aventi un sistema uditivo sviluppato e maturo, quali neonati, infanti, bambini, adolescenti o adulti.

DESCRIZIONE

STATO DELL'ARTE DELL'INVENZIONE

10 Più della metà dei casi di sordità congenita profonda non sindromica presenta una causa genetica, e per lo più (~80%) si tratta di forme autosomiche recessive (DFNB) (Duman D. e Tekin M, Front Biosci (Landmark Ed) 17:2213-2236 (2012)). La diagnosi genetica di sordità fornisce
15 informazioni essenziali per le terapie geniche cocleari, e negli ultimi anni sono stati fatti rapidi progressi in termini sia di accuratezza che di accessibilità ad esami genetici. L'identificazione di mutazioni nei geni della sordità sindromica potrebbe anticipare di molti anni
20 l'insorgenza di sintomi nei pazienti, concedendo tempo a una pianificazione della gestione della malattia.

I geni della sordità codificano per proteine con un'ampia gamma di funzioni molecolari, vitali per il funzionamento cocleare, quale lo sviluppo dell'organo
25 sensoriale, la trasduzione del suono nelle stereocilia

delle cellule capellute, il mantenimento del potenziale endococleare (EP) e un'elevata concentrazione di potassio extracellulare, e la neurotrasmissione sinaptica fra cellule capellute e neuroni del ganglio spirale (SGN). Le
5 principali proteine costituite a partire da geni della sordità includono canali ionici e trasportatori, giunzioni gap e giunzioni strette, subunità proteiche nei motori del citoscheletro e molecolari e fattori di trascrizione espressi in via transitoria nello sviluppo cocleare. Che
10 una mutazione influisca sullo sviluppo cocleare iniziale e porti a una significativa degenerazione cellulare è un fattore importante nel determinare la "finestra temporale di trattamento", il che rappresenta un problema cruciale in questo campo terapeutico.

15 Impianti cocleari protesici sono attualmente utilizzati per la riabilitazione (Kral A e O'Donoghue GM N Engl J Med 363(15):1438-1450 (2010)), ma il recupero dell'udito è lungi dall'essere perfetto, in particolare per la percezione dell'eloquio in ambienti rumorosi o per
20 la percezione della musica, a causa di un loro limite intrinseco di risoluzione della frequenza, così come imposta dall'interferenza elettrica intercanali.

Una motivazione principale nello sviluppare trattamenti biologici è ripristinare l'udito senza
25 l'impianto di alcun dispositivo protesico, e ottenere una

qualità di risoluzione del suono e un costo unitario che siano di gran lunga migliori di quanto attualmente ottenibile con impianti cocleari. In particolare, una terapia genica con una terapia genica locale mediata da virus Adenoassociati (AAV) è già stata proposta per trattare forme di sordità nell'uomo (Zhang *et al.*, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, vol. 11, Art. 221, 2018).

Utilizzando un modello di topo knock-in Ush1c c.216G>A per studiare la malattia di Usher di tipo I C, Pan *et al.* *Nature biotechnology*; 35(3):264-272 (2017) hanno verificato se una terapia genica cocleare potesse essere utilizzata per individuare a bersaglio cellule capellute per correggere il fenotipo di sordità. Un nuovo AAV sintetico, Anc80L65, era in grado di trasdurre >90% di cellule capellute. Il trattamento dimostra preservazione morfologica nella coclea, e le soglie uditive erano migliorate per 60-70 dB a confronto con orecchie non trattate, quando vettori virali ricombinanti venivano iniettati in P0-P1 (ossia, il giorno in cui i topi nascevano o il giorno dopo, il che è denominato "giorni postnatali 0 o 1"). Le medesime iniezioni eseguite in P10-P12 (ossia, dieci o dodici giorni dopo la nascita, appena prima dell'instaurarsi dell'udito - il che si verifica circa in P12 in questa specie) non sortivano alcun effetto

di trattamento (Pan *et al.* Nature biotechnology;
35(3):264-272 (2017).

Akil *et al.* Neuron 75:283-293 (2012) hanno utilizzato
AAV2/1 per erogare il cDNA del trasportatore di glutammato
5 vescicolare 3 (*Vglut3*) nella coclea di topi KO neonati
(ossia, giorni postnatali da 1 a 12) al fine di trattare
un disordine della trasmissione sinaptica delle cellule
capellute interne. Sulla base di dati ottenuti dalla
risposta del tronco cerebrale a stimoli acustici (ABR) e
10 dai riflessi di trasalimento a stimoli acustici, essi
dimostrarono che la funzione uditiva nelle orecchie
sottoposte a iniezione andava incontro a recupero entro 2
settimane.

Questi due studi confermano un'attenuazione
15 significativa della degenerazione cellulare nella coclea,
quando vettori virali ricombinanti erano iniettati in
stadi postnatali iniziali, ossia, prima della maturazione
delle cellule capellute di topo.

Ad oggi, tutti gli studi di terapia genica che hanno
20 valutato la terapia dell'orecchio interno nei topi hanno
concluso che queste terapie non sono efficaci in animali
adulti. Si conviene, così, sul fatto che vi sia un periodo
critico perché una terapia genica sia efficace nel
preservare o recuperare l'udito, e che una finestra di
25 opportunità per il trattamento esista soltanto nei topi a

uno stadio embrionale o postnatale iniziale, ossia, prima dell'instaurarsi dell'udito (Ahmed *et al.*, JARO 18:649-670 (2017)).

È ben noto che l'orecchio interno di topo è ancora
5 strutturalmente e funzionalmente immaturo alla nascita, e
che l'instaurarsi dell'udito ha luogo in questa specie
animale il giorno 12 postnatale (P12) per raggiungere il
suo termine intorno al giorno 20 postnatale (P20) (Shnerson
e Willott, J. Comp. Physiol. Psychol. 94, 36-40 (1980)).
10 Tuttavia, l'instaurarsi e la maturazione dell'udito si
verificano con una tempistica completamente differente
nell'uomo. Di fatto, l'orecchio interno umano è in grado
di funzione uditiva già a partire da 4,5 mesi di vita
uterina e questa raggiunge il suo compimento alla nascita
15 (cfr. Figura 6 e Hepper PG e Shahidullah BS Arch Dis
Child71 (2):F81-87 (1994)).

Ciò significa che gli esperimenti della tecnica nota,
volti a ripristinare le funzioni uditive prima
dell'instaurarsi dell'udito o prima della fine della
20 maturazione cocleare, dovrebbero essere condotti
nell'utero, quando trasposti in studi clinici sull'uomo
(Figura 6). Tuttavia, nessun essere umano è mai stato
trattato ad oggi con una terapia genica mirata a cellule
capellute, poiché ripristinare l'udito nello stadio
25 postnatale o nell'infanzia (ossia, quando il sistema

uditivo è completamente maturo e funzionale) è stato ritenuto impossibile.

Ciò nondimeno, l'obiettivo ultimo di una terapia genica cocleare è il trattamento della sordità genetica comune nell'uomo dopo che una potenziale sordità geneticamente indotta può essere rilevata o diagnosticata, ossia, nella maggior parte dei casi, dopo la nascita.

Non è di fatto possibile sviluppare protocolli di terapia genica che implicino a livello uterino un'erogazione di trattamenti all'interno della coclea, poiché questo intervento chirurgico indurrebbe verosimilmente una serie di effetti collaterali, fra cui una perdita definitiva dell'udito (Zhang *et al.*, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, vol. 11, Art. 221, 2018). Inoltre, è ben noto che la sordità DFNB sia tipicamente diagnosticata nell'uomo durante il periodo neonatale, ossia, dopo la nascita, fra 0 e 4 mesi.

Perché possano essere trasposti nell'uomo, gli approcci di terapia genica dovrebbero pertanto essere esaminati ed efficaci nel rendere reversibile il fenotipo di sordità consolidato che colpisce i sistemi uditivi maturi, ad esempio quando somministrati a topi nei giorni postnatali >P20 (corrispondenti a soggetti umani giovani o adulti).

Questo sarà l'unico modo per identificare trattamenti

la cui finestra temporale sia compatibile con l'etica e il benessere nell'uomo, perché essi possono essere somministrati in soggetti umani in età postnatale, bambini e adulti, in cui il sistema uditivo sia giunto a maturazione.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

I presenti inventori hanno sviluppato studi alternativi al fine di identificare trattamenti che abbiano una possibilità realistica di prevenire o rendere reversibile efficacemente la perdita dell'udito in un soggetto, specialmente un soggetto umano, in cui il sistema uditivo, in special modo la coclea, è giunto a maturazione, ma senza pur tuttavia coinvolgere l'erogazione di geni a livello embrionale. In questo contesto, essi sono stati in grado di dimostrare che l'espressione ricombinante della proteina otoferlina nelle cellule capellute interne è in grado di ripristinare l'udito in topi di modello trattati nei giorni postnatali >P20 (corrispondenti a soggetti umani giovani o adulti).

L'otoferlina è abbondantemente espressa nelle cellule capellute interne (IHC) sensoriali della coclea. Essa è altresì espressa in altre cellule del sistema nervoso centrale. Gioca un ruolo chiave nei passaggi finali della fusione delle vescicole sinaptiche a livello di sinapsi delle cellule capellute cocleari con neuroni del ganglio

spirale afferenti. Più precisamente, essa è importante per l'esocitosi a livello della sinapsi a nastro uditiva (Roux *et al.*, Cell 127(2):277-89, 2006).

Negli esseri umani, mutazioni che interessano il gene
5 *otoferlina* ("gene OTOF") portano a una grave perdita bilaterale non sindromica dell'udito che si verifica dopo la nascita, ma prima dell'acquisizione del linguaggio. Alcune di esse portano anche a una neuropatia uditiva non sindromica sensibile alla temperatura, che viene innescata
10 quando la temperatura corporea aumenta in modo importante (ad esempio in caso di febbre, si vedano Marlin S. *et al.*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 394 (2010) 737-742 e Varga R. *et al.*, J. Med. Genet 2006; 43:576-581). Ad oggi sono state identificate almeno 60
15 mutazioni (cfr. Figura 7), fra cui 5 sono notoriamente termosensibili (P.Q994VfsX6, P.I515T, p.G541S, PR1607W, p.E1804del, come descritto in Pangrsic T. *et al.*, Trends in Neurosciences, 2012, col. 35, n. 11).

Questi due fenotipi di sordità (costitutivi e
20 inducibili) si riscontrano in tutto il mondo e sono noti come la "Sordità autosomica recessiva 9" o sordità "DFNB9".

La sordità DFNB9 rende conto di una percentuale di casi di perdita dell'udito non sindromica autosomica recessiva sino all'8% in alcune popolazioni occidentali,
25 posizionandosi in tal modo entro i primi cinque disordini

dell'udito su base genetica che richiedono ancora un intervento terapeutico.

I presenti inventori riportano qui, nel modello di topo DFNB9 (topi knock-out per OTOF), la prima prova di principio che l'erogazione cocleare di un cDNA frammentato
5 attraverso un approccio a duplice vettore AAV può correggere efficacemente e in maniera duratura il fenotipo di sordità profonda di questi topi, quando la somministrazione avviene decisamente dopo che il loro
10 sistema uditivo è maturato (P30). Questo risultato suggerisce che la finestra terapeutica per il trasferimento genico locale in pazienti con sordità congenita dovuta a DFNB9 sia di fatto più lunga di quanto inizialmente ipotizzato.

15 In effetti, la somministrazione dei vettori dell'invenzione, ciascuno fornendo una porzione del gene OTOF e consentendo l'espressione della proteina OTOF di lunghezza intera nelle cellule capellute interne trasfettate di topi knock-out per OTOF in giorni postnatali
20 più avanzati (P30), porta a risultati migliori rispetto a quando ad essere trattati erano topi più giovani.

Ciò è molto sorprendente dato che in numerosi studi è stato insegnato che la finestra terapeutica per il trasferimento genico locale in topi affetti da sordità
25 genetica era embrionale o nei primi giorni postnatali

(Ahmed **et al.**, JARO 18:649-670 (2017); Zhang *et al.*,
Frontiers in Molecular Neuroscience, vol. 11, Art. 221,
2018).

È noto che, nei topi, l'intero intervallo di frequenze
5 responsive può essere osservato entro P14 (ossia,
quattordici giorni dopo la nascita). Le latenze di risposta
e gli intervalli fra i picchi maturavano rapidamente nel
corso delle settimane post-natali seconda e terza e
raggiungevano caratteristiche simili a quelle degli adulti
10 in P18 (Song L. *et al.*, J Acoust Soc Am 119(4):2242-2257
(2006)). In P30, il sistema uditivo dei topi ha, quindi,
raggiunto completa maturazione. Esso corrisponde al
sistema uditivo di un bambino o di un uomo adulto (si veda
Figura 6).

15 Quindi, i risultati ottenuti dagli inventori
suggeriscono che la terapia genica utilizzata nella
presente invenzione può essere efficace nell'uomo non
soltanto in una finestra temporale pre-natale, ma anche in
pazienti in età infantile nei quali sia stata posta
20 diagnosi di sordità DFNB9 congenita, o in pazienti adulti
nei quali la diagnosi sia stata formulata più tardi, ad
esempio perché portatori di mutazioni termosensibili nel
gene *OTOF*.

In un primo aspetto, la presente invenzione riguarda
25 un sistema vettore comprendente almeno due particelle di

AAV, ciascuna delle quali comprendendo un polinucleotide
comprendente una sequenza codificante parziale che
codifica per i) la parte N-terminale del polipeptide
otoferlina o di un suo frammento funzionale, per una, e
5 ii) la parte C-terminale del polipeptide otoferlina o di
un suo frammento funzionale, per l'altra, detto sistema
vettore consentendo l'espressione del polipeptide
otoferlina di lunghezza intera, o di un suo frammento
funzionale, in cellule capellute interne, per uso nel
10 trattare pazienti affetti da sordità DFNB9 o prevenire la
sordità DFNB9 in pazienti aventi mutazioni DFNB9, in cui
detti pazienti sono soggetti umani aventi un sistema
uditivo sviluppato e maturo, in cui detti pazienti sono
preferibilmente infanti, bambini, adolescenti o soggetti
15 umani adulti.

Come qui utilizzato, il termine "otoferlina" indica
il polipeptide otoferlina. Esso è qui abbreviato in "OTOF".
Questo polipeptide è altresì noto come "AUNB1"; "DFNB6";
"DFNB9"; "NSRD9" e "FER1L2".

20 La lunghezza intera dell'isoforma 1 del polipeptide
otoferlina umana di tipo selvatico è presentata in SEQ ID
NO:1 (corrispondente al numero Genbank AF183185.1). Questo
polipeptide è un membro della famiglia di proteine
transmembrana ferline, che presenta domini C2 come
25 sinaptotagmine, PKC e PLC. Questa forma lunga contiene sei

domini C2. Come sopra menzionato, essa è coinvolta nella fusione di vescicole sinaptiche fra cellula capelluta cocleare e neuroni gangliari spirali afferenti (Roux et al., Cell 127(2):277-89, 2006; Michalski et al., Elife, 7 novembre 2017;6 e31013).

Il termine "polipeptide otoferlina" designa il polipeptide otoferlina di SEQ ID NO:1 e sue sequenze omologhe, che mantiene almeno una funzione biologica del polipeptide otoferlina che è di interesse nel presente contesto. Ad esempio, questa funzione biologica è correlata alla modulazione della fusione di vescicole a livello delle sinapsi a nastro di cellule capellute interne cocleari che attivano i neuroni uditivi primari (Roux et al. 2006; Michalski et al., Elife, 7 novembre 2017 7;6 e31013). Questa modulazione potrebbe essere valutata con misure elettrofisiologiche classiche *ex vivo*.

In una forma di realizzazione preferita, il sistema vettore per uso secondo l'invenzione consente l'espressione di un polipeptide omologo la cui sequenza amminoacidica condivide un'identità/similarità di almeno il 70% con SEQ ID NO:1. Detta sequenza omologa condivide più preferibilmente un'identità/similarità di almeno il 75%, e ancor più preferibilmente di almeno l'80%, o di almeno il 90% con SEQ ID NO:1. Quando il polipeptide omologo è molto più corto di SEQ ID NO:1, allora può essere

considerato un allineamento locale.

Detto polipeptide omologo può presentare, ad esempio, la sequenza amminoacidica riportata in SEQ ID NO:5 (corrispondente al numero Genbank NP_001274418). Detta
5 sequenza caratterizza l'isoforma e (variante 5) del polipeptide otoferlina umana di tipo selvatico. Questa isoforma e è codificata dalla variante di cDNA avente la sequenza SEQ ID NO:22. Questa variante manca di un esone in-frame alternato nella regione codificante 3' e utilizza
10 un codone di stop a valle a confronto con SEQ ID NO:1. Essa codifica per un C-terminale distinto a confronto con la SEQ ID NO:1 (ma la sua parte N-terminale è la medesima).

Detto polipeptide omologo può altresì presentare la sequenza amminoacidica riportata in SEQ ID NO:6
15 (corrispondente al numero Genbank NP_004793.2) o la sequenza amminoacidica riportata in SEQ ID NO:24 (corrispondente al numero Genbank NP_919303.1) corrispondenti alle isoforme corte b e c (varianti 2 e 3), rispettivamente. Più precisamente, SEQ ID NO:6 rappresenta
20 l'isoforma b (variante 2, altresì denominata "forma corta 1") che presenta un terminale N più corto e manca di un segmento a confronto con SEQ ID NO:1. D'altra parte, SEQ ID NO:24 rappresenta l'isoforma c (variante 3, altresì denominata "forma corta 2"), che differisce per la 5' UTR
25 e la sequenza codificante a confronto con la variante 1



(SEQ ID NO:1), poiché presenta un C-terminale più corto e distinto a confronto con SEQ ID NO:1.

Detta sequenza omologa può altresì essere, ad esempio, il polipeptide otoferlina di un'altra specie animale, quale SEQ ID NO:7 che è l'isoforma di lunghezza
5 intera di topo 1 del polipeptide otoferlina (corrispondente al numero Genbank NP_001093865.1). Questa isoforma è codificata dal cDNA di SEQ ID NO:16 (NM_1100395).

10 Nel contesto dell'invenzione, quando la percentuale di identità fra dette due sequenze omologhe può essere identificata mediante un allineamento globale delle sequenze nella loro interezza (ad esempio, quando le sequenze sono circa della stessa dimensione), questo
15 allineamento può essere eseguito per mezzo di un algoritmo che è ben noto all'esperto del ramo, quale quello descritto in Needleman e Wunsch (1970). Di conseguenza, comparazioni di sequenza fra due sequenze amminoacidiche o due sequenze nucleotidiche possono essere condotti, ad esempio,
20 utilizzando qualsiasi software noto all'esperto del ramo, quale il software "needle" utilizzando il parametro "gap aperto" di 10, il parametro "gap estensione" di 0,5 e la matrice "Blosum 62".

Quando è necessario considerare un allineamento
25 locale delle sequenze (ad esempio, nel caso di omologhi



che presentano una dimensione inferiore rispetto alle
sequenze dell'invenzione), allora detto allineamento può
essere condotto per mezzo di un algoritmo convenzionale,
quale quello descritto in Smith e Waterman (J. Mol. Evol.
5 1981; 18(1) 38-46).

L'invenzione fornisce sistemi codificanti per
sequenze amminoacidiche omologhe che sono "simili" a SEQ
ID NO:1 o SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:24. La
"similarità" di due sequenze amminoacidiche di interesse
10 mirato può essere determinata calcolando un punteggio di
similarità per le due sequenze amminoacidiche. Come qui
utilizzato, il "punteggio di similarità" si riferisce al
punteggio generato per le due sequenze utilizzando la
matrice di sostituzione amminoacidica BLOSUM62, una
15 penalità di esistenza di gap di 11, e una penalità di
estensione di gap di 1, quando le due sequenze sono
allineate in modo ottimale. Due sequenze sono "allineate
in modo ottimale" quando sono allineate così da produrre
il massimo punteggio possibile per quel paio di sequenze,
20 il che potrebbe richiedere l'introduzione di gap in una o
entrambe le sequenze per ottenere quel punteggio massimo.
Due sequenze amminoacidiche sono sostanzialmente simili se
il loro punteggio di similarità supera un certo valore di
soglia. Il valore di soglia può essere qualsiasi numero
25 intero nell'intervallo da almeno 1.190 al punteggio più



alto possibile per una particolare sequenza di riferimento
(ad esempio, SEQ ID NO:1). Ad esempio, il punteggio di
similarità di soglia può essere 1.190, 1.200, 1.210, 1.220,
1.230, 1.240, 1.250, 1.260, 1.270, 1.280, 1.290, 1.300,
5 1.310, 1.320, 1.330, 1.340, 1.350, 1.360, 1.370, 1.380,
1.390, 1.400, 1.410, 1.420, 1.430, 1.440, 1.450, 1.460,
1.470, 1.480, 1.490, 1.500, o superiore. Se in una
particolare forma di realizzazione dell'invenzione, il
punteggio di soglia è impostato, ad esempio, a 1.300, e la
10 sequenza di riferimento è SEQ ID NO:1, allora qualsiasi
sequenza amminoacidica che può essere allineata in modo
ottimale con SEQ ID NO:1 per generare un punteggio di
similarità maggiore di 1.300 sarà "simile" a SEQ ID NO:1.

Le matrici di sostituzione amminoacidica e il loro
15 uso nel quantificare la similarità fra due sequenze sono
ben noti nell'arte e descritti, ad esempio, in Dayhoff *et*
al. (1978), "A model of evolutionary change in proteins",
"Atlas of Protein Sequence and Structure," Vol. 5, Suppl.
3 (ed. M. O. Dayhoff), pagg. 345-352. Natl. Biomed. Res.
20 Found., Washington, D.C. e in Henikoff *et al.* (1992) Proc.
Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919. Sebbene
l'allineamento ottimale e il punteggio possano essere
realizzati manualmente, il processo è facilitato dall'uso
di un algoritmo di allineamento implementato da computer,
25 ad esempio, BLAST 2.0 con gap, descritto in Altschul *et*

al., (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, e reso
disponibile al pubblico presso il sito web del National
Center for Biotechnology Information. Per generare
punteggi di similarità accurati utilizzando NCBI BLAST, è
5 importante disattivare qualsiasi filtro, ad esempio filtro
bassa complessità, e disabilitare l'uso di statistiche
basate sulla composizione. Sarebbe altresì doveroso
verificare che siano utilizzate le corrette matrici di
sostituzione e penalità di gap. Allineamenti ottimali, ivi
10 inclusi allineamenti multipli, possono essere preparati
utilizzando, ad esempio, PSI-BLAST, disponibile attraverso
il sito internet NCBI e descritto da Altschul *et al.*,
(1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

In un'altra forma di realizzazione, il sistema
15 vettore per uso secondo l'invenzione può consentire
l'espressione di un frammento funzionale del polipeptide
otoferlina. Il termine "**frammento funzionale**" designa qui
qualsiasi frammento del polipeptide otoferlina umana o
qualsiasi frammento di un polipeptide avente una sequenza
20 omologa come sopra definito, in cui detto frammento
mantiene almeno una funzione biologica del polipeptide
otoferlina che è di interesse nel presente contesto. Ad
esempio, questa funzione biologica è correlata alla
modulazione della fusione di vescicole a livello delle
25 sinapsi a nastro di cellule capellute interne cocleari che

attivano i neuroni uditivi primari (Roux *et al.* 2006; Michalski *et al.*, *Elife*, 7 novembre 2017;6 e31013). Questa modulazione potrebbe essere valutata con misure elettrofisiologiche classiche *ex vivo*.

5 Ad esempio, detto frammento funzionale può presentare la sequenza amminoacidica riportata in SEQ ID NO:6 (corrispondente all'isoforma b avente un numero Genbank NP_004793.2) o in SEQ ID NO:24 (corrispondente all'isoforma c avente un numero Genbank NP_919303.1).
10 Dette sequenze caratterizzano isoforme corte del polipeptide otoferlina umana di tipo selvatico, comprendenti soltanto tre domini C2.

Secondo questo aspetto dell'invenzione, il sistema vettore per uso secondo l'invenzione è somministrato a
15 pazienti affetti da sordità DFNB9. Con "pazienti affetti da sordità DFNB9" è qui inteso un paziente, in special modo un paziente umano, che si ritiene presenti (o in cui sia stata posta diagnosi di) una mutazione nel gene costitutivo per l'otoferlina, detta mutazione innescando
20 un'espressione, funzione o entrambe, anomala/e della proteina otoferlina. In una particolare forma di realizzazione, detta mutazione può essere termosensibile.

Ad oggi, sono state riportate più di 60 mutazioni patogeniche a livello della otoferlina (si veda la Figura
25 7). Fra queste vi sono almeno cinque mutazioni



termosensibili, identificate in pazienti affetti da sordità episodica condizionata da febbre (P.Q994VfsX6, P.I515T, p.G541S, PR1607W, p.E1804del).

Questi pazienti possono essere identificati dal
5 medico specialista, ad esempio, utilizzando una
combinazione di esami elettrofisiologici delle risposte
del tronco cerebrale a stimoli acustici (ABR) e/o esami
genetici per identificare mutazioni nel gene OTOF. In
alcune forme di realizzazione, il paziente presenta una o
10 più delle seguenti mutazioni nonsense o missenso nel gene
OTOF: TYR730TER, GLN829TER, PR01825ALA, PRO50ARG,
LEU1011PRO, ILE515THR, ARG1939GLN o GLY541SER. In alcune
forme di realizzazione, il paziente presenta una
transizione da A a G in corrispondenza della giunzione
15 introne 8/esone 9 (IVS8-2AG) o una transizione da G a A in
posizione +1, il primo nucleotide intronico nel sito di
splicing donatore dell'esone 5 o una trasversione G-C nel
sito di splicing donatore dell'introne 39. In alcune forme
di realizzazione, il paziente presenta una delezione di un
20 paio di basi (1778G) nell'esone 16, il che porta a un
codone di stop, e un cambiamento 6141G-A, da cui risulta
una sostituzione da ARG a GLN nell'esone 48.

I pazienti a cui è somministrato il sistema vettore
per uso secondo l'invenzione sono pazienti, in special
25 modo pazienti umani, in cui il sistema uditivo, in

particolare la coclea, è già sviluppato e maturo. Questi
pazienti, in special modo pazienti umani, non sono pertanto
embrioni o feti umani, poiché la somministrazione non è
intesa essere effettuata a livello uterino. Secondo la
5 Figura 7, i pazienti di interesse mirato per la presente
invenzione sono preferibilmente neonati umani, tipicamente
di età inferiore a 6 mesi, o anche di età inferiore a 3
mesi, se sia stata posta diagnosi di sordità DFNB9 a
quell'età. Questi bambini umani sono più preferibilmente
10 fra 3 mesi e 1 anno.

Degno di nota, la coclea umana nel suo insieme
raggiunge una dimensione adulta fra 17 e 19 settimane di
gestazione e raggiunge completa maturazione dal punto di
vista morfologico a 30-36 settimane (corrispondente a 12
15 giorni dopo la nascita nel topo). La maturazione funzionale
della sinapsi a nastro di cellule capellute interne può
essere valutata monitorando l'onda I della registrazione
ABR, che può essere registrata alla 28a settimana di
gestazione circa negli esseri umani. Le registrazioni e le
20 analisi dell'onda I di ABR (che riflette la funzione delle
sinapsi delle cellule capellute interne con i neuroni
uditivi primari) hanno mostrato una completa maturazione
funzionale in bambini umani alla nascita (corrispondente
a 20 giorni dopo la nascita nel topo). Questo è ben noto
25 nell'arte (si veda, ad esempio, Pujol e Lavigne-Rebillard,



Acta oto-laryngologica. Supplementum · Febbraio 1991).

È pertanto altresì possibile somministrare il sistema
vettore per uso secondo l'invenzione a pazienti umani più
anziani, quali infanti (2-6 anni), bambini (6-12 anni),
5 adolescenti (12-18 anni) o soggetti umani adulti (18 anni
e oltre).

Complessivamente, si preferisce pertanto
somministrare il sistema vettore per uso secondo
l'invenzione a pazienti umani di età compresa fra 3 mesi
10 e 25 anni.

I pazienti dell'invenzione sono in particolare
bambini in cui sia stata posta diagnosi di sordità DFNB9
dopo acquisizione del linguaggio.

In un'altra particolare forma di realizzazione, i
15 pazienti sono esseri umani di 6 anni di età e più, ossia,
la somministrazione del trattamento ha luogo quando il
loro sistema nervoso centrale è completamente maturo (cfr.
Figura 7).

In una particolare forma di realizzazione, il sistema
20 vettore per uso secondo l'invenzione è somministrato a
pazienti umani affetti da sordità DFNB9 indotta da
mutazioni termosensibili, preferibilmente ad adolescenti
o adulti umani che portano almeno una delle mutazioni
termosensibili di otoferlina sopra menzionate.

25 Come qui utilizzato, il termine "**trattare**" è inteso

significare la somministrazione di una quantità
terapeuticamente efficace di uno dei sistemi vettore
dell'invenzione a un paziente affetto da sordità DFNB9, al
fine di ripristinare parzialmente o completamente l'udito
5 in detto paziente. Detto recupero può essere valutato
esaminando le risposte del tronco cerebrale a stimoli
acustici (ABR) con dispositivi elettrofisiologici.
"Trattamento della sordità DFNB9" è in particolare inteso
designare il ripristino completo della funzione uditiva
10 indipendentemente dai meccanismi cellulari coinvolti.

Per pazienti che portano mutazioni termosensibili, il
sistema vettore può essere altresì somministrato per
prevenire la perdita dell'udito indotta dalla modulazione
della temperatura corporea. Nel contesto della presente
15 invenzione, il termine "**prevenire**" designa compromettere
o ritardare la perdita di udito all'interno di un
intervallo di frequenze udibili.

In questi e in altri pazienti DFNB9, il sistema
vettore può essere somministrato sia per prevenire la
20 perdita dell'udito prima che essa si verifichi, sia per
ripristinare la capacità uditiva quando la perdita
dell'udito si è già verificata.

Sono state esplorate molteplici vie di erogazione
all'orecchio interno. Queste includono un'iniezione
25 all'interno degli spazi perilinfatici attraverso la

membrana finestra rotonda (RWM) e attraverso la finestra
ovale e un'iniezione all'interno della scala timpanica o
della scala vestibolare attraverso cocleostomia. Una
distribuzione in tutti gli spazi perilinfatici è stata
5 dimostrata per tutte queste vie di erogazione. Inoltre, è
stato dimostrato che il flusso per avvezione attraverso la
coclea e gli organi vestibolari può facilitare la
distribuzione di agenti terapeutici dalla sede di
iniezione a regioni più distanti dell'orecchio interno.
10 Un'erogazione negli spazi endolinfatici è stata anch'essa
esplorata attraverso cocleostomia nella scala media,
attraverso canalostomia e mediante iniezione nel sacco
endolinfatico. Questi approcci davano anch'essi un'ampia
distribuzione, ma affrontano la sfida aggiunta data dalla
15 rottura della barriera fra endolinfa ad alto contenuto di
potassio e perilinfa. L'interruzione della barriera pone
due potenziali problemi. In primo luogo, la fuoriuscita di
molto potassio negli spazi perilinfatici che bagnano la
superficie basolaterale di cellule capellute e neuroni può
20 depolarizzare cronicamente queste cellule e portare a
morte cellulare. In secondo luogo, la rottura delle
giunzioni strette fra endolinfa e perilinfa può portare
alla caduta del potenziale endococleare che tipicamente
varia da + 80 a + 120 mV. La caduta del potenziale
25 endococleare riduce la forza motrice per la trasduzione

sensoriale nelle cellule capellute e pertanto porta a una ridotta sensibilità cocleare e a soglie uditive elevate. Evitare queste complicanze è particolarmente impegnativo nella coclea dell'adulto. Tuttavia, individuando a bersaglio spazi endolinfatici nel sistema vestibolare, che non presenta un potenziale endolinfatico, ma sono in continuità con spazi endolinfatici cocleari, queste problematiche confondenti possono essere ridotte al minimo fornendo al contempo pur ancora una distribuzione sufficiente all'interno della coclea (Ahmed *et al.*, JARO 18:649-670 (2017)).

La coclea è altamente compartimentata e separata dal resto del corpo dalla barriera ematococleare (BCB), che riduce al minimo il volume di iniezione terapeutica e la fuoriuscita nel sistema circolatorio generale del corpo, per proteggere il privilegio immunitario cocleare e ridurre la possibilità di risposte immunitarie avverse sistemiche. Poiché le cellule capellute e le cellule di supporto nella coclea normalmente non si dividono, le cellule nella coclea rimangono stabili, rendendo pertanto possibile utilizzare vettori virali non integrantisi (ad esempio, AAV) per un'espressione transgenica prolungata.

L'approccio semicircolare è stato suggerito come una via di iniezione promettente per una futura terapia genica cocleare in studi clinici sull'uomo, poiché il canale

semicircolare posteriore sembra essere accessibile anche negli esseri umani (Suzuki *et al.*, Sci. Rep. 7:45524 (2017); Yoshimura *et al.*, Sci. Rep. 8:2980 (2018)).

In una forma di realizzazione preferita
5 dell'invenzione, il sistema vettore è somministrato nell'orecchio umano attraverso una delle due tecniche comuni e ben consolidate che sono utilizzate di routine nella pratica clinica della chirurgica otologica. Più precisamente, questi approcci saranno adottati per
10 individuare a bersaglio gli spazi perilinfatici. A tal fine, le iniezioni che utilizzano un microcatetere saranno condotte attraverso la finestra ovale servendosi di stapedectomia laser (trans-staffa), o
transmastoide/trans-finestra rotonda (Dai C. *et al.*, JARO,
15 18:601-617, 2017).

È altresì possibile una somministrazione sistemica mediante iniezioni o infusioni endovenose.

Il sistema vettore per uso secondo l'invenzione contiene almeno un vettore polinucleotidico che può
20 innescare l'espressione del polipeptide otoferlina di lunghezza intera, o di un suo frammento funzionale, in cellule capellute interne. Preferibilmente, detto vettore polinucleotidico contiene una sequenza codificante per detto polipeptide, o un suo frammento funzionale, che è
25 operativamente collegato a un promotore che consente



l'espressione del gene in dette cellule specificamente.

Detta sequenza codificante è, ad esempio, il gene *otoferlina* umano di SEQ ID NO: 2, corrispondente alla sequenza di cDNA dell'isoforma 1 del gene per l'otoferlina di tipo selvatico umano (NM_194248.2 = isoforma a o variante 1, che è l'isoforma più lunga).

Detta sequenza codificante può essere altresì la sequenza di cDNA più corta NM_001287489.1 (isoforma e o variante 5) di SEQ ID NO:22, la sequenza di cDNA NM_004802.3 (isoforma b o variante 2), la sequenza di cDNA NM_194322.2 (isoforma c o variante 3), o la sequenza di cDNA NM_194323.2 (isoforma d o variante 4).

Un certo numero di vettori virali e non virali è stato sviluppato per l'erogazione di materiale genetico in vari tessuti e organi. Nella maggior parte dei casi, questi vettori sono incompetenti in termini di replicazione e rappresentano una scarsa minaccia di malattia indotta da virus. Piuttosto, il genoma virale era parzialmente o completamente deletato, espandendo la capacità di consentire l'inclusione di carico di DNA terapeutico all'interno del capsido virale. Alcuni vettori includono DNA a singolo filamento, mentre altri includono DNA a doppio filamento. Vettori particolarmente preferiti nel contesto dell'invenzione sono vettori lentivirali, vettori adenovirali, virus Adenoassociati (AAV), come descritto in

Ahmed *et al.*, JARO 18:649-670 (2017).

Specificamente, gli AAV sono piccoli virus dipendenti da Adenovirus con deficit di replicazione della famiglia dei *Parvoviridae*. Presentano un capsidico icosaedrico di 20-
5 25 nm di diametro e un genoma di 4,8 kb fiancheggiato da due ripetizioni terminali invertite (ITR). Dopo spoliatura in una cellula ospite, il genoma di AAV può persistere in uno stato episomiale stabile formando concatameri circolari da testa a coda ad alto peso
10 molecolare, o può integrarsi nel genoma della cellula ospite. Entrambi gli scenari forniscono un'espressione transgenica a lungo termine e ad alto livello.

AAV sembra essere un virus promettente per terapie geniche cocleari sulla base di risultati ottenuti in
15 sperimentazioni umane di terapia genica oculare. Le ragioni del successo di AAV nella terapia genica oculare umana includono: (1) comprovato profilo di sicurezza (un gran numero di studi clinici sull'uomo hanno mostrato che AAV mancano di patogenicità e posseggono immunogenicità
20 molto bassa), (2) espressione transgenica di lunga durata in cellule non in divisione, (3) la piccola dimensione di AAV (~20 nm, che è cinque volte più piccola di quella degli Adenovirus) contribuisce alla diffusione attraverso barriere cellulari nel raggiungere cellule di interesse
25 mirato (Zhang *et al.*, *Frontiers in Molecular Neuroscience*,

vol. 11, Art. 221, 2018).

Il sistema vettore per uso secondo l'invenzione comprende almeno due particelle di AAV, ciascuna di esse comprendendo un polinucleotide comprendente una sequenza
5 codificante parziale che codifica per i) la parte N-terminale del polipeptide otoferlina, o di un suo frammento funzionale, per una, e ii) la parte C-terminale del polipeptide otoferlina, o di un suo frammento funzionale, per l'altra.

10 Dodici sierotipi presenti in natura di AAV umani sono stati caratterizzati ad oggi. Questi sierotipi presentano differenti tropismi intrinseci ed efficienze di trasduzione in muscoli, polmone, fegato, cervello, retina e vasi. Molteplici tentativi di pseudotipizzazione di AAV
15 e ingegnerizzazione dei capsidi sono risultati in un considerevole miglioramento del tropismo e dell'efficienza di trasduzione. Come per le cellule dell'orecchio interno, AAV1-4, 7 e 8 si sono dimostrati in grado di infettare cellule del limbo spirale, del legamento spirale e del
20 ganglio spirale *in vivo*. L'infezione di IHC è stata mostrata anche per AAV1-3, 5, 6 e 8. AAV1 era il maggiormente efficace e infettava occasionalmente OHC e cellule di supporto. Inoltre, AAV5 si è dimostrato efficiente per cellule di Claudius, cellule del ganglio
25 spirale e cellule del solco interno. Fra i vettori

pseudotipizzati, AAV2/1 si è rivelato in grado di trasdurre in modo efficiente cellule progenitrici, dando origine a IHC e OHC nella coclea di topo, e AAV2/2 era ottimale per IHC della coclea del porcellino d'India (Ahmed et al., 5 JARO 18:649-670 (2017)).

Così, in una forma di realizzazione preferita, il sistema vettore contiene un vettore AAV scelto nel gruppo consistente in: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, e AAV10.

10 In una forma di realizzazione più preferita, il sierotipo di detto vettore è AAV2, AAV8, AAV5 o AAV1. In una forma di realizzazione ancora più preferita, il sierotipo di detto vettore è AAV2 o AAV8. AAV8, che è il sierotipo maggiormente preferito nel contesto della 15 presente invenzione, è attualmente esaminato *in vivo*.

Al fine di incrementare l'efficacia dell'espressione genica e prevenire la diffusione non voluta del virus, possono essere apportate modificazioni genetiche di AAV. Queste modificazioni genetiche includono la delezione 20 della regione E1, delezione della regione E1 insieme alla delezione della regione E2 o della regione E4, o delezione dell'intero genoma dell'Adenovirus, ad eccezione delle ripetizioni terminali invertite ad azione cis e di un segnale di impacchettamento. Tali vettori sono 25 vantaggiosamente abbracciati nella presente invenzione.

Inoltre, AAV geneticamente modificati, aventi una proteina di capside mutata possono essere utilizzati in modo da dirigere l'espressione genica verso un particolare tipo di tessuto, ad esempio, verso cellule uditive. A questo fine, possono essere utilizzati vettori AAV di sierotipo 2 e 8 modificati, in cui residui di tirosina nell'involucro virale sono sostituiti da residui di alanina. Nel caso del sierotipo 2 mutante per tirosina, la tirosina 444 può essere sostituita con alanina (AAV2-Y444A). Nel caso del sierotipo 8, la tirosina 733 può essere sostituita con un residuo di alanina (AAV8-Y733A). Utilizzando AAV2-Y444A o AAV8-Y733A, è possibile incrementare il trasferimento genico sino a 10.000 volte, riducendo la quantità di AAV necessaria a infettare le cellule capellute sensoriali della coclea.

In una forma di realizzazione preferita, il polinucleotide/i polinucleotidi esprimenti il polipeptide *otoferlina* o suo gene o frammento funzionale, è/sono contenuto/i in particelle di AAV2 ricombinanti in cui tutti i residui di tirosina sono stati sostituiti da residui di fenilalanina (AAV2 (Y->F) o Quad Y-F, come descritto in Petrs-Silva H *et al.*, Mol. Ther. 19, 293-301 (2011) e negli Esempi più sotto. Residui di tirosina mutati sulla superficie esterna delle proteine capsidiche includono, ad esempio, ma senza limitazioni, mutazioni da Tyr252 a Phe252

(Y252F), da Tyr272 a Phe272 (Y272F), da Tyr444 a Phe444
(Y444F), da Tyr500 a Phe500 (Y500F), da Tyr700 a Phe700
(Y700F), da Tyr704 a Phe704 (Y704F), da Tyr730 a Phe730
(Y730F) e da Tyr733 a Phe733 (Y733F). Questi vettori
5 modificati facilitano la penetrazione del vettore
attraverso le membrane finestra rotonda, che consentono
l'erogazione non invasiva dei vettori alle cellule
capellute/ai neuroni del ganglio spirale della coclea.
Questi vettori mutati evitano la degradazione da parte del
10 proteasoma e la loro efficienza di trasduzione è
significativamente aumentata.

Altre particelle di AAV ricombinanti che derivano dai
sierotipi naturali 1-10 includono ibridi AAV2-AAV3,
AAVrh.10, AAVhu.14, AAV3a/3b, AAVrh32.33, AAV-HSC15, AAV-
15 HSC17, AAVhu.37, AAVrh.8, CHt-P6, AAV2.5, AAV6.2, AAV2i8,
AAV-HSC15/17, AAVM41, AAV9.45, AAV6 (Y445F/Y731F),
AAV2.5T, AAV-HAE1/2, clone AAV 32/83, AAVShH10, AAV8
(Y733F), AAV2.15, AAV2.4, AAVM41, e AAVr3.45 (Asokan A. et
al., Mol. Therapy, vol. 20 n. 4, 699-708, 2012).

20 È altresì possibile utilizzare il vettore sintetico
Anc80L65 che si è dimostrato dotato della più alta
efficienza di trasduzione delle cellule capellute
dell'orecchio interno ad oggi riportata (Suzuki et al.,
Sci. Rep. 7:45524 (2017)). È anche possibile utilizzare
25 AAV associati a esosomi, come proposto da György et al.,

Mol. Ther. 25(2):379-391, 2017.

È altresì possibile utilizzare vettori AAV/PHP.B sovraccarichi i cui capsidi siano stati modificati in modo da potenziare la loro capacità di impacchettamento.

5 Metodi per preparare virus e virioni comprendenti un polinucleotide o costrutto eterologo sono noti nell'arte. Nel caso di AAV, le cellule possono essere co-infettate o trasfettate con Adenovirus o costrutti polinucleotidici comprendenti geni di Adenovirus adatti a una funzione
10 helper di AAV. Esempi di materiali e metodi sono descritti, ad esempio, in U.S. 8,137,962 e 6,967,018.

L'esperto del ramo determinerà facilmente se sia necessario, prima della somministrazione del/dei vettore/i dell'invenzione, potenziare la permeabilità della membrana
15 finestra rotonda, come proposto in WO 2011/075838, a seconda della cellula bersaglio.

Anche qualora si utilizzi AAV, il sistema può essere un sistema a un unico vettore. In questo caso, possono essere utilizzati capsidi modificati (cfr. vettori
20 AAV/PHP.B).

Se il capsido di AAV scelto presenta una capacità di impacchettamento limitata di 5 kilobasi, è meglio utilizzare sistemi a duplice vettore, come descritto, ad esempio, in WO 2013/075008, che è qui incorporato per
25 riferimento.

I presenti inventori hanno utilizzato detto approccio a duplice vettore AAV per fornire le due mezze porzioni del gene *otoferlina* alle cellule capellute interne, dove si verifica una ricombinazione omologa ed è espressa la proteina di lunghezza intera. I loro risultati mostrano che i due distinti vettori AAV sono in grado di trasdurre in modo efficiente le cellule capellute interne di interesse mirato, dove la proteina *otoferlina* viene prodotta e ripristina in via duratura il fenotipo di sordità profonda di topi KO per *OTOF* che soffrono di sordità congenita dovuta ad invalidazione *DFNB9*.

Di conseguenza, il sistema vettore per uso secondo l'invenzione comprende preferibilmente almeno due particelle di AAV, ciascuna di dette particelle di AAV comprendendo:

a) un primo polinucleotide comprendente una ripetizione terminale invertita in corrispondenza di ciascuna estremità di detto polinucleotide, e, fra le dette ripetizioni terminali invertite, da 5' a 3': un promotore adatto seguito da una sequenza codificante parziale che contiene la parte N-terminale del gene *otoferlina*, e un sito di splicing donatore, o

b) un secondo polinucleotide comprendente una ripetizione terminale invertita in corrispondenza di ciascuna estremità di detto polinucleotide, e, fra le dette

ripetizioni terminali invertite, da 5' a 3': un sito di splicing accettore, una sequenza codificante parziale che contiene la parte C-terminale del gene *otoferlina*, opzionalmente seguita da una sequenza di poliadenilazione,

5 in cui i detti polinucleotidi primo e secondo contengono altresì una sequenza ricombinogenica che si localizza dopo il sito di splicing donatore in detto primo polinucleotide e prima del sito di splicing accettore in detto secondo polinucleotide, e

10 in cui le sequenze codificanti nei polinucleotidi primo e secondo, quando combinate, codificano per la lunghezza intera del polipeptide *otoferlina*.

Questa forma di realizzazione preferita utilizza un "primo" e un "secondo" polinucleotide. Resta tuttavia

15 inteso che "primo" e "secondo" non sono intesi implicare un particolare ordine di importanza, se non espressamente affermato altrimenti.

Come spiegato nella Figura 1 e in WO 2013/075008, i polinucleotidi primo e secondo utilizzati in questa

20 particolare forma di realizzazione dovrebbero contenere specifiche componenti genetiche al fine di indurre la ricombinazione e l'espressione appropriate della proteina *otoferlina* nelle cellule bersaglio.

Queste componenti specifiche sono le seguenti:

25 • ITR

In alcune forme di realizzazione dell'invenzione, il cDNA parziale o di lunghezza intera del gene *OTOF* è inserito in due plasmidi contenenti ITR.

Se è/sono utilizzato/i un vettore/i AAV, le sequenze ITR di un polinucleotide qui descritto possono essere derivate da qualsiasi sierotipo di AAV (ad esempio, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) o possono essere derivate da più di un sierotipo. In alcune forme di realizzazione del polinucleotide qui fornito, le sequenze ITR sono derivate da AAV2. Sequenze ITR e plasmidi contenenti sequenze ITR sono noti nell'arte e disponibili in commercio.

Una sequenza ITR di AAV2 esemplificativa per fiancheggiare l'estremità 5' di un costrutto di espressione comprende la sequenza SEQ ID NO:10. Una sequenza ITR di AAV2 esemplificativa per fiancheggiare l'estremità 3' di un costrutto di espressione comprende la sequenza SEQ ID NO:11.

Tali ITR possono anche essere utilizzate vantaggiosamente se il polinucleotide è un sistema a singolo vettore.

- Un promotore adatto

I promotori contemplati per uso nel sistema vettore includono, ma senza limitazioni, promotore del Citomegalovirus (CMV), promotore di SV40, promotore del virus del sarcoma di Rous (RSV), promotore chimerico di



CMV/beta-actina di pollo (CBA) e la forma tronca di CBA (smCBA) (brevetto statunitense n. 8,298,818). In una forma di realizzazione specifica, il promotore è un promotore chimerico comprendente promotore di CMV e di beta-actina.

5 In una forma di realizzazione preferita, il promotore utilizzato nel sistema vettore per uso secondo l'invenzione è il promotore chimerico tronco di CMV/ β actina (smCBA) di SEQ ID NO:8 o un promotore comprendente un'identità di sequenza di almeno il 75%, almeno l'80%,
10 almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98%, almeno il 99% o il 100% rispetto a SEQ ID NO:8.

Tali promotori possono essere altresì utilizzati vantaggiosamente se il polinucleotide dell'invenzione è un
15 sistema a singolo vettore.

I promotori possono essere incorporati in un vettore utilizzando tecniche standard note nell'arte. Copie multiple di promotori o promotori multipli possono essere utilizzati nei sistemi vettore. In una forma di
20 realizzazione, il promotore può essere posizionato a circa la stessa distanza dal sito di inizio della trascrizione poiché esso è dal sito di inizio della trascrizione nel suo ambiente genetico naturale. È consentita una certa qual variazione di questa distanza senza sostanziale
25 riduzione dell'attività del promotore. Un sito di inizio

di trascrizione è tipicamente incluso nel vettore.

• Una sequenza ricombinogenica che promuove la ricombinazione omologa delle due semisequenze del cDNA *in vivo*, così da produrre l'intera sequenza codificante del polipeptide *OTOF* e la sua espressione nelle cellule capellute interne trasfettate.

In alcune forme di realizzazione, i due polinucleotidi (ad esempio, polinucleotidi primo e secondo) comprendono una cosiddetta "regione ricombinogenica" che può promuovere la ricombinazione omologa fra i due polinucleotidi una volta erogati a una cellula (si veda, ad esempio, Ghosh *et al.* Hum Gene Ther. gennaio 2011;22(I):77-83).

Questa regione ricombinogenica consiste tipicamente in una prima regione del primo polinucleotide che presenta una regione omologa nel secondo polinucleotide, o viceversa. Le due regioni presentano preferibilmente un livello soglia di identità di sequenza fra loro di almeno il 75%, almeno l'80%, almeno il 90%, almeno il 95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98%, almeno il 99% o il 100% di identità, come sopra definito.

Questa regione ricombinogenica presenta preferibilmente una dimensione compresa fra 50 e 500, 50 e 400, 50 e 300, 100 e 500, 100 e 400, 100 e 300, 200 e 500, 200 e 400, o 200 e 300 nucleotidi.

In una forma di realizzazione preferita, le due regioni sono identiche e presentano una dimensione compresa fra 200 e 300 nucleotidi.

Queste sequenze ricombinogeniche hanno sequenze che
5 sono sufficientemente omologhe da consentire l'ibridazione fra loro in condizioni stringenti standard e metodi standard.

Come qui utilizzato, condizioni "stringenti" per ibridazione si riferisce a condizioni in cui l'ibridazione
10 è tipicamente condotta per tutta la notte a 20 - 25 °C al di sotto della temperatura di fusione (T_m) dell'ibrido di DNA in SSPE 6 x, soluzione di Denhardt 5 x, SDS 0,1%, DNA denaturato 0,1 mg/mL. La temperatura di fusione è descritta dalla seguente Formula: $T_m = 81,5 \text{ °C} + 16,6 \text{ Log}[\text{Na}^+] +$
15 $0,41 (\% \text{ G+C}) - 0,61 (\% \text{ formammide}) - 600/\text{lunghezza del duplex in paia di basi}.$

I lavaggi sono tipicamente ottenuti come segue: (1) Due volte a temperatura ambiente per 15 minuti in SSPE 1 x, SDS 0,1% (lavaggio a bassa stringenza). 2) Una volta a
20 $T_m - 20 \text{ °C}$ per 15 minuti in SSPE 0,2 x, SDS 0,1% (lavaggio a stringenza moderata).

In una forma di realizzazione più preferita, le due regioni sono identiche e presentano la sequenza SEQ ID NO:9 o una sequenza omologa avente un'identità di sequenza
25 di almeno il 75%, almeno l'80%, almeno l'85%, almeno il

90%, almeno il 95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98%, almeno il 99% o il 100% rispetto a SEQ ID NO:9.

- un sito di splicing donatore e un sito di splicing accettore

5 Una volta ricombinato *in vivo*, il cDNA a lunghezza intera contiene una coppia donatore di splicing/accettore di splicing che causa splicing al di fuori della regione ricombinogenica. I polinucleotidi inclusi nel sistema a duplice vettore comprendono un sito di splicing donatore
10 o un sito di splicing accettore. In una forma di realizzazione preferita, i siti di splicing donatore e/o di splicing accettore contengono sequenze consenso di splicing. In una forma di realizzazione più preferita, i siti di splicing donatore e/o di splicing accettore
15 trasportati dai polinucleotidi inclusi nel sistema vettore contengono sequenze consenso di splicing derivate dall'enzima fosfatasi alcalina.

In una forma di realizzazione preferita, i polinucleotidi inclusi nel sistema a duplice vettore per
20 uso secondo l'invenzione comprendono SEQ ID NO:12 e/o SEQ ID NO:13 come sito di splicing donatore e accettore, rispettivamente, o siti di splicing comprendenti un'identità di sequenza di almeno il 75%, almeno l'80%, almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 95%, almeno il 96%,
25 almeno il 97%, almeno il 98%, almeno il 99% o il 100%

rispetto a SEQ ID NO:12 e/o SEQ ID NO:13.

Le sequenze polinucleotidiche, contenute in un sistema a singolo o a duplice vettore, possono contenere altre componenti regolatorie che sono funzionali nelle
5 cellule capellute interne in cui il vettore deve essere espresso. Un esperto del ramo potrà selezionare elementi regolatori per un uso in cellule capellute interne umane. Elementi regolatori includono, ad esempio, sito interno di entrata del ribosoma (IRES), sequenze di terminazione
10 della trascrizione, sequenze di terminazione della traduzione, enhancer ed elementi di poliadenilazione.

Le regioni di terminazione della trascrizione possono essere tipicamente ottenute dalla regione non tradotta 3' di una sequenza genica eucariotica o virale. Sequenze di
15 terminazione di trascrizione possono essere posizionate a valle di una sequenza codificante per fornire una terminazione efficiente. La sequenza peptidica segnale è una sequenza ammino-terminale che codifica per le informazioni responsabili della ricollocazione di un
20 polipeptide, operativamente collegato, a un'ampia gamma di destinazioni cellulari post-traduzionali, che vanno da uno specifico comparto di organelli a siti di azione proteica e all'ambiente extracellulare. Gli enhancer sono elementi agenti in cis che incrementano la trascrizione genica e
25 possono anche essere inclusi in un vettore. Elementi

enhancer sono noti nell'arte e includono, ma senza limitazioni, l'elemento enhancer di CaMV 35S, l'elemento enhancer promotore precoce di Citomegalovirus (CMV) e l'elemento enhancer di SV40.

5 Sequenze di DNA che dirigono la poliadenilazione dell'mRNA codificato dal gene strutturale possono anch'esse essere incluse in un vettore.

Un approccio a duplice vettore è vantaggioso per spezzare la sequenza codificante del gene *OTOF* in due
10 parti, per rendere più facile l'impacchettamento in virioni aventi una capacità di impacchettamento limitata. Quando sono utilizzati capsidi di AAV, si preferisce utilizzare polinucleotidi che contengono una sequenza codificante per *OTOF* che contenga non più di 5 kilobasi,
15 non più di 4 kilobasi, e ancor più preferibilmente non più di 3 kilobasi.

La sequenza codificante del gene *OTOF* umano è preferibilmente tagliata in un sito di splicing naturale.

Ad esempio, l'isoforma 1 del gene *OTOF* umano di SEQ
20 ID NO:2 può essere spezzata in una parte N-terminale avente una sequenza nucleotidica così come presentata in SEQ ID NO:3 (nucleotidi 1 - 2.676 di SEQ ID NO:2) e una parte C-terminale avente una sequenza nucleotidica così come presentata in SEQ ID NO:4 (nucleotidi 2.677 - 5.994 di SEQ
25 ID NO:2). E l'isoforma 5 del gene *OTOF* umano avente SEQ ID

NO:22 può essere spezzata in una parte N-terminale di SEQ ID NO:3 e una parte C-terminale di SEQ ID NO:23.

Polinucleotidi esemplificativi che possono essere utilizzati come primo e secondo polinucleotide nel sistema vettore sono, ad esempio, SEQ ID NO:19 e SEQ ID NO:20, rispettivamente. Questi due polinucleotidi codificano rispettivamente per la parte N-terminale e per la parte C-terminale dell'isoforma 1 della proteina umana otoferlina.

SEQ ID NO:19 contiene:

- 10 - la sequenza ITR 5' di AAV2 avente la sequenza SEQ ID NO: 10 (nt 20 - 162)
- l'enhancer di CMV (nt 186 - 440), il promotore di β -actina del pollo (nt 441 - 835), l'esone 1 e l'introne chimerico della proteina β -actina (nt 836 - 1.130), tutti
15 i tre essendo denominati "smCBA", corrispondenti alla sequenza SEQ ID NO:8,
- la parte 5' della sequenza codificante per l'isoforma 1 della otoferlina umana avente la sequenza SEQ ID NO:3 (nt 1.153 - 3.558),
- 20 - il sito di splicing donatore della fosfatasi alcalina avente la sequenza SEQ ID NO:12 (nt 3.559 - 3.642),
- la sequenza ricombinogenica avente la sequenza SEQ ID NO:9 (nt 3.649 - 3.935), e
- 25 - la sequenza ITR 3' di AAV2 avente la sequenza SEQ

ID NO:11.

D'altra parte, SEQ ID NO:20 contiene:

- la sequenza ITR 5' di AAV2 avente la sequenza SEQ
ID NO: 10 (nt 20 - 162),

5 - la sequenza ricombinogenica avente la sequenza SEQ
ID NO:9 (nt 207 - 493),

- il sito di splicing accettore della fosfatasi
alcalina avente la sequenza SEQ ID NO: 13 (nt 516 - 564),

- la parte 3' della sequenza codificante per
10 l'isoforma 1 della otoferlina umana avente la sequenza SEQ
ID NO:4 (nt 565 - 4.152),

e

- il segnale di poliadenilazione dell'ormone della
crescita del bovino (nt 4.190 - 4.411), e

15 - la sequenza ITR 3' di AAV2 avente la sequenza SEQ
ID NO:11.

Polinucleotidi esemplificativi che possono essere
utilizzati come primo e secondo polinucleotide nel sistema
vettore sono, ad esempio, SEQ ID NO:19 e SEQ ID NO:21,
20 rispettivamente. Questi due polinucleotidi codificano
rispettivamente per la parte N-terminale e per la parte C-
terminale dell'isoforma 5 del gene umano dell'otoferlina
di SEQ ID NO:22 (poiché le parti N-terminali delle isoforme
1 e 5 sono identiche, è possibile utilizzare SEQ ID NO:19
25 per indurre l'espressione delle due isoforme).

SEQ ID NO:21 contiene:

- la sequenza ITR 5' di AAV2 avente la sequenza SEQ
ID NO: 10 (nt 20 - 162),

- la sequenza ricombinogenica avente la sequenza SEQ
5 ID NO:9 (nt 207 - 493),

- il sito di splicing accettore della fosfatasi
alcalina avente la sequenza SEQ ID NO: 13 (nt 516 - 564),

- la parte 3' della sequenza codificante per
l'isoforma 5 della otoferlina umana avente la SEQ ID NO:23
10 (nt 565 - 4.152),

e

- il segnale di poliadenilazione dell'ormone della
crescita del bovino (nt 4.190 - 4.411), e

- la sequenza ITR 3' di AAV2 avente la sequenza SEQ
15 ID NO:11.

Composizioni farmaceutiche per uso secondo l'invenzione

In un altro aspetto, la presente invenzione mette a
segno una composizione farmaceutica comprendente il
sistema vettore, così come sopra descritto (ossia, i
20 polinucleotidi o i virioni contenenti lo stesso), per uso
nel trattare pazienti, in special modo pazienti umani,
aventi un sistema uditivo maturo,

affetti da sordità DFNB9, o nel prevenire la sordità
DFNB9 in pazienti aventi mutazioni DFNB9.

25 Più in generale, questa composizione farmaceutica può

essere somministrata a soggetti umani affetti da perdita congenita dell'udito dovuta ad un'espressione alterata o deficitaria del gene DFNB59. Detto deficit può essere osservato, ad esempio, quando otoferlina è espressa a
5 livelli normali, ma non è funzionale.

È descritto l'uso del sistema vettore come sopra descritto, per fabbricare composizioni farmaceutiche destinate a prevenire e/o trattare pazienti che presentano un sistema uditivo maturo, in special modo esseri umani,
10 affetti dai succitati disordini, collegati ad un'espressione alterata o deficitaria del gene *DFNB59*.

Come qui utilizzato, "**trasportatore farmaceuticamente accettabile**" include qualsiasi e tutti i solventi, mezzi di dispersione, rivestimenti, agenti antibatterici e
15 antifungini, agenti di isotonicità e ritardanti l'assorbimento e simili che sono fisiologicamente compatibili. Esempi di trasportatori farmaceuticamente accettabili includono uno o più fra acqua, soluzione salina, tampone fosfato salino, destrosio, glicerolo,
20 etanolo e simili, nonché loro combinazioni. In molti casi, può essere preferibile includere nella composizione agenti isotonici, ad esempio, zuccheri, polialcoli, quali mannitolo, sorbitolo, o cloruro di sodio. Trasportatori farmaceuticamente accettabili possono ulteriormente
25 comprendere quantità minori di sostanze ausiliarie, quali

agenti umettanti o emulsionanti, conservanti o tamponi, che potenziano la vita da banco o l'efficacia dei composti antiossidanti o delle composizioni farmaceutiche contenenti gli stessi.

5 Le composizioni farmaceutiche per uso secondo l'invenzione possono essere in una varietà di forme. Queste includono, ad esempio, forme di dosaggio semisolide e solide, quali soluzioni liquide (ad esempio, soluzioni iniettabili e da infondere), dispersioni o sospensioni,
10 compresse, pillole, polveri, liposomi e supposte. La forma utilizzata dipende dalla modalità di somministrazione prevista e dall'applicazione terapeutica. Composizioni tipiche sono sotto forma di soluzioni iniettabili o da infondere.

15 Le composizioni farmaceutiche devono essere tipicamente sterili e stabili nelle condizioni di fabbricazione e stoccaggio. La composizione farmaceutica è preferibilmente formulata come una soluzione, microemulsione, dispersione, liposoma o altra struttura
20 ordinata, adatta a un'elevata concentrazione di farmaco. Soluzioni iniettabili sterili possono essere preparate incorporando i vettori nella quantità necessaria in un solvente appropriato con un ingrediente, o una combinazione di ingredienti, sopra elencato/i, come
25 necessario, a cui fa seguito la sterilizzazione per

filtrazione. In generale, le dispersioni sono preparate incorporando i vettori in un veicolo sterile che contiene un mezzo di dispersione basico e gli altri ingredienti richiesti fra quelli sopra elencati. Nel caso di polveri
5 liofilizzate sterili per la preparazione di soluzioni iniettabili sterili, i metodi preferiti di preparazione sono essiccamento sotto vuoto ed essiccamento a spruzzo che dà una polvere del principio attivo più qualsiasi ingrediente desiderato aggiuntivo a partire da una sua
10 soluzione precedentemente filtrata per la sterilizzazione. La fluidità corretta di una soluzione può essere mantenuta, ad esempio, mediante l'uso di un rivestimento, quale lecitina, mediante il mantenimento della granulometria richiesta nel caso di una dispersione e mediante l'uso di
15 tensioattivi. Un assorbimento prolungato di composizioni iniettabili può essere ottenuto includendo un agente nella composizione che ritardi l'assorbimento, ad esempio, sali monostearati e gelatina.

Nel contesto dell'invenzione, la modalità tipica di
20 somministrazione della composizione è intratimpanica (nell'orecchio medio), intracocleare o parenterale (ad esempio, endovenosa, sottocutanea, intraperitoneale, intramuscolare, intratecale). In un esempio, la composizione farmaceutica è somministrata mediante
25 infusione o iniezione endovenosa. In un altro esempio, la

composizione farmaceutica dell'invenzione è erogata in una posizione specifica utilizzando erogazione stereostatica, in particolare attraverso la membrana timpanica o l'osso mastoide nell'orecchio medio.

5 Più precisamente, le composizioni possono essere somministrate utilizzando un microcatetere che sarà posizionato attraverso la finestra ovale servendosi di stapedectomia laser (trans-staffa), o transmastoide/trans-finestra rotonda (Dai C. *et al.*, JARO, 10 18:601-617, 2017).

In una forma di realizzazione preferita, la composizione farmaceutica dell'invenzione è somministrata nell'orecchio umano mediante somministrazione intra-cocleare, più precisamente individuando in maniera mirata 15 spazi endolinfatici nel sistema vestibolare o mediante l'approccio semicircolare summenzionato.

Le composizioni farmaceutiche per uso secondo l'invenzione includono tipicamente una **"quantità terapeuticamente efficace"** o una **"quantità 20 profilatticamente efficace"** dei vettori per un uso secondo l'invenzione. Una "quantità terapeuticamente efficace" si riferisce alla quantità dei vettori che è efficace, a dosaggi e per periodi di tempo necessari, nell'ottenere il risultato terapeutico desiderato, in questo caso sia per 25 la profilassi che per il trattamento della perdita

dell'udito senza tossicità inaccettabile o effetti collaterali indesiderabili.

Una quantità terapeuticamente efficace dei vettori può variare a seconda di fattori, quali lo stato di
5 malattia, età, genere e peso del soggetto, e la capacità di detto composto di evocare una risposta desiderata nello stesso. Una quantità terapeuticamente efficace può essere altresì una quantità in cui qualsiasi effetto tossico o dannoso dei composti rivendicati sia superato dagli
10 effetti di beneficio terapeutico. Una "quantità profilatticamente efficace" si riferisce a una quantità dei vettori dell'invenzione che è efficace, a dosaggi e per periodi di tempo necessari, nell'ottenere il risultato profilattico desiderato. Tipicamente, poiché una dose
15 profilattica è utilizzata in soggetti prima della, o in uno stadio precoce della, malattia, la quantità profilatticamente efficace sarà usualmente minore della quantità terapeuticamente efficace.

Regimi di dosaggio possono essere corretti per
20 fornire la risposta desiderata ottimale (ad esempio, una risposta terapeutica o profilattica). Ad esempio, può essere somministrato un singolo bolo, possono essere somministrate nel tempo svariate dosi suddivise o la dose può essere ridotta o aumentata in modo proporzionale, come
25 indicato dalle esigenze della situazione terapeutica.



Forma unitaria di dosaggio, come qui utilizzata, si riferisce a unità fisicamente discrete adatte come dosaggi unitari per i soggetti mammiferi da trattare; ciascuna unità contenente una quantità prestabilita del composto
5 vettore dell'invenzione, calcolata per produrre l'effetto terapeutico o profilattico desiderato in associazione al trasportatore farmaceutico richiesto. La descrizione per le forme unitarie di dosaggio può essere dettata da, e direttamente dipendente da, (a) le caratteristiche proprie
10 del vettore/dei vettori e il particolare effetto terapeutico o profilattico da ottenere, e (b) le limitazioni intrinseche nell'arte della formulazione di tale/i vettore/i per trattare o prevenire la perdita dell'udito in un soggetto.

15 In alcune forme di realizzazione, dove si devono utilizzare le particelle di AAV prima e seconda, i polinucleotidi/le particelle di AAV primi/e e secondi/e possono essere contenuti all'interno della medesima composizione o all'interno di composizioni differenti e
20 possono essere somministrati insieme o separatamente.

In alcune forme di realizzazione, la composizione dell'invenzione contiene da 10^6 a 10^{14} particelle/mL o da 10^{10} a 10^{15} particelle/mL, o qualsiasi valore ivi frammezzo per uno o per l'altro intervallo, quale, ad esempio, circa
25 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} o 10^{14} particelle/mL.

In una forma di realizzazione, la composizione dell'invenzione contiene più di 10^{13} particelle di AAV/mL.

In alcune forme di realizzazione, quando sono somministrata una prima particella di AAV comprendente un
5 primo polinucleotide e una seconda particella di AAV comprendente un secondo polinucleotide, la quantità somministrata è la medesima per entrambe le particelle.

Sono descritti metodi di trattamento che comportano la somministrazione del sistema vettore e composizioni
10 farmaceutiche contenenti lo stesso, a pazienti, in special modo pazienti umani aventi un sistema uditivo maturo, affetti da sordità DFNB9. Tutte le forme di realizzazione sopra descritte si applicano a detti metodi di trattamento.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

15 **La Figura 1 mostra l'espressione di otoferlina in cellule HEK293 in seguito ad erogazione di duplice vettore AAV.**

A) Una rappresentazione schematica della coppia di vettori AAV ricombinanti utilizzata in questo studio, e dei processi di ricombinazione, trascrizione, splicing e
20 traduzione producenti la proteina otoferlina di lunghezza intera in cellule co-infettate. I vettori AAV-Otof NT e AAV-Otof CT ricombinanti contengono le parti 5' e 3' del cDNA per otoferlina, rispettivamente. La sequenza a ponte ricombinogena presente nei due vettori ricombinanti è
25 indicata da una sfera grigia. Le barre rosse sotto il

diagramma della proteina indicano i due peptidi utilizzati per produrre gli anticorpi contro le parti N-terminale e C-terminale della otoferlina. Abbreviazioni: ITR, ripetizioni terminali invertite; smCBA, promotore 5 chimerico immediato-precoce di Citomegalovirus/della β -actina di pollo; SA, sito di splicing accettore; SD, sito di splicing donatore; polyA, segnale di poliadenilazione; C2, dominio C2; TM, dominio transmembrana. B) Cellule HEK293 sono state infettate con AAV-Otof NT a sé stante 10 (pannello in alto), AAV-Otof CT a sé stante (pannello centrale), o AAV-Otof NT e AAV-Otof CT insieme (pannello in basso). Esse sono stati colorati per otoferlina (verde) con un anticorpo policlonale diretto contro la parte C-terminale della proteina 48 ore dopo, e i nuclei cellulari 15 sono stati marcati con DAPI (blu). Le sole cellule co-infettate producono otoferlina. Barre della scala: 15 μ m.

La Figura 2 mostra che la terapia genica mediata da duplice AAV in topi Otof -/- P10 ripristina l'espressione di otoferlina e previene la sordità.

20 (a) Pannello a sinistra: Immagine confocale a mosaico delle spire intermedie e apicali della coclea sottoposta a iniezione, immunocolorata per otoferlina su P70 (verde). I nuclei cellulari sono colorati con DAPI (blu). Una gran parte delle IHC, ma nessuna delle cellule capellute esterne 25 (OHC), esprime otoferlina. Le punte di freccia indicano

IHC non trasdotte. Insetto: Ingrandimento maggiore dell'area nel riquadro. Barre della scala: 50 μm e 10 μm (inserto). Pannello a destra: Immagini di IHC co-immunocolorate per otoferlina (verde), proteina ribeye
5 delle sinapsi a nastro (blu), e subunità GluA2 di recettori per il glutammato post-sinaptici (rosso). Le zone sinaptiche attive presentano una distribuzione normale nelle IHC trasdotte esprimenti otoferlina, mentre esse tendono a formare grappoli (punte di freccia) in IHC non
10 trasdotte (indicate da linee tratteggiate). Barra della scala: 5 μm . **(b)** Pannello a sinistra: Quattro settimane dopo l'iniezione di duplice AAV, i topi *Otof* $-/-$ mostravano soglie di ABR in risposta a click o burst tonali a frequenze di 8 kHz, 16 kHz e 32 kHz (punti verdi, $n = 8$)
15 vicine a quelle di topi di tipo selvatico (punti neri, $n = 8$). Al contrario, topi *Otof* $-/-$ riceventi AAV-*Otof* NT (punti arancioni, $n = 3$) o nessuna iniezione (punti blu, $n = 6$) non mostravano onde ABR identificabili sino a livelli di intensità sonora di 86 dB SPL. Pannello a
20 destra: Nei topi *Otof* $-/-$ trattati in P10 (freccia), le soglie uditive per gli stimoli a click erano stabili per almeno sei mesi dopo il recupero, **(c)** pannello a sinistra: Tracce di ABR, registrate tre settimane dopo l'iniezione terapeutica in un topo di tipo selvatico, un topo *Otof* $-/-$
25 $-/-$ (*Otof* $-/-$), e un topo *Otof* $-/-$ soccorso (*Otof* $-/-$

sottoposto a iniezione), che mostrano forme d'onda simili nei topi di tipo selvatico e soccorso. Pannello a destra: grafico a barre che mostra la latenza e l'ampiezza normalizzata dell'onda I di ABR in topi *Otof*^{-/-} soccorsi (grigio, $n = 8$) e topi di tipo selvatico (nero, $n = 5$).

La Figura 3 mostra che la terapia genica mediata da duplice AAV in topi *Otof*^{-/-} in P17 ripristina in maniera duratura l'espressione di otoferlina e l'udito.

(a) Pannello a sinistra: Immagine confocale a mosaico delle spire intermedie e apicali della coclea sottoposta a iniezione, immunocolorata per otoferlina (verde) in P80. I nuclei cellulari sono colorati con DAPI (blu). La maggior parte delle IHC esprime otoferlina, mentre le cellule capellute esterne (OHC) non la esprimono. Le punte di freccia indicano IHC non trasdotte. Insetto: Ingrandimento maggiore dell'area nel riquadro. Barre della scala: 50 μm e 10 μm (insetto). Pannello a destra: Immagini di IHC co-immunocolorate per otoferlina (verde), proteina ribeye delle sinapsi a nastro (blu), e subunità GluA2 di recettori per il glutammato post-sinaptici (rosso). Le zone sinaptiche attive presentano una distribuzione normale nelle IHC trasdotte esprimenti otoferlina, mentre esse tendono a formare grappoli (punte di freccia) in IHC non trasdotte (indicate da linee tratteggiate). Barra della scala: 5 μm . (b) Pannello a sinistra: Soglie ABR di topi

Otof -/- non trattati (blu, $n = 5$), topi *Otof* -/- trattati (verde, $n = 5$), e topi di tipo selvatico (nero, $n = 5$) in risposta a click o stimoli burst tonali a frequenze di 8, 16 e 32 kHz, quattro settimane dopo iniezione intracocleare della coppia di vettori ricombinanti nei topi trattati. Pannello a destra: decorso temporale del recupero dell'udito in topi *Otof* -/- riceventi iniezioni in P17 (freccia). Il risanamento dell'udito a livelli quasi di tipo selvatico è mantenuto per almeno venti settimane post-iniezione. (c) Pannello a sinistra: tracce di ABR, registrate due settimane dopo iniezione terapeutica, in un topo di tipo selvatico (nero), un topo *Otof* -/- (*Otof* -/-) e un topo *Otof* -/- soccorso (*Otof* -/- sottoposto a iniezione), che mostrano forme d'onda simili nei topi di tipo selvatico e soccorso. Pannello a destra: grafico a barre che mostra che la latenza dell'onda I di ABR in topi *Otof* -/- soccorsi ($n = 5$) è simile a quella in topi di tipo selvatico ($n = 5$), mentre la sua ampiezza normalizzata è circa la metà di quella in topi di tipo selvatico.

La Figura 4 mostra che la terapia genica mediata da duplice AAV in topi *Otof* -/- in P30 ripristina l'espressione di otoferlina e l'udito in maniera prolungata.

(a) Pannello a sinistra: Immagine confocale a mosaico delle spire intermedie e apicali della coclea sottoposta a iniezione, immunocolorata per otoferlina in P40 (verde).

I nuclei cellulari sono colorati con DAPI (blu). La maggior parte delle IHC esprime otoferlina, mentre le cellule capellute esterne (OHC) non la esprimono. Le punte di freccia indicano IHC non trasdotte. Insetto: Ingrandimento maggiore dell'area nel riquadro. Barre della scala: 50 μm e 10 μm (insetto). Pannello a destra: Immagini di IHC co-immunocolorate per otoferlina (verde), proteina ribeye delle sinapsi a nastro (blu), e subunità GluA2 di recettori per il glutammato post-sinaptici (rosso). Le zone sinaptiche attive presentano una distribuzione normale nelle IHC trasdotte esprimenti otoferlina, mentre esse tendono a formare grappoli (punte di freccia) in IHC non trasdotte (indicate da linee tratteggiate). Barra della scala: 5 μm . **(b)** Soglie ABR di topi *Otof* $-/-$ non trattati (blu, $n = 3$), topi *Otof* $-/-$ trattati (verde, $n = 3$) e topi di tipo selvatico (nero, $n = 3$) in risposta a click o stimoli burst tonali a frequenze di 8, 16 e 32 kHz, tre settimane (pannello a sinistra), quattordici settimane e venti settimane (pannello a destra) dopo iniezione intracocleare della coppia di vettori ricombinanti nei topi trattati. In questi topi, il risanamento dell'udito a livelli quasi di tipo selvatico è mantenuto per almeno venti settimane post-iniezione. **(c)** Pannello a sinistra: Tracce di ABR, registrate sette settimane dopo l'iniezione terapeutica, in un topo di tipo selvatico (nero), un topo

Otof $-/-$ (*Otof* $-/-$), e un topo *Otof* $-/-$ soccorso (*Otof* $-/-$ sottoposto a iniezione), che mostrano forme d'onda simili nei topi di tipo selvatico e soccorsi. Pannello a destra: grafico a barre che mostra che la latenza dell'onda I di ABR in topi *Otof* $-/-$ soccorsi ($n = 3$) è simile a quella in topi di tipo selvatico ($n = 3$), mentre la sua ampiezza normalizzata è circa la metà di quella in topi di tipo selvatico.

La **Figura 5** mostra che la terapia genica mediata da duplice AAV in topi *Otof*^{ts/ts} ripristina l'espressione normale di otoferlina e l'udito. A) Immagine confocale di IHC (delineate da linee tratteggiate) collocate nella coclea a metà spira provenienti da un topo di tipo selvatico (*Otof*^{+/+}) (pannello a sinistra), un topo *Otof*^{ts/ts} (pannello centrale), e un topo *Otof*^{ts/ts} trattato (pannello a destra), immunocolorate per otoferlina (verde). Sebbene l'otoferlina mostri un'aggregazione anomala a livello di IHC nel topo *Otof* ^{ts/ts} non trattato, la sua espressione nelle IHC dei topi trattati è quasi normale. B) forme d'onda di ABR, registrate quattro settimane dopo l'iniezione terapeutica, in un topo di tipo selvatico (nero), un topo *Otof*^{ts/ts} (blu), e un topo *Otof* ^{ts/ts} soccorso (verde), che mostrano forme d'onda simili nei topi di tipo selvatico e soccorsi, mentre non sono rilevate onde ABR nel mutante non trattato.

Lo schema sulla **Figura 6** descrive la maturazione differenziale del sistema uditivo nell'uomo e nei topi (Shnerson e Willott, J. Comp. Physiol. Psychol. febbraio 1980; 94(1):36-40).

5 La **Figura 7** descrive alcune delle mutazioni del gene DFNB9 che sono state identificate ad oggi. Queste mutazioni sono alla base della forma recessiva della sordità prelinguale DFNB9.

10 La **Figura 8** mostra (A) l'aggregazione proteica e il ripiegamento errato della otoferlina nelle cellule capellute interne di topi *Otof^{ts/ts}* e (B) le risposte del tronco cerebrale a stimoli acustici (ABR) in topi *Otof^{+/ts}* e *Otof^{ts/ts}* (si veda anche la Figura 5).

15 La **Figura 9** descrive l'effetto di un'iniezione unilaterale della coppia di vettori ricombinanti AAV-Otof NT più AAV-Otof CT su topi *Otof^{ts/ts}*. 5 settimane dopo l'iniezione, l'epitelio sensoriale della coclea trattata di tre topi *Otof^{ts/ts}* è stato microdissezionato e immunomarcato per otoferlina. L'espressione di otoferlina
20 nelle IHC della coclea trattata è stata misurata e comparata con la sua espressione in topi non trattati *Otof^{ts/ts}* (si veda anche la Figura 5).

La **Figura 10** descrive la curva di attivazione di tensione di I_{Ca} (A) e le corrispondenti risposte ΔC_m (B) in
25 IHC trattate di tipo selvatico, *Otof^{ts/ts}* e *Otof^{ts/ts}*.

Cambiamenti della capacitanza della membrana cellulare (ΔC_m) sono stati utilizzati per monitorare la fusione di vescicole sinaptiche durante l'esocitosi.

ESEMPI

5 **I. Materiale e metodi**

Animali

Topi knockout per otoferlina (*Otof* -/-) prodotti nel ceppo C57BL/6 (Roux I. *et al.*, *Cell*, 127, 277-289 (2006)) sono stati retroincrociati con topi FVB per più di dieci
10 generazioni per ottenere un background genetico FVB omogeneo, poiché questo background, a differenza del background di C57BL/6, si associa a soglie uditive stabili nei primi dieci mesi di vita (Kommareddi, P., *et al.* *J Assoc Res Otolaryngol* 16, 695-712 (2015)). Vettori di AAV2
15 ricombinanti sono stati erogati ai topi *Otof* -/- in un background genetico FVB. Tutte le procedure e la manipolazione degli animali rispettavano le linee guida dell'*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*, *Institut Pasteur* e del welfare NIH, e i requisiti
20 di protocollo approvati dell'Università della California, San Francisco. Prima della chirurgia, i topi erano anestetizzati mediante iniezione intraperitoneale di una miscela di ketamina cloridrato (Ketaset, 100 mg/kg), xilazina cloridrato (Xyla-ject, 10 mg/kg), e acepromazina
25 (2 mg/kg). La profondità dell'anestesia era controllata

monitorando la risposta tissutale profonda a pizzicotti esercitati sulle dita. Prima della chirurgia e ogni 24 ore dopo l'intervento chirurgico per una settimana, i topi erano sottoposti a iniezione sottocutanea di carprofene (2 mg/kg) per ridurre infiammazione e dolore. Gli animali sono stati monitorati in termini di segni di disagio e anomalo calo ponderale dopo chirurgia.

È stato generato un modello di topo che porta una mutazione termosensibile nel dominio C2F (*Otof^{ts/ts}*) (p.E1804del). I topi *Otof^{ts/ts}* sono profondamente sordi. I risultati mostrati in Figura 8 evidenziano che la distribuzione di otoferlina nelle IHC di questi topi è anomala/fortemente perturbata: la proteina è aggregata e ripiegata in modo errato nelle cellule capellute interne. Inoltre, quando le risposte del tronco cerebrale a stimoli acustici (ABR) sono registrate in topi *Otof^{+/ts}* e *Otof^{ts/ts}* per monitorare la risposta elettrica dei neuroni uditivi primari e i successivi relè neuronali della via uditiva centrale a uno stimolo click, si osserva che, all'età di un mese, si ottiene una forma d'onda caratteristica di ABR per topi *Otof^{+/ts}* alle varie intensità esaminate (40-86 dB), ma nessuna risposta è evocata in topi *Otof^{ts/ts}*, anche a 100 dB.

Costrutti di vettore AAV2 ricombinante e impacchettamento

La sequenza codificante di lunghezza intera del cDNA

di otoferlina murina (isoforma 1 *Otof1*; NM_001100395.1) è stata divisa in un frammento 5' (nucleotidi 1-2.448) e un frammento 3' (nucleotidi 2.449-5.979), e questi frammenti sono stati sintetizzati (Genscript, Piscataway, NJ). Il
5 costruito 5' conteneva la parte 5' del cDNA di *Otof1* (codificante per gli amminoacidi 1-816, che include i domini C2A, C2B e C2C della proteina) e un sito di splicing donatore (SD), e il costruito 3' conteneva la parte 3' del cDNA di *Otof1* (codificante per gli amminoacidi 817-1.992,
10 che include i domini C2D, C2E, C2F e transmembrana della proteina), un sito di splicing accettore (SA). Inoltre, entrambi i costrutti contengono la sequenza a ponte ricombinogenica della fosfatasi alcalina [Lay Y *et al.*, Hum Gene Ther 17, 1036-1042 (2006); Ghosh A. *et al.*, Hum
15 Gene Ther 22, 77-83 (2011); Dyka F.M. *et al.*, Hum Gene Ther Methods 25, 166-177 (2014)]. Siti di riconoscimento per endonucleasi di restrizione *NotI/NheI* e *MfeI/KpnI* sono stati aggiunti a questi costrutti, che sono stati poi inseriti in un plasmide vettore pTR22 AAV, come descritto
20 in precedenza [Lay Y *et al.*, Hum Gene Ther 17, 1036-1042 (2006); Ghosh A. *et al.*, Hum Gene Ther 22, 77-83 (2011); Dyka F.M. *et al.*, Hum Gene Ther Methods 25, 166-177 (2014)], producendo una coppia di vettori ricombinanti a cui è fatto riferimento come ad AAV-Otof NT e AAV-Otof CT.
25 Un vettore ricombinante aggiuntivo contenente il cDNA

della proteina fluorescente verde (GFP) è stato ingegnerizzato perché fungesse da controllo positivo della trasduzione cellulare. I vettori ricombinanti sono stati impacchettati nel capsid quadY-F AAV2 (Petrs-Silva H. et al., Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy 19, 293-301 (2011), e i virus ricombinanti sono stati purificati e titolati dall'Ocular Gene Therapy Core dell'Università della Florida, come descritto in precedenza [Zolotukhin S. et al., Methods 28, 158-167 (2002); Jacobson SG et al., Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 13, 1074-1084 (2006)].

Espressione transgenica in cellule HEK293 trasfettate

Cellule HEK293 sono state fatte crescere in piastre da 6 pozzetti su vetrini coprioggetti rivestiti di polilisina in terreno di Eagle modificato di Dulbecco integrato con amminoacidi non essenziali 1 x e siero bovino fetale 10% (Gibco), e penicillina-streptomina (Pen/Strep, Invitrogen). Il giorno successivo, le cellule sono state infettate come descritto in precedenza (Lopes V.S. et al., Gene Ther 20, 824-833 (2013)). In breve, i vetrini coprioggetti con le cellule a una confluenza del 75% sono stati posti a incubare in 200 µL di terreno privo di siero contenente uno o l'altro o entrambi i virus ricombinanti AAV2-Otof (10.000 particelle contenenti

genoma/cellula per ciascun vettore) a 37 °C con CO₂ 5%. Due ore dopo, è stato aggiunto 1 mL di terreno completo. Il giorno successivo, il terreno è stato cambiato, e le cellule sono state poste a incubare per altre 48 ore. Le

5 cellule sono state fissate con paraformaldeide 4% in tampone fosfato salino (PBS) 0,1 M, pH 7,4, a 4 °C per due ore, sciacquate tre volte con PBS, e poste a incubare con Triton X-100 0,25% e siero di capra normale 5% in PBS a temperatura ambiente per un'ora. Le cellule sono state poi

10 poste a incubare con anticorpi policlonali di coniglio precedentemente caratterizzati, 14cc e C19, diretti contro la parte N-terminale (amminoacidi 196-211) e la parte C-terminale (amminoacidi 1.848-1.978) di otoferlina, rispettivamente (Roux I. *et al.*, Cell, 127, 277-289 (2006)

15 (diluizione 1:200) a 4 °C per tutta la notte. I campioni sono stati sciacquati due volte con PBS, e posti a incubare con anticorpo secondario di capra anti-IgG di coniglio coniugato con Cy3 (Life Technologies, diluizione 1:2.000) in PBS a temperatura ambiente per due ore. I campioni sono

20 stati poi sciacquati due volte in PBS, colorati con 4',6-diammidino-2-fenilindolo (DAPI) per visualizzare i nuclei cellulari, montati su un vetrino con una goccia di terreno Fluorsave (Biochem Laboratories, Francia), e osservati con un microscopio a immunofluorescenza confocale Olympus.

25 ***Erogazione di vettore alla coclea***

Il virus è stato erogato alla coclea sinistra come descritto in precedenza (Akil O. *et al.*, Neuron 75, 283-293 (2012)). Topi *Otof*^{-/-} anestetizzati erano sottoposti a un'iniezione della coppia di vettori AAV2-*Otof* attraverso la membrana finestra rotonda all'interno della scala timpanica della coclea in P10, P17, o P30. L'approccio all'orecchio avveniva tramite un'incisione dorsale (Duan M *et al.*, Gene Ther 11 Suppl 1, S51-56 (2004)). Un piccolo foro era realizzato nella bulla con un ago da 18G, ed allargato con pinze. La membrana finestra rotonda era delicatamente perforata con una pipetta di vetro capillare di borosilicato, che è stata poi rimossa. Quando l'efflusso di perilinfa si arrestava, un volume fisso (2 µL) contenente la coppia di vettori AAV2-*Otof* NT (6,3 × 10¹² vg/mL) e AAV2-*Otof* CT (4,5 × 10¹² vg/mL) è stato iniettato nella scala timpanica con una micropipetta di vetro fine (diametro esterno della punta di 10 µm) per un tempo di un minuto. La pipetta era estratta, e la nicchia era rapidamente sigillata con fascia e tessuto adiposo. La ferita è stata suturata in strati con una sutura cromatica assorbibile 6-0 (Ethicon).

Esami uditivi

L'esame dell'udito è stato condotto in topi *Otof*^{+/+}, topi *Otof*^{-/-}, e topi *Otof*^{-/-}-soccorsi, anestetizzati, in punti temporali differenti, in una camera a prova di suono,

come descritto in precedenza (Akil O. et al., Neuron 75, 283-293 (2012)). I topi sono stati anestetizzati con un'iniezione intraperitoneale di una miscela di ketamina cloridrato (Ketaset, 100 mg/mL) e xilazina cloridrato (Xyla-ject, 10 mg/mL), con successive iniezioni di un quinto della dose iniziale, se necessario. La temperatura corporea è stata mantenuta con un tampone riscaldante e monitorata con una sonda rettale durante tutta la registrazione. Risposte del tronco cerebrale a stimoli acustici (ABR) sono state registrate con il sistema TDT BioSig III (Tucker Davis Technologies) e tre elettrodi ad ago subdermici collocati sul cuoio capelluto del topo: uno in corrispondenza del vertice, uno al di sotto della pinna dell'orecchio sinistro (elettrodo di riferimento), e uno al di sotto dell'orecchio controlaterale (elettrodo di messa a terra). Gli stimoli sonori erano click (durata 5 ms, 31 Hz) e pip tonali a 8, 16 e 32 kHz (durata 10 ms, modellazione coseno al quadrato, 21 Hz). Essi erano erogati in condizioni di campo libero, con registrazione di risposta monoauricolare dall'orecchio sinistro (l'orecchio destro era bloccato durante la registrazione). Per ciascuno stimolo sonoro, l'attività elettroencefalografica (EEG) è stata registrata per 20 ms a una frequenza di campionamento di 25 kHz, con filtro (0,3 - 3 kHz). Forme d'onda EEG per 512 stimoli e 1.000 stimoli sono state

calcolate in media per click e burst tonali, rispettivamente. L'intensità di stimolo sonoro era ridotta a intervalli di livello di pressione sonora (SPL) di 5 dB a scendere a partire dalla massima intensità esaminata (86
5 dB SPL). La soglia uditiva è stata definita come il livello di stimolo più basso a cui i picchi ABR per le onde I-V erano chiaramente e ripetutamente presenti all'ispezione visiva. Queste valutazioni di soglia erano confermate dall'analisi offline delle forme d'onda memorizzate. La
10 latenza dell'onda I di ABR è stata misurata come l'intervallo di tempo fra lo stimolo click e l'ampiezza di picco dell'onda I. Inoltre, i valori delle ampiezze di picco dell'onda I sulle tracce di ABR sono stati normalizzati contro il valore medio in topi di tipo
15 selvatico di controllo (assunto come 100%) per una comparazione fra topi *Otof* -/- soccorsi e topi di tipo selvatico.

Conte di cellule capellute interne e di sinapsi a nastro

La coclea dei topi è stata perfusa con paraformaldeide
20 4% in PBS 0,1 M (pH 7,4) e posta a incubare nello stesso fissativo a 4 °C per due ore. Le coclee sono state sciacquate tre volte con PBS, e decalcificate mediante incubazione con acido etilendiammina tetraacetico (EDTA)
5% in PBS 0,1 M a 4 °C per tutta la notte. L'epitelio
25 sensoriale cocleare (organo di Corti) è stato

microdissezionato in una preparazione di superficie, posto
in preincubazione in Triton X-100 0,25% e siero di capra
normale 5% in PBS (tampone bloccante) a temperatura
ambiente per un'ora, e posto a incubare con l'anticorpo
5 primario a 4 °C per tutta la notte. Sono stati utilizzati
i seguenti anticorpi: anti-parte C-terminale di otoferlina
di coniglio (C19, diluizione 1:250) 1, anti-CtBP2/ribeye
di topo (IgG1), anti-subunità A2 del recettore per il
glutammato di topo (IgG2a) (Millipore, diluizione 1:200),
10 e anti-GFP di coniglio (Invitrogen, A11122; diluizione
1:250). I campioni sono stati sciacquati tre volte in PBS,
e posti a incubare con l'anticorpo secondario appropriato:
anti-IgG1 di topo coniugato con Alexa Fluor 488, anti-
IgG2a di topo coniugato con Alexa Fluor 568 (Life
15 Technologies, diluizione 1:1.000), o anti-IgG di coniglio
coniugato con Atto Fluor 647 (Sigma, diluizione 1:200). I
campioni sono stati lavati tre volte in PBS, e montati su
un vetrino in una goccia di Fluorsave, con DAPI per
colorare i nuclei cellulari. Le pile z confocali in
20 fluorescenza dell'organo di Corti sono state ottenute con
un microscopio confocale LSM 700 (Zeiss, Oberkochen,
Germania) dotato di un obiettivo ad alta risoluzione
(apertura numerica di 1,4, obiettivo immersione in olio 60
×). Le immagini sono state acquisite in file raster 512 ×
25 512 o 1.024 × 1.024 (dimensione pixel = 0,036 µm in x e y)

con passi z di 0,2 μm . Cellule capellute interne (IHC) produttori otoferrina e nastri sinaptici sono stati contati mediante il rendering 3D di pile z di immagini confocali sino a 20. Per calcolare la proporzione di IHC esprimenti il transgene di otoferrina, abbiamo diviso il numero totale di IHC produttori otoferrina per il numero totale di IHC identificate dai loro nuclei cellulari colorati con DAPI (un minimo di 150 analizzati consecutivamente).

10 **Reazione a catena della polimerasi con trascrizione inversa (RT-PCR)**

L'mRNA totale è stato estratto (Trizol, Invitrogen) dalla coclea sinistra di sei topi *Otof* +/+ e sei topi *Otof* -/- soccorsi in P10. La trascrizione inversa (RT) è stata condotta con primer oligodT e superscript II RNase H⁻ (Invitrogen) a 42 °C per 50 minuti. Due microlitri del prodotto di reazione RT sono stati utilizzati per la reazione a catena della polimerasi (PCR; *Taq* DNA polimerasi, Invitrogen) consistente in 35 cicli (94 °C per 30 s, 60 °C per 45 s, 72 °C per 60 s) con estensione finale a 72 °C per 10 minuti. La coppia di primer di PCR (primer diretto TGTCTCAGAGCTCCGAGGCA (SEQ ID NO:14) e primer inverso ATCGTGGAGGAGGAACTGGGCA (SEQ ID NO:15) è stata progettata per amplificare un frammento intermedio di 2.676 bp (nucleotidi da 27 a 2.702) del cDNA di otoferrina

(numero di accesso GenBank NM_001100395.1) che abbraccia la giunzione fra gli inserti AAV-Otof NT e AAV-Otof CT. I prodotti di PCR sono stati purificati mediante elettroforesi su un gel di agarosio al 2% contenente 0,5
5 mg/mL di bromuro di etidio (kit di estrazione di gel Qiaquick, QIAGEN), sequenziati (Elim Biopharmaceuticals), e controllati in termini di identità di sequenza rispetto alla sequenza di cDNA di otoferlina.

Analisi statistiche

10 I dati sono espressi come media \pm deviazione standard (SD). Tutte le analisi statistiche sono state condotte con il test U di Mann-Whitney non parametrico. La significatività statistica è indicata nelle Figure come segue: n.s., non significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$;
15 ***, $p < 0,001$.

II. Risultati

Un vettore a base AAV2 è stato ingegnerizzato perché esprimesse il gene della proteina fluorescente verde (GFP) sotto il controllo di un promotore chimerico CMV- β -actina
20 di pollo. Questa cassetta di espressione è stata impacchettata nel capsido quadY-F AAV2 in cui quattro residui di tirosina di superficie (Y) del capsido di AAV2 erano sostituiti da residui di fenilalanina (F), il che si dimostrava in grado di incrementare l'efficienza di
25 trasferimento genico nella retina (Petrus-Silva H. *et al.*,

Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy 19(2):293-301 (2011)). Il virus ricombinante era iniettato attraverso la membrana finestra rotonda all'interno della coclea sinistra di cinque topi di tipo selvatico in P2. L'immunocolorazione con GFP dell'epitelio sensoriale tre settimane dopo l'iniezione rivelava la trasduzione di vari tipi di cellule, ivi incluse IHC. La velocità di trasduzione per IHC era $78 \pm 6\%$ (media \pm SD), dimostrando l'idoneità di questo sierotipo di AAV nell'erogare geni terapeutici a queste cellule (non mostrato). La sequenza codificante del cDNA di otoferlina murina è stata spezzata in un frammento 5' (Otof NT, nucleotidi 1-2.448) e in un frammento 3' (Otof CT, nucleotidi 2.449-5.979), ciascuno dei quali era inserito in un vettore AAV portante una sequenza a ponte ricombinogenica (Ghosh A. *et al.*, Hum Gene Ther 22(1):77-83 (2011); Dyka FM *et al.*, Hum Gene Ther Methods 25(2):166-177 (2014)). Il vettore ricombinante AAV-Otof NT porta la parte 5' del cDNA seguita da un sito di splicing donatore, e il vettore ricombinante AAV-Otof CT porta un sito di splicing accettore seguito dalla parte 3' del cDNA (si vedano i Metodi e la Figura 1). Ciascuno di questi vettori ricombinanti è stato impacchettato nel capsido quadY-F AAV2. Cellule HEK293 sono state infettate con AAV-Otof NT, AAV-Otof CT, o entrambi i virus ricombinanti, e

immunocolorate per otoferlina 48 ore più tardi. Sono stati
utilizzati due anticorpi differenti, diretti contro la
parte C-terminale o la parte N-terminale della proteina
(Roux I, *et al.*, Cell 127:277-289 (2006)), e sono stati
5 ottenuti risultati identici. L'otoferlina è stata rilevata
nelle sole cellule infettate simultaneamente con entrambi
i virus, indicando così che i due vettori erano in grado
di ricombinarsi e generare concatameri attraverso le loro
ripetizioni terminali invertite, con splicing corretto del
10 trascritto risultante a produrre la proteina (Figura 1).

Una singola iniezione unilaterale della coppia di
vettori ricombinanti AAV-Otof NT più AAV-Otof CT è stata
somministrata a topi *Otof* $-/-$ attraverso la membrana
finestra rotonda all'interno della coclea sinistra, prima
15 (in P10) o dopo l'instaurarsi dell'udito. Le iniezioni
dopo l'instaurarsi dell'udito sono state effettuate in uno
dei due punti temporali differenti, P17 e P30, poiché la
maturazione delle sinapsi a nastro delle IHC è ancora in
corso in P17 (Kros CJ *et al.*, Nature 394(6690):281-284
20 (1998); Wong AB *et al.*, EMBO J 33(3):247-264 (2014)),
mentre la coclea è matura in P30 (Song L. *et al.*, J Acoust
Soc Am 119(4):2242-2257 (2006)). Otto settimane dopo
l'iniezione della coppia di vettori ricombinanti in P10,
l'epitelio sensoriale delle coclee trattate di tre topi
25 *Otof* $-/-$ è stato microdissezionato e immunomarcato per

otoferlina (con un anticorpo diretto contro la parte C-terminale della proteina) per stimare la velocità di trasduzione delle IHC. La proteina è stata rilevata in più del 60% delle IHC ($64 \pm 6\%$, media \pm SD, $n = 3$ coclee), ma
5 non in altri tipi di cellule (Figura 2a, pannello a sinistra). Questo risultato fornisce prova che un grande cDNA può essere efficacemente ricostituito in cellule sensoriali cocleari su erogazione locale di una coppia di vettori AAV ricombinanti *in vivo*, con produzione
10 prolungata, diffusa della proteina da parte di una grande proporzione delle cellule. L'accuratezza del processo di splicing pre-mRNA in cellule trasdotte è stata verificata mediante RT-PCR ed è stata realizzata un'analisi di sequenza di un grande frammento del trascritto di
15 otoferlina che abbracciava la giunzione fra i cDNA di Otof NT e Otof CT (non mostrato).

Registrazioni di risposta del tronco cerebrale a stimoli acustici (ABR) nei topi quattro settimane dopo l'iniezione in P10 dimostravano un risanamento sostanziale
20 delle soglie uditive in risposta a stimoli click e burst tonali (8, 16 e 32 kHz) in tutti i topi trattati ($n = 8$), ma nessun risanamento nei topi *Otof* $-/-$ riceventi AAV-Otof NT o AAV-Otof CT a sé stanti ($n = 3$ ciascuno), o in assenza di iniezione ($n = 6$) (Figure 2b, 2c). Le soglie di ABR per
25 stimoli sia click sia burst tonali nei topi trattati erano

simili a quelle di topi di tipo selvatico di controllo ($n = 8$; test U di Mann-Whitney, $p > 0,15$ per tutte le comparazioni). L'efficacia a lungo termine di una terapia genica è stata valutata conducendo registrazioni ABR in risposta a click in svariati punti temporali post-iniezione da 1 a 30 settimane. Dalla quarta settimana in avanti, le soglie di ABR dei topi trattati non differivano significativamente da quelle di topi di tipo selvatico (test U di Mann-Whitney, $p > 0,05$ per comparazioni in tutti gli stadi) (Figura 2b). Tuttavia, le ampiezze dell'onda I di ABR, che riflette le risposte elettriche di neuroni uditivi primari allo stimolo sonoro, erano $39 \pm 7\%$ (media \pm SD) del valore medio per topi di tipo selvatico (test U di Mann-Whitney, $p = 0,002$), mentre le latenze dell'onda I ($1,15 \pm 0,09$ ms) erano simili a quelle in topi di tipo selvatico ($1,27 \pm 0,05$ ms; test U di Mann-Whitney, $p = 0,06$) (Figura 2c).

Trenta settimane dopo l'iniezione, sei degli otto topi riceventi iniezioni in P10 presentavano ancora soglie uditive entro 10 dB da quelle di topi di tipo selvatico. La terapia genica prima dell'instaurarsi dell'udito previene pertanto la sordità in topi *Otof* $-/-$. Gli inventori hanno in precedenza mostrato che circa la metà dei nastri delle IHC degenera in topi *Otof* $-/-$ (Roux I, et al., Cell 127:277-289 (2006)). Il numero di nastri

presinaptici (insieme a recettori per il glutammato postsinaptici) è stato analizzato nelle IHC trasdotte e nelle IHC non trasdotte di coclee *Otof* *-/-* trattate otto settimane dopo l'iniezione in P10, mediante immunofluorescenza e imaging in microscopia confocale 3D (Figura 2a, pannello a destra). Il numero di nastri per IHC in cellule trasdotte ($12,5 \pm 1,8$, media \pm SD, $n = 48$ cellule da 3 topi) era quasi due volte superiore che in cellule non trasdotte ($6,9 \pm 1,3$, $n = 48$ cellule da 3 topi; test U di Mann-Whitney, $p < 10^{-4}$), ma rimaneva inferiore che in IHC di tipo selvatico ($16 \pm 1,3$, $n = 48$ cellule da 3 topi; test U di Mann-Whitney, $p < 10^{-4}$), potenzialmente rendendo conto del recupero incompleto dell'ampiezza dell'onda I su registrazioni ABR.

Dopo l'iniezione della coppia di vettori ricombinanti all'interno della coclea di topi *Otof* *-/-* in P17 o P30, l'otoferlina era rilevata nelle IHC in tutta la coclea trattata, ma non in IHC della coclea controlaterale (non mostrato). Le velocità di trasduzione di IHC erano simili nei due gruppi di topi ($82 \pm 9\%$ e $85 \pm 7\%$, per $n = 5$ e $n = 3$ coclee trattate in P17 e P30, rispettivamente), e superiori a quelle in topi sottoposti a iniezioni in P10 (test U di Mann-Whitney, $p < 0,05$ per entrambe le comparazioni) (Figure 3a e 4a). Le registrazioni ABR quattro settimane dopo l'iniezione mostravano recupero

dell'udito in tutti i topi sottoposti a iniezioni in P17
($n = 5$), con soglie di ABR in risposta a click o a stimoli
burst tonali notevolmente simili a quelli in topi di tipo
selvatico ($n = 5$; test U di Mann-Whitney, $p > 0,2$ per tutte
5 le comparazioni). Le soglie uditive in risposta a click
rimanevano immutate per 20 settimane dopo l'iniezione,
dimostrando un risanamento prolungato dell'udito in questi
topi a dispetto di una ampiezza media dell'onda I di ABR
di circa la metà rispetto a quella in topi di tipo
10 selvatico ($47 \pm 10\%$) (Figure 3b, c).

Analogamente, topi *Otof* $-/-$ ricevuti iniezioni in
P30 mostravano un recupero simile dell'udito già tre
settimane dopo l'iniezione, con soglie di ABR in risposta
a click o a stimoli burst tonali persistenti al livello
15 del tipo selvatico per 20 settimane post-iniezione ($n = 3$,
test U di Mann-Whitney, $p > 0,5$ per comparazioni in tutti
gli stadi), a dispetto di una ampiezza media dell'onda I
di ABR di circa la metà ($55 \pm 10\%$) rispetto a quella in
topi di tipo selvatico (Fig. 4b, c). Il numero di nastri
20 presinaptici (insieme ai recettori per il glutammato
postsinaptici) è stato analizzato nelle IHC trasdotte e
nelle IHC non trasdotte delle coclee *Otof* $-/-$ trattate in
P17 e in P30, mediante immunofluorescenza e imaging in
microscopia confocale 3D (Figure 3a e 4a). Il numero di
25 nastri per IHC in cellule trasdotte ($10,0 \pm 1,3$, media \pm

SD, $n = 48$ cellule da 3 topi trattati in P17 e analizzati in P80, e $8,9 \pm 2,3$, $n = 48$ cellule da 3 topi trattati in P30 e analizzati in P40) era superiore che in cellule non trasdotte provenienti dalle medesime coclee ($6,2 \pm 1,3$, $n = 48$ cellule, e $5,8 \pm 0,7$, $n = 48$ cellule, rispettivamente; test U di Mann-Whitney, $p < 10^{-4}$ per entrambe le comparazioni), ma era inferiore che in IHC di topi di tipo selvatico di 10 settimane di età ($16 \pm 1,3$, $n = 48$ cellule da 3 topi; test U di Mann-Whitney, $p < 10^{-4}$ per entrambe le comparazioni). Poiché il numero di nastri per IHC era già marcatamente ridotto in topi *Otof* $-/-$ non trattati, analizzati in P15 ($8,2 \pm 1,0$, $n = 48$ cellule da 3 topi), e rimaneva inaspettatamente stabile nelle IHC non trasdotte di topi trattati in stadi successivi (si vedano sopra i valori per P40, P70, e P80), si può dedurre che la terapia genica nelle IHC di topi *Otof* $-/-$ incrementava il numero di nastri promuovendone la produzione piuttosto che prevenirne la degenerazione.

Utilizzando la terapia genica a duplice AAV sopra descritta, somministrata in P30 negli animali, è stato altresì possibile ripristinare sia la distribuzione normale di otoferlina sia la funzione uditiva a soglie di ABR quasi normali in un modello di topo portante una mutazione termosensibile umana nel suo gene DFNB9 (topi *Otof*^{ts/ts}, Figura 5).

Più precisamente, è stato mostrato che la terapia genica virale duplice sovrascrive gli aggregati di otoferlina per via della mutazione termosensibile umana in detto modello di topo di DFNB9 (Figura 9). In questo
5 esperimento, una singola iniezione unilaterale della coppia di vettori ricombinanti AAV-Otof NT più AAV-Otof CT è stata somministrata a topi *Otof^{ts/ts}* attraverso la membrana finestra rotonda all'interno della coclea sinistra, dopo l'instaurarsi dell'udito sono stati
10 eseguiti in P30. 5 settimane dopo l'iniezione, l'epitelio sensoriale della coclea trattata di tre topi *Otof^{ts/ts}* è stato microdissezionato e immunomarcato per otoferlina (si veda la Figura 9). L'espressione di otoferlina nella IHC (linee tratteggiate) della coclea trattata si è rivelata
15 quasi normale, quando comparata con gli aggregati di otoferlina nella coclea non trattata del topo *Otof^{ts/ts}* (frecce).

È stato infine trovato che detta terapia genica virale duplice ripristina le correnti di calcio e l'esocitosi
20 della IHC in questo modello animale, come mostrato in Figura 10.

RIVENDICAZIONI

1. Sistema vettore comprendente almeno due
particelle di AAV, ciascuna delle quali comprendendo un
25 polinucleotide comprendente una sequenza codificante

parziale che codifica per i) la parte N-terminale del polipeptide otoferlina o di un suo frammento funzionale, per una, e ii) la parte C-terminale del polipeptide otoferlina o di un suo frammento funzionale, per l'altra,
5 detto sistema vettore consentendo l'espressione del polipeptide otoferlina di lunghezza intera, o di un suo frammento funzionale, in cellule capellute interne, per uso nel trattare pazienti affetti da sordità DFNB9 o nel prevenire la sordità DFNB9 in pazienti aventi mutazioni
10 DFNB9, in cui detti pazienti sono soggetti umani aventi un sistema uditivo sviluppato e maturo.

2. Sistema vettore per uso secondo la rivendicazione 1, in cui detto polipeptide otoferlina presenta la sequenza SEQ ID NO:1.

15 3. Sistema vettore per uso secondo la rivendicazione 1, in cui detto polipeptide otoferlina presenta la sequenza SEQ ID NO:5.

4. Sistema vettore per uso secondo qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, in cui detti pazienti umani sono
20 neonati, infanti, bambini, adolescenti o adulti.

5. Sistema vettore per uso secondo qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, comprendente almeno due particelle di AAV, ciascuna di dette particelle di AAV comprendendo:

a) per una, un primo polinucleotide comprendente una
25 ripetizione terminale invertita a livello di ciascuna

estremità di detto polinucleotide, e, fra le dette
ripetizioni terminali invertite, da 5' a 3': un promotore
adatto seguito da una sequenza codificante parziale che
contiene la parte N-terminale del gene *otoferlina*, e un
5 sito di splicing donatore, e

b) per l'altra, un secondo polinucleotide
comprendente una ripetizione terminale invertita a livello
di ciascuna estremità di detto polinucleotide, e, fra le
dette ripetizioni terminali invertite, da 5' a 3': un sito
10 di splicing accettore, una sequenza codificante parziale
che contiene la parte C-terminale del gene *otoferlina*,
opzionalmente seguita da una sequenza di poliadenilazione,

in cui i detti polinucleotidi primo e secondo
contengono altresì una sequenza ricombinogenica che si
15 localizza dopo il sito di splicing donatore in detto primo
polinucleotide e prima del sito di splicing accettore in
detto secondo polinucleotide, e

in cui le sequenze codificanti nei polinucleotidi
primo e secondo, quando combinate, codificano per la
20 lunghezza intera del polipeptide *otoferlina*, o per un suo
frammento funzionale.

6. Sistema vettore per uso secondo la
rivendicazione 5, in cui detto gene *otoferlina* presenta la
sequenza SEQ ID NO:2 o la sequenza SEQ ID NO:22.

25 7. Sistema vettore per uso secondo la

rivendicazione 5, in cui detta parte N-terminale del gene *otoferlina* è di SEQ ID NO:3 e detta parte C-terminale del gene *otoferlina* è di SEQ ID NO:23 o di SEQ ID NO:4.

8. Sistema vettore per uso secondo qualsiasi delle
5 rivendicazioni 1-7, in cui dette particelle di AAV sono del sierotipo AAV2.

9. Sistema vettore per uso secondo qualsiasi delle
rivendicazioni 1-8, comprendente particelle di AAV2 in cui
il capsido è stato modificato sostituendo i residui
10 amminoacidici di tirosina con residui amminoacidici di fenilalanina.

10. Sistema vettore per uso secondo qualsiasi delle
rivendicazioni 1-9, in cui in detti pazienti umani è stata
posta diagnosi di sordità DFNB9 dopo acquisizione del
15 linguaggio.

11. Sistema vettore per uso secondo qualsiasi delle
rivendicazioni 1-10, in cui detti pazienti sono
adolescenti o soggetti umani adulti affetti da sordità
DFNB9 indotta da mutazioni termosensibili, preferibilmente
20 scelte fra: P.Q994VfsX6, P.I515T, p.G541S, PR1607W,
p.E1804del.

12. Composizione farmaceutica comprendente almeno
due particelle di AAV, ciascuna delle quali comprendendo
un polinucleotide comprendente una sequenza codificante
25 parziale che codifica per i) la parte N-terminale del

polipeptide otoferlina o di un suo frammento funzionale,
per una, e ii) la parte C-terminale del polipeptide
otoferlina o di un suo frammento funzionale, per l'altra,
nonché un veicolo farmaceuticamente accettabile, per uso
5 nel trattare pazienti affetti da sordità DFNB9 o nel
prevenire sordità DFNB9 in pazienti aventi mutazioni
DFNB9, in cui detti pazienti sono soggetti umani aventi un
sistema uditivo sviluppato e maturo, quali neonati,
infanti, bambini, adolescenti o adulti.

10 13. Composizione farmaceutica per uso secondo la
rivendicazione 12, in cui detta parte N-terminale del gene
dell'otoferlina è di SEQ ID NO:3 e detta parte C-terminale
del gene dell'otoferlina è di SEQ ID NO:4 o di SEQ ID
NO:23.

15 14. Composizione farmaceutica per uso secondo la
rivendicazione 12 o 13, in cui dette particelle di AAV
sono del sierotipo AAV2, preferibilmente in cui il capsido
è stato modificato sostituendo i residui amminoacidici di
tirosina con residui amminoacidici di fenilalanina.

20 15. Composizione farmaceutica per uso secondo la
rivendicazione 12, 13 o 14, in cui detti pazienti sono
adolescenti o soggetti umani adulti affetti da sordità
DFNB9 indotta da mutazioni termosensibili, preferibilmente
scelte fra: P.Q994VfsX6, P.I515T, p.G541S, PR1607W,
25 p.E1804del.

p.i. 1) INSTITUT PASTEUR

2) CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)

3) INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE
MEDICALE (INSERM)

5 Si dichiara che la traduzione è perfettamente conforme al
testo originale del brevetto concesso dall'Ufficio del
Brevetto Europeo.

Ravenna, 19 ottobre 2023

Il Mandatario,

10



Ing. Davide Roncuzzi

USBM-CPI-027 BM

LEGENDA DELLE TAVOLE DEI DISEGNI

Figure 1-10	
Figure	Figura
Figura 1A	
5' cDNA-otof	5' cDNA-otof
3' cDNA-erlin	3' cDNA-erlina
Coinfection	Co-infezione
DNA sequence alignment	Allineamento di sequenze di DNA
Recombination	Ricombinazione
Transcription	Trascrizione
Splicing	Splicing
otoferlin mRNA	mRNA di otoferlina
Translation	Traduzione
Figura 1B	
AAV-Otof NT	AAV-Otof NT
AAV-Otof CT	AAV-Otof CT
Figura 2a	
Otof ^{-/-} mice injected on P10	Topi Otof ^{-/-} sottoposti a iniezione in P10
Otoferlin	Otoferlina

Ribeye	Ribeye
Merge	Confluenza
Figura 2a cont.	
continued	continua
Otof ^{-/-} mice injected on P10	Topi Otof ^{-/-} sottoposti a iniezione in P10
Otoferlin	Otoferlina
Ribeye	Ribeye
Figura 2b	
continued	continua
ABR threshold	Soglia ABR
Click	Click
Click ABR threshold	Soglia ABR per click
weeks post-injection	settimane post-iniezione
Otof NT	Otof NT
Otof NT + CT	Otof NT + CT
wild-type	tipo selvatico
Figura 2c	
continued	continua
Click intensity level	Livello intensità dei click
Wild-type	Tipo selvatico

Otof ^{-/-} injected	Otof ^{-/-} sottoposti a iniezione
ABR wave I latency	Latenza dell'onda I di ABR
n.s.	n.s.
normalized ABR wave I amplitude (0/4)	Ampiezza dell'onda I di ABR normalizzata (0/4)
Figura 3a	
Otof ^{-/-} mice injected on P17	Topi Otof ^{-/-} sottoposti a iniezione in P17
Otoferlin	Otoferlina
Ribeye	Ribeye
Merge	Confluenza
Figura 3b	
continued	continua
ABR threshold	Soglia ABR
Click	Click
Click ABR threshold	Soglia ABR per click
weeks post-injection	settimane post-iniezione
Otof ^{-/-} injected	Otof ^{-/-} sottoposti a iniezione
wild-type	tipo selvatico

Figura 3c	
continued	continua
Click intensity level	Livello intensità dei click
Wild-type	Tipo selvatico
Otof ^{-/-} injected	Otof ^{-/-} sottoposti a iniezione
ABR wave I latency	Latenza dell'onda I di ABR
n.s.	n.s.
normalized ABR wave I amplitude (0/4)	Ampiezza dell'onda I di ABR normalizzata (0/4)
Figura 4a	
Otof ^{-/-} mice injected on P30	Topi Otof ^{-/-} sottoposti a iniezione in P30
Otoferlin	Otoferlina
Ribeye	Ribeye
Merge	Confluenza
Figura 4b	
continued	continua
ABR threshold	Soglia ABR
Click	Click
14 weeks	14 settimane

20 weeks	20 settimane
wild-type	tipo selvatico
Figura 4c	
continued	continua
Click intensity level	Livello intensità dei click
Wild-type	Tipo selvatico
Otof ^{-/-} injected	Otof ^{-/-} sottoposti a iniezione
ABR wave I latency	Latenza dell'onda I di ABR
normalized ABR wave I amplitude (0/4)	Ampiezza dell'onda I di ABR normalizzata (0/4)
Figura 5A	
Otof ^{-/-} injected	Otof ^{-/-} sottoposti a iniezione
Figura 5B	
Click intensity level	Livello intensità dei click
Figura 6	
Hearing	Udito

Cochlear maturation ends	La maturazione cocleare giunge al termine
CNS maturation ends	La maturazione del SNC giunge al termine
Birth	Nascita
* days	* giorni
2 months	2 mesi
4.5 months in utero	4,5 mesi di vita uterina
gene therapy	terapia genica
6 years	6 anni
Figura 8B	
Click intensity level	Livello intensità dei click
Figura 9	
Otof ^{-/-} treated	Otof ^{-/-} trattati
Figura 10A	
Otof ^{TS/TS} AAV Rescue	In soccorso di Otof ^{TS/TS} tramite AAV
Membrane Potential	Potenziale di membrana
Figura 10B	
Continued	Continua



Exocytosis	Esocitosi
Otof ^{TS/TS} AAV Rescue	In soccorso di Otof ^{TS/TS} tramite AAV
Time of stimulation	Tempo di stimolazione

Figure 1

A

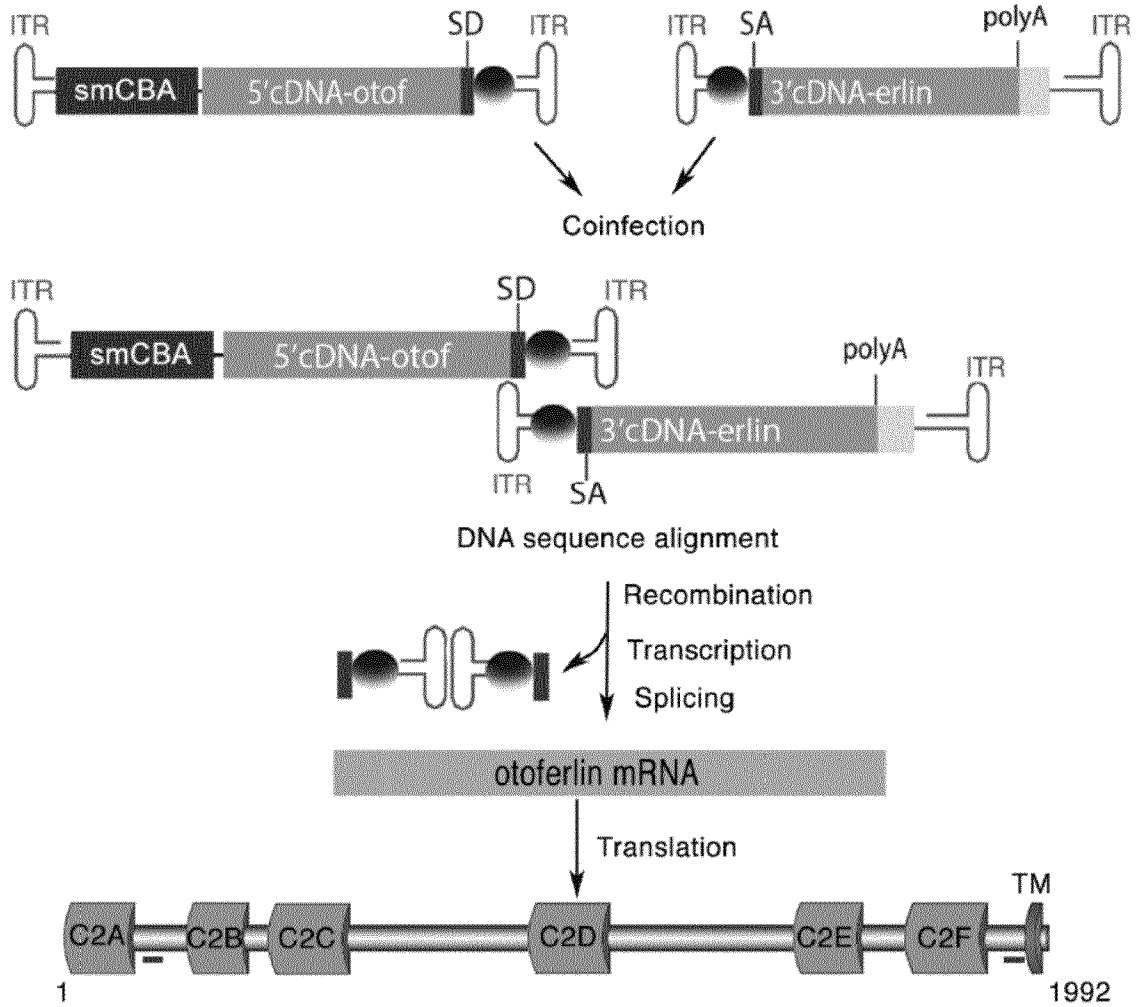


Figure 1 (continued)

B

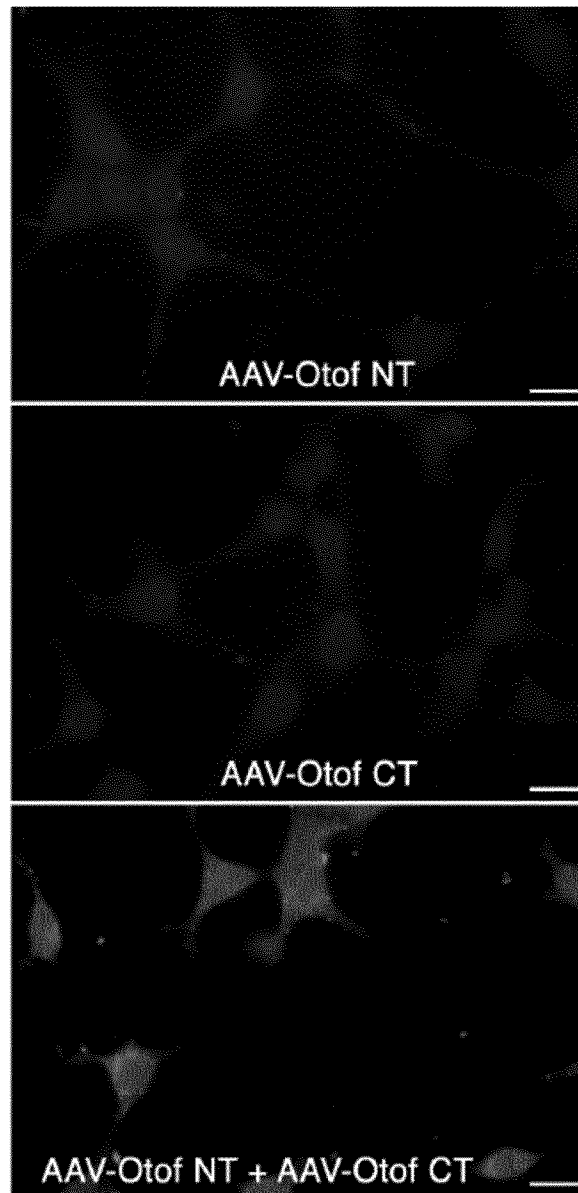


Figure 2

a
Otof^{-/-} mice injected on P10

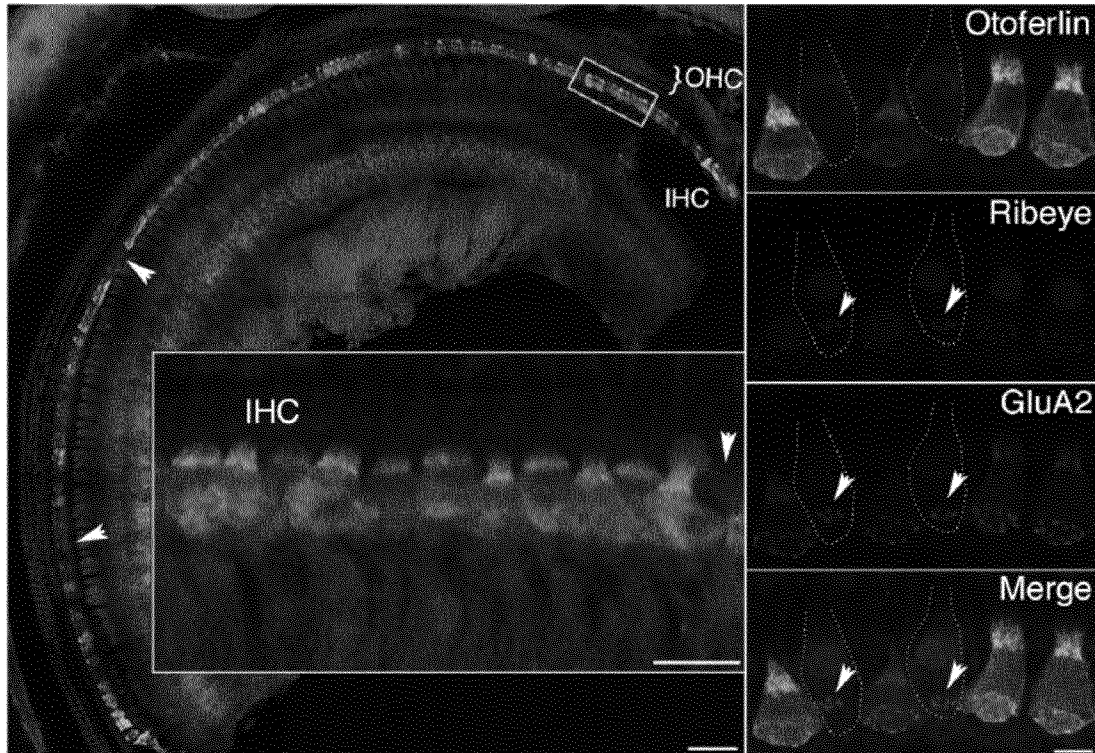


Figure 2 (continued)

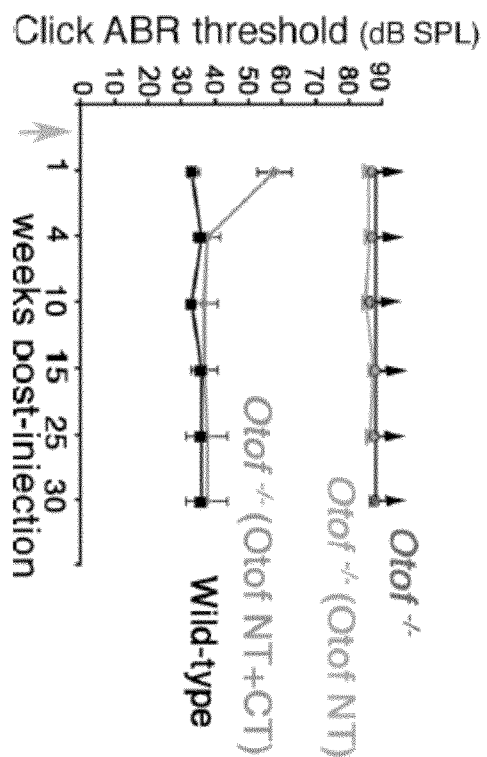
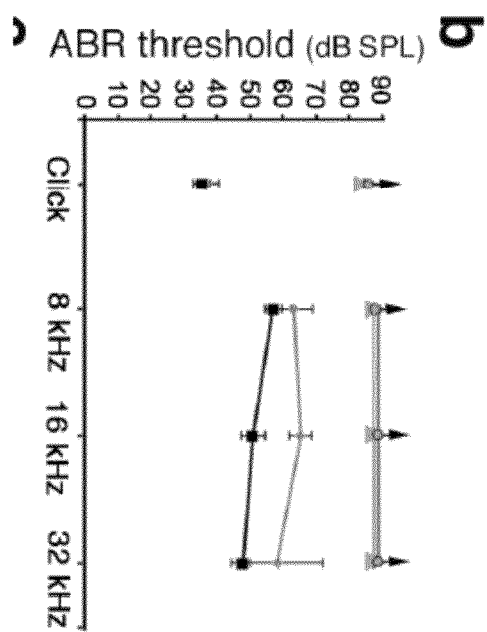
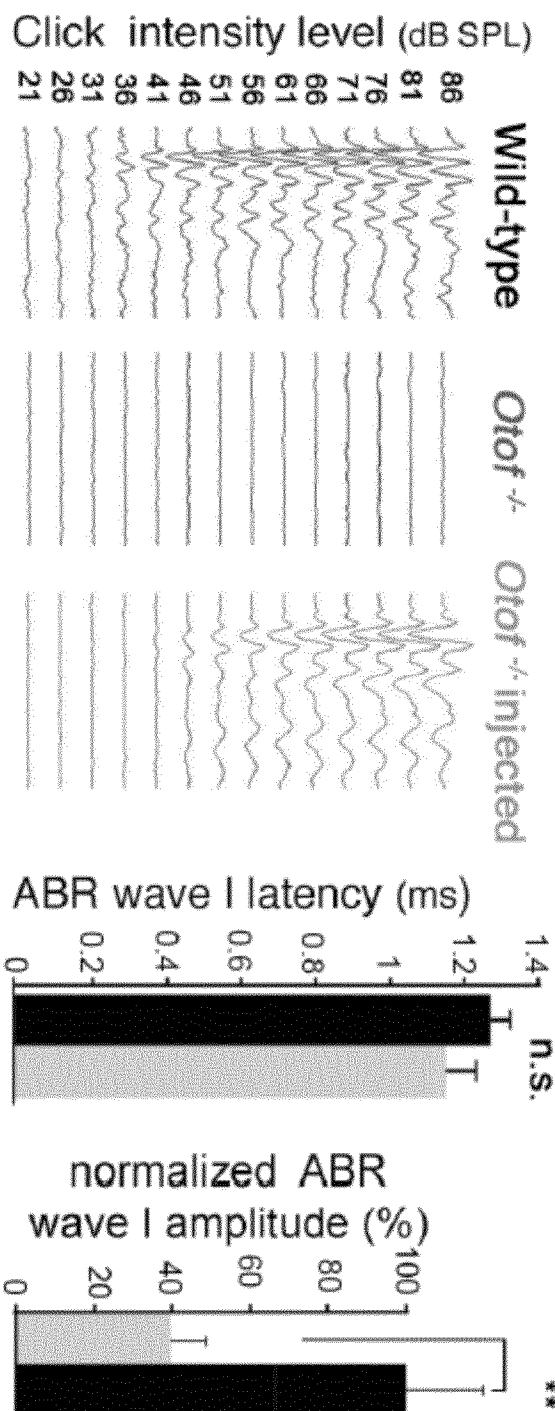


Figure 2 (continued)



C

Figure 3

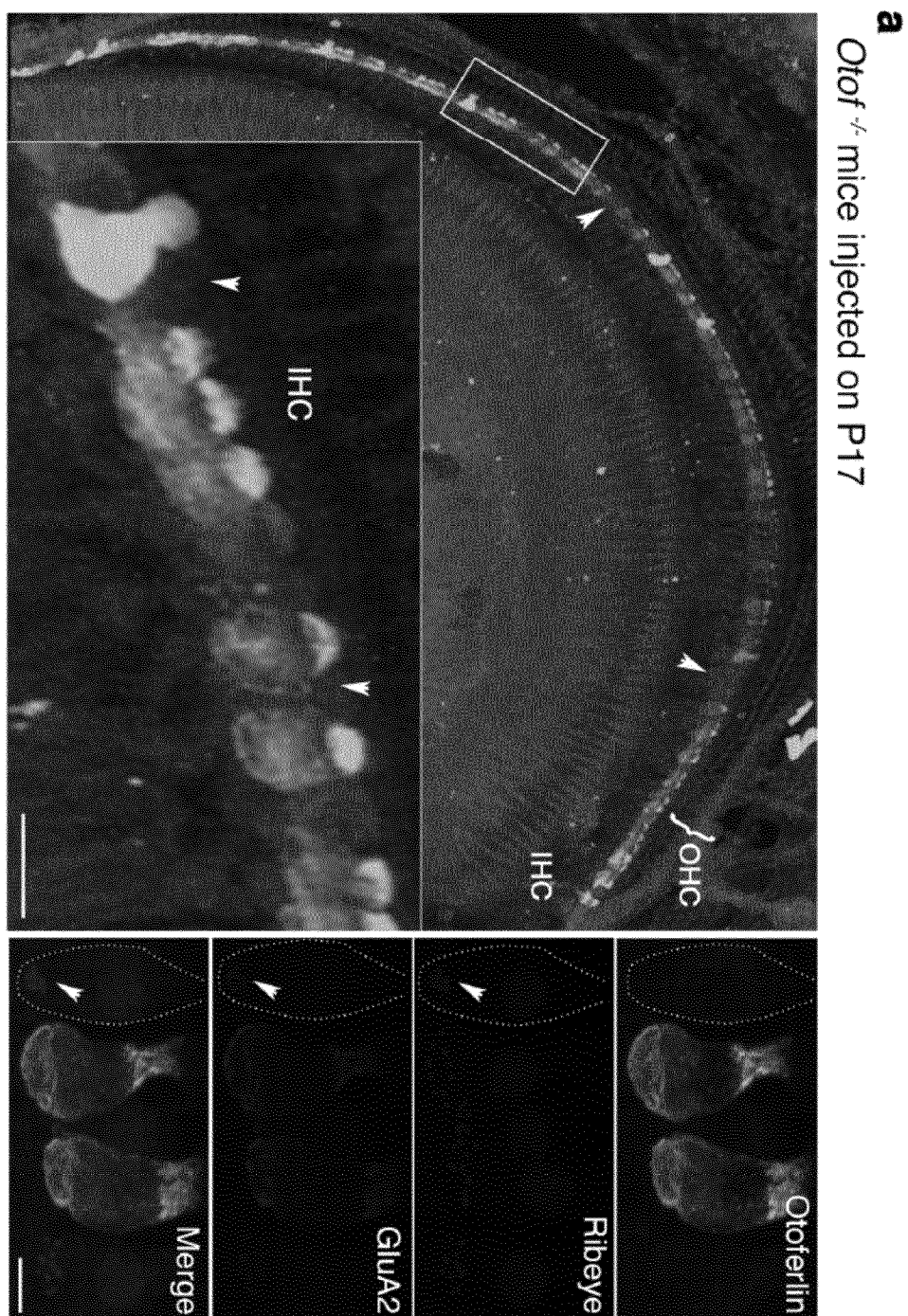


Figure 3 (continued)

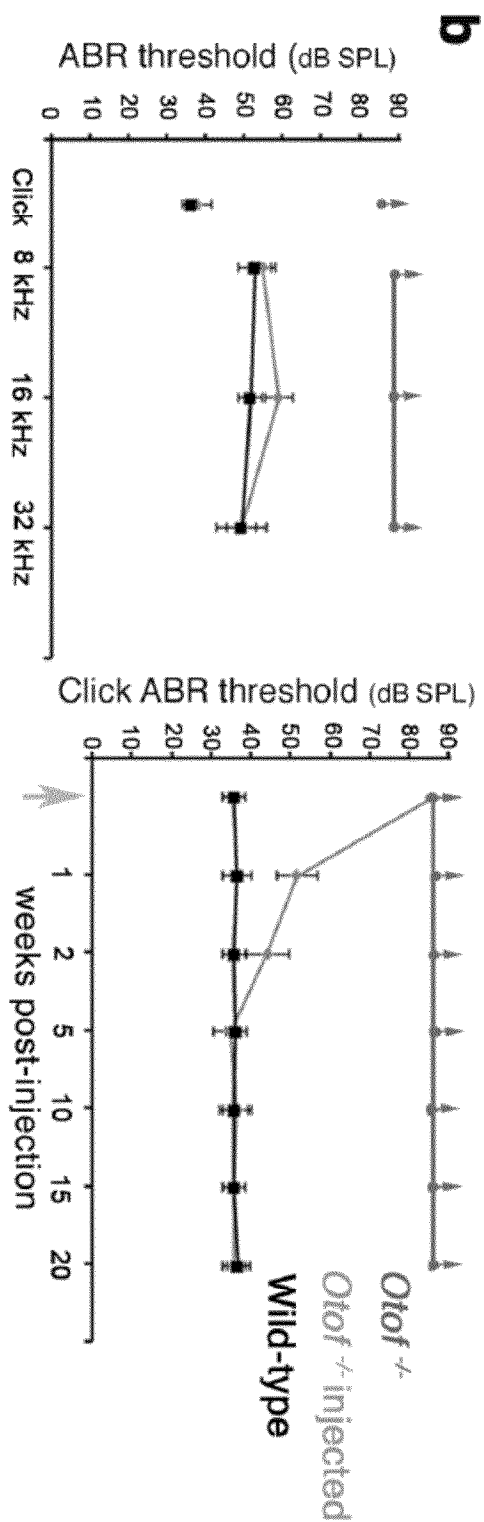


Figure 3 (continued)

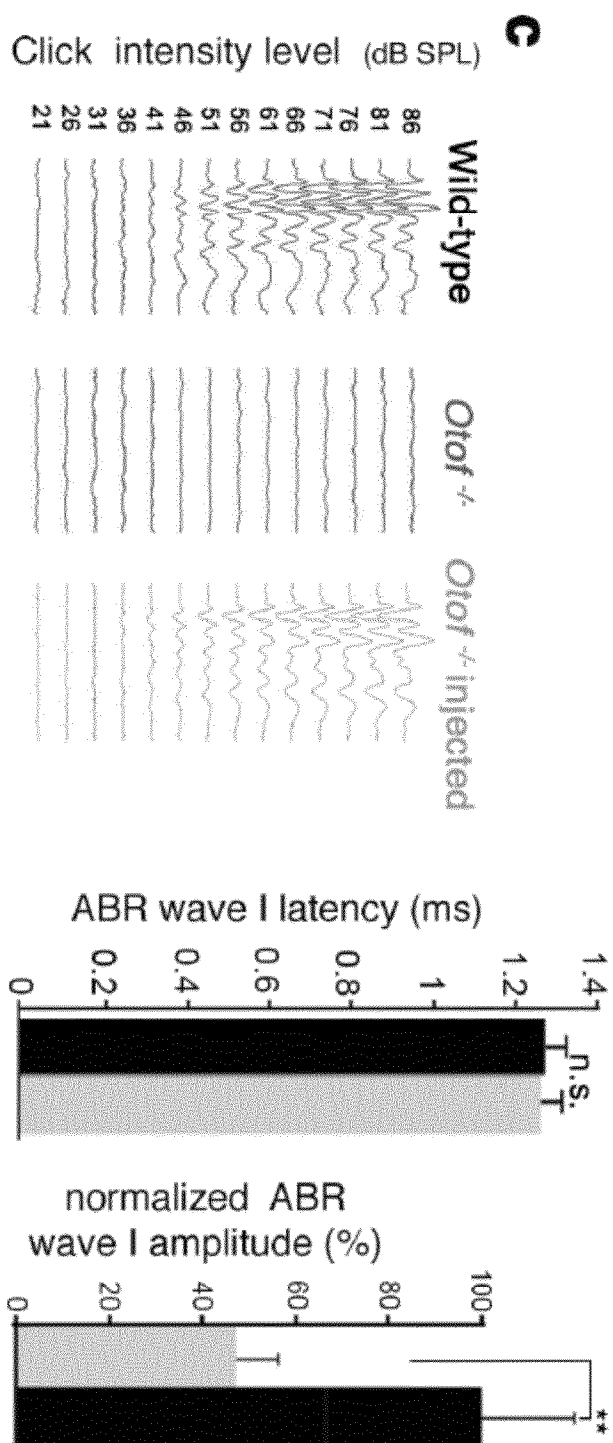


Figure 4

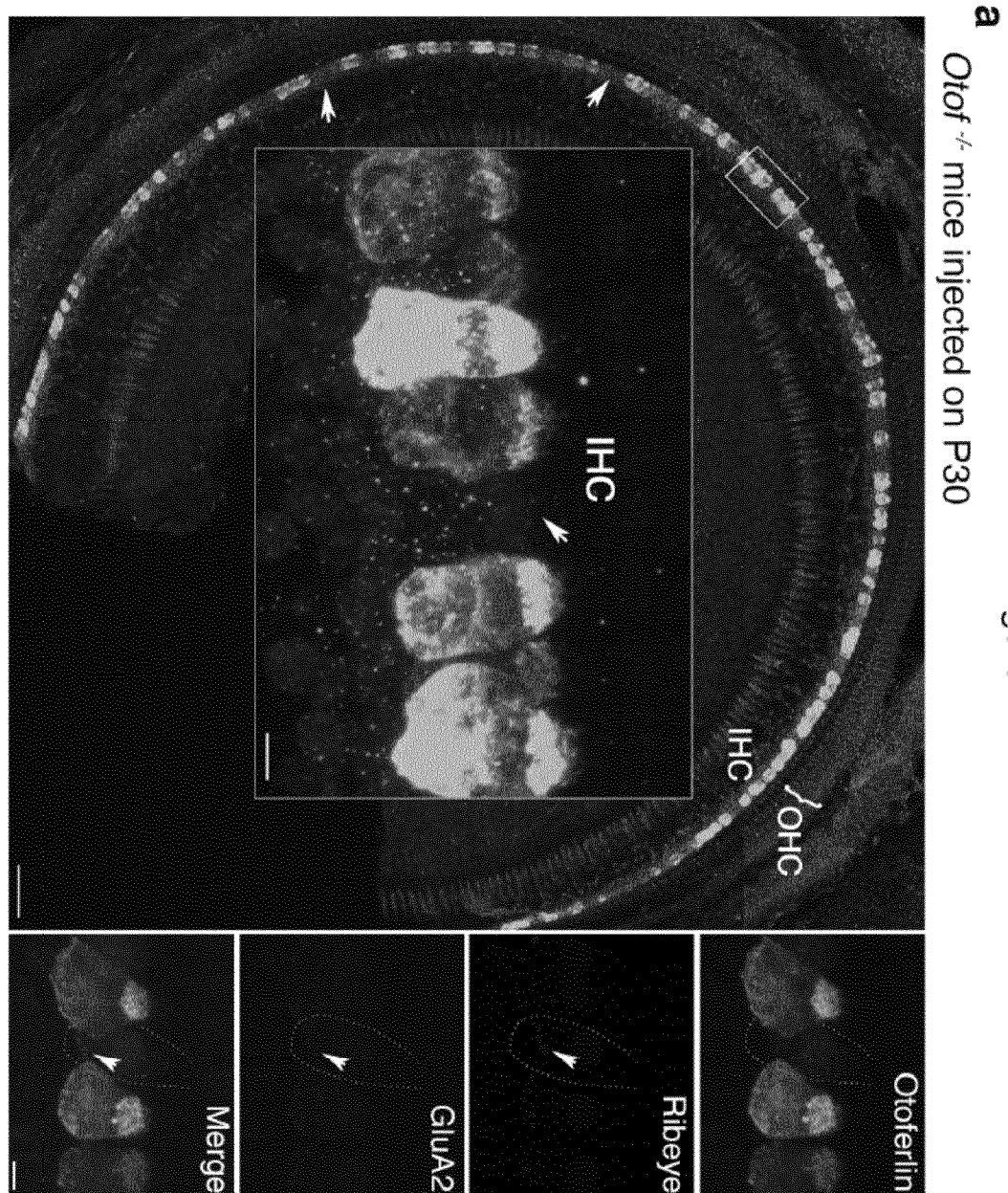


Figure 4 (continued)

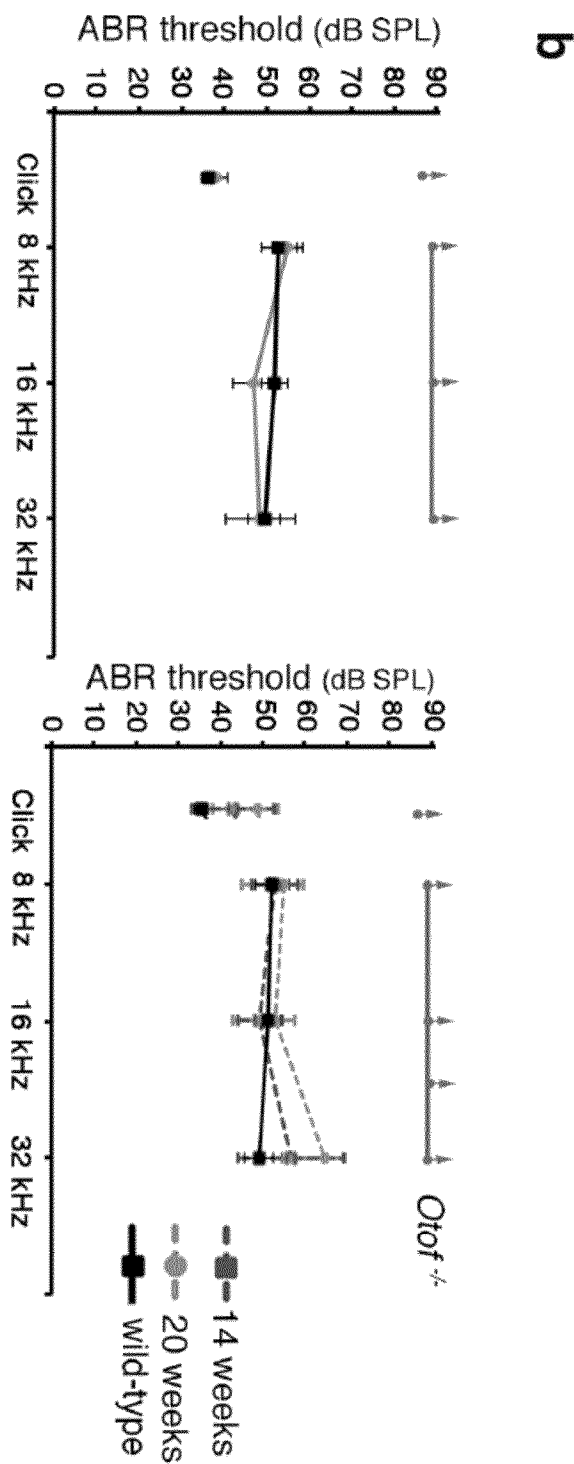


Figure 4 (continued)

C

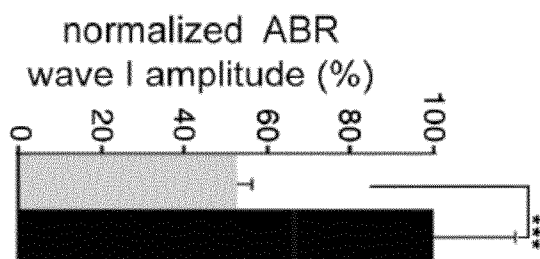
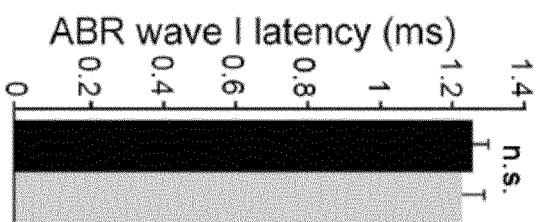
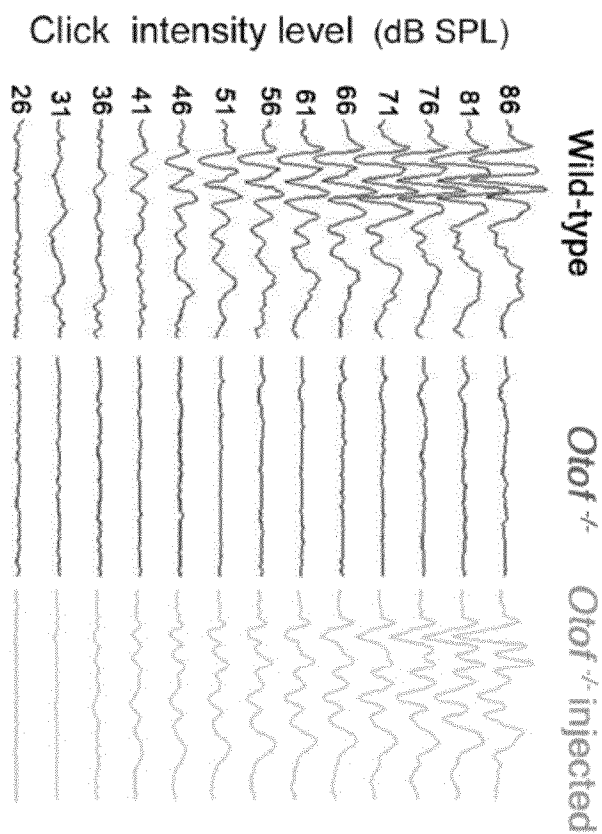


Figure 5

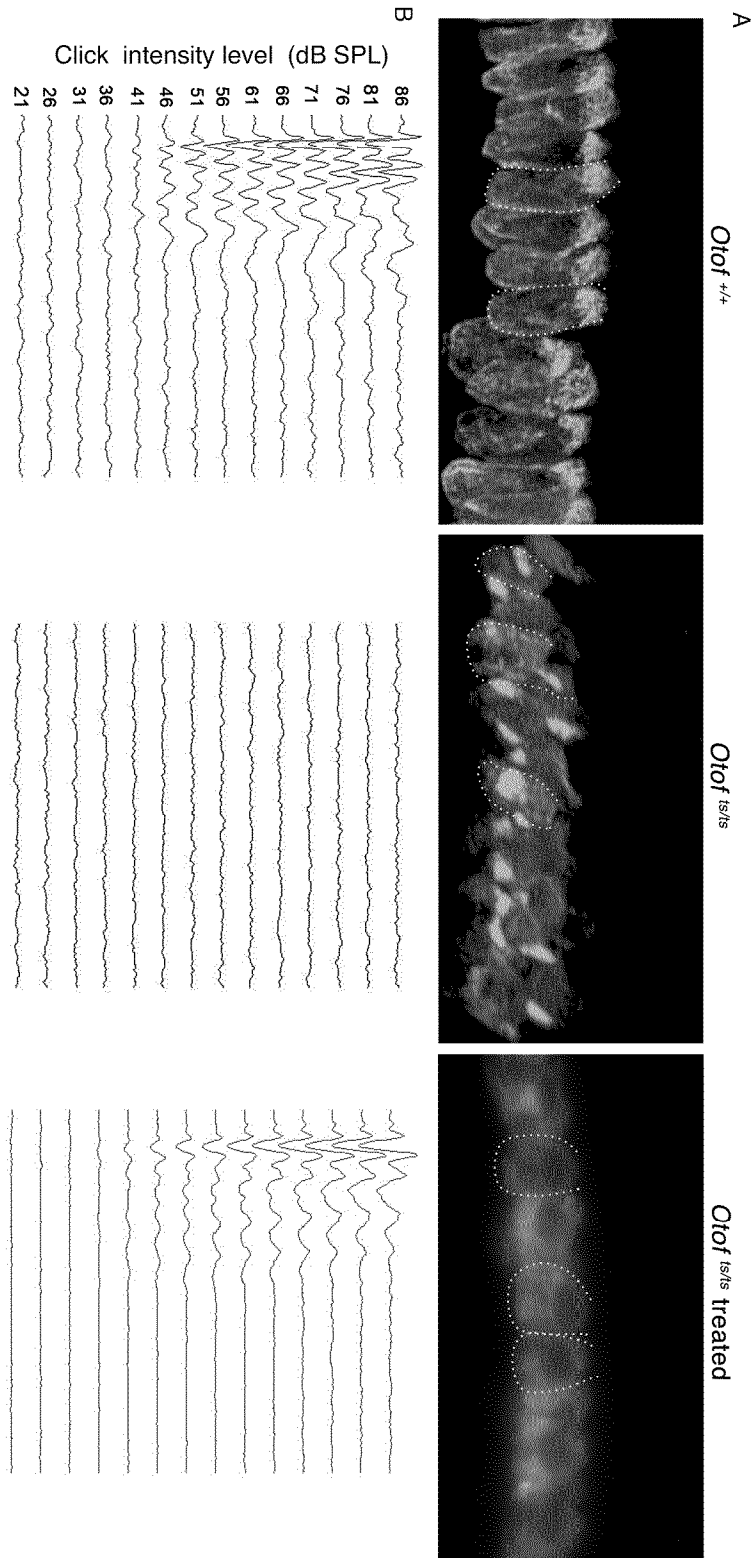


Figure 6

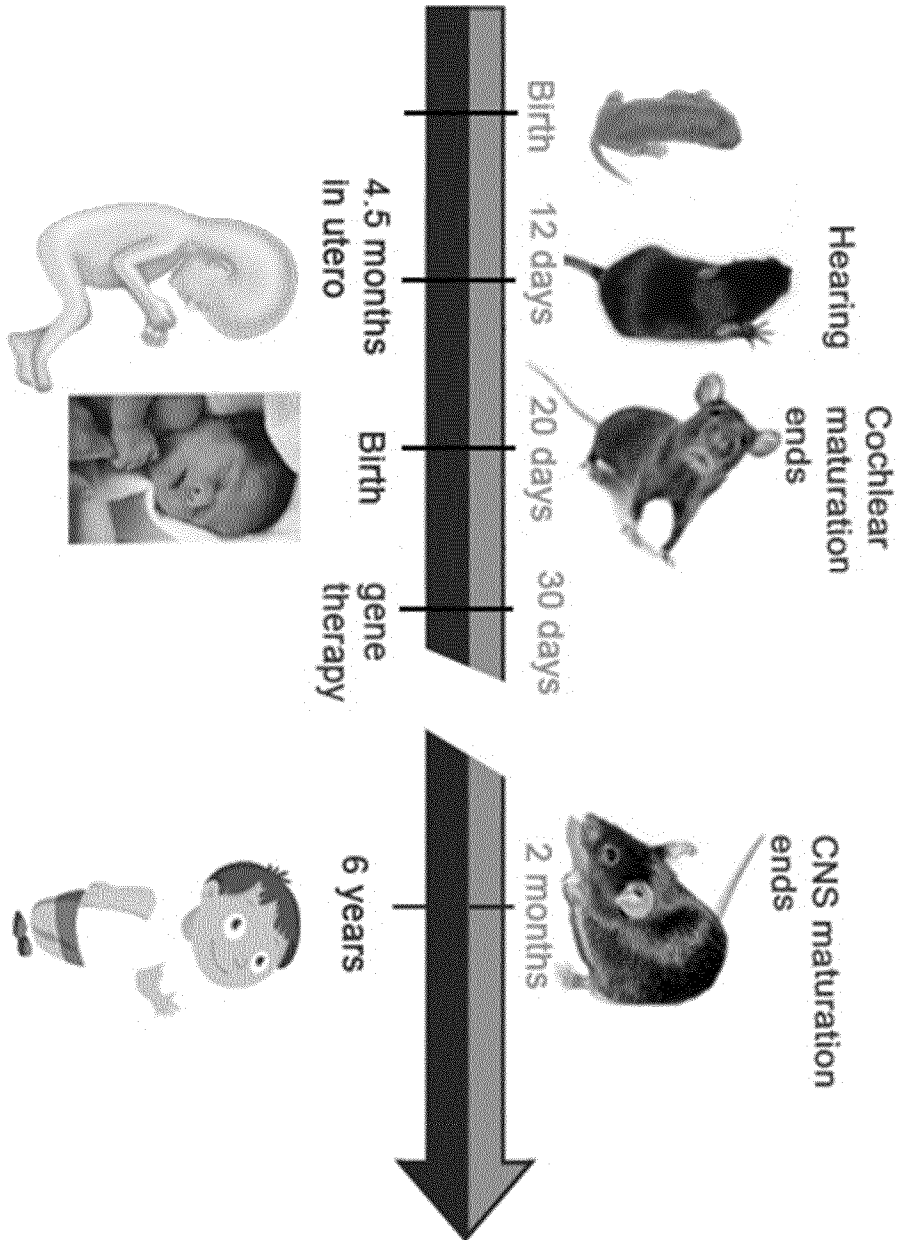


Figure 7

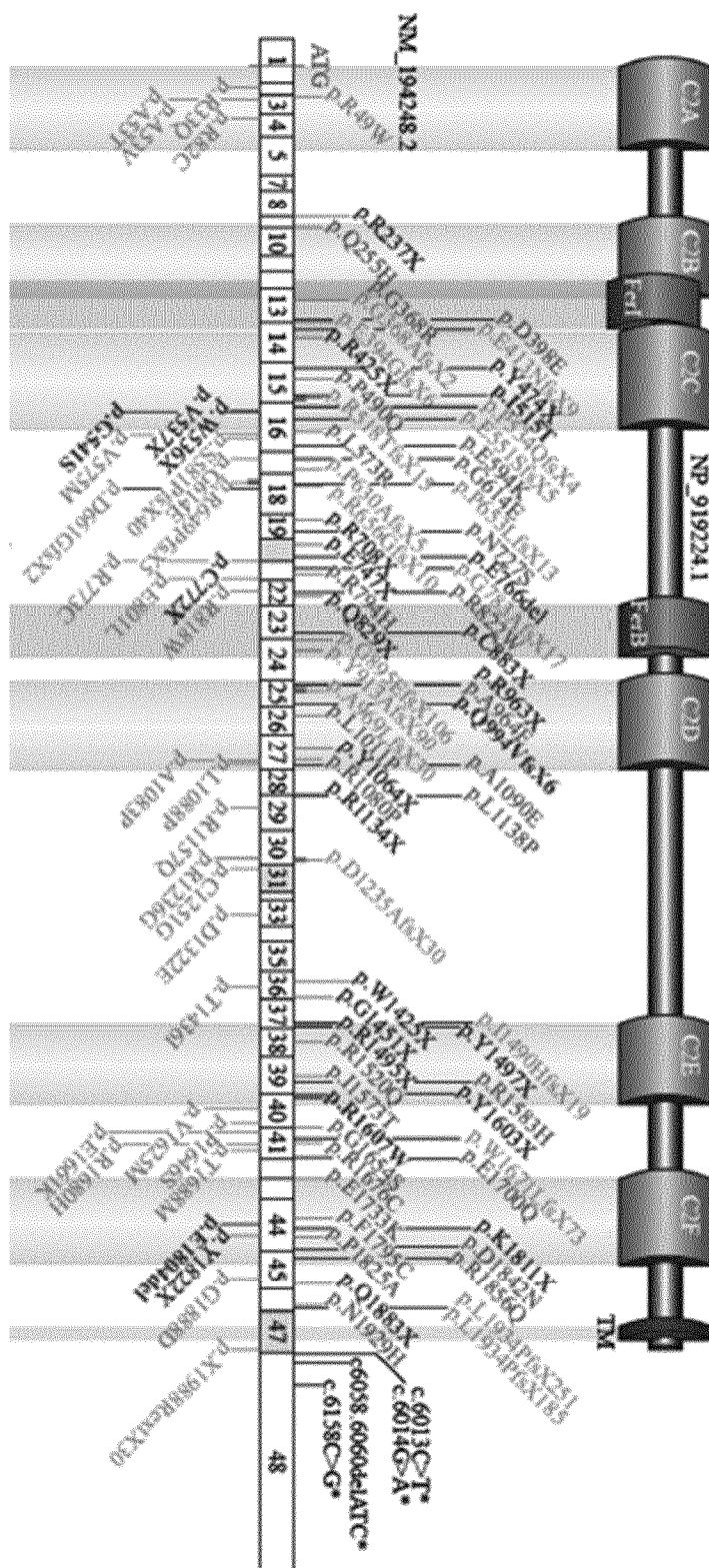


Figure 8

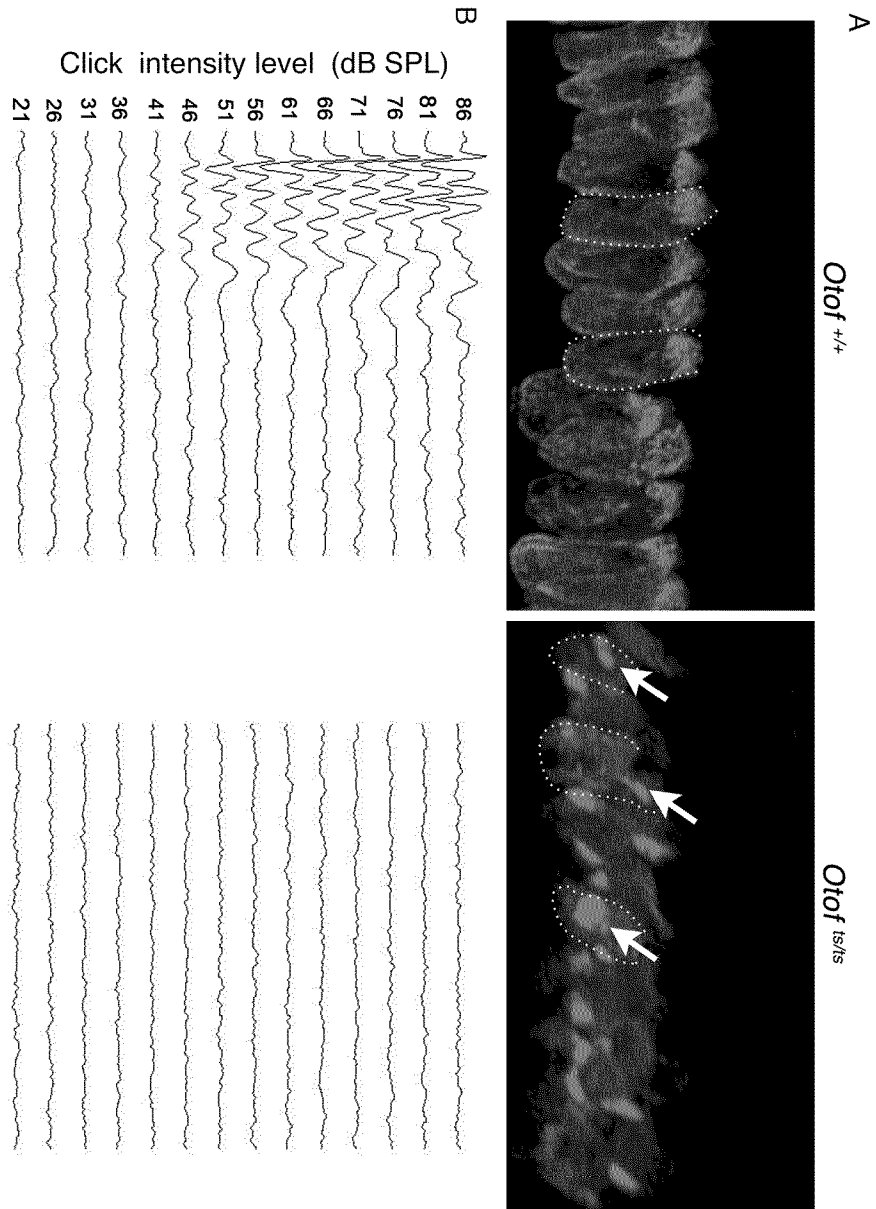


Figure 9



Figure 10

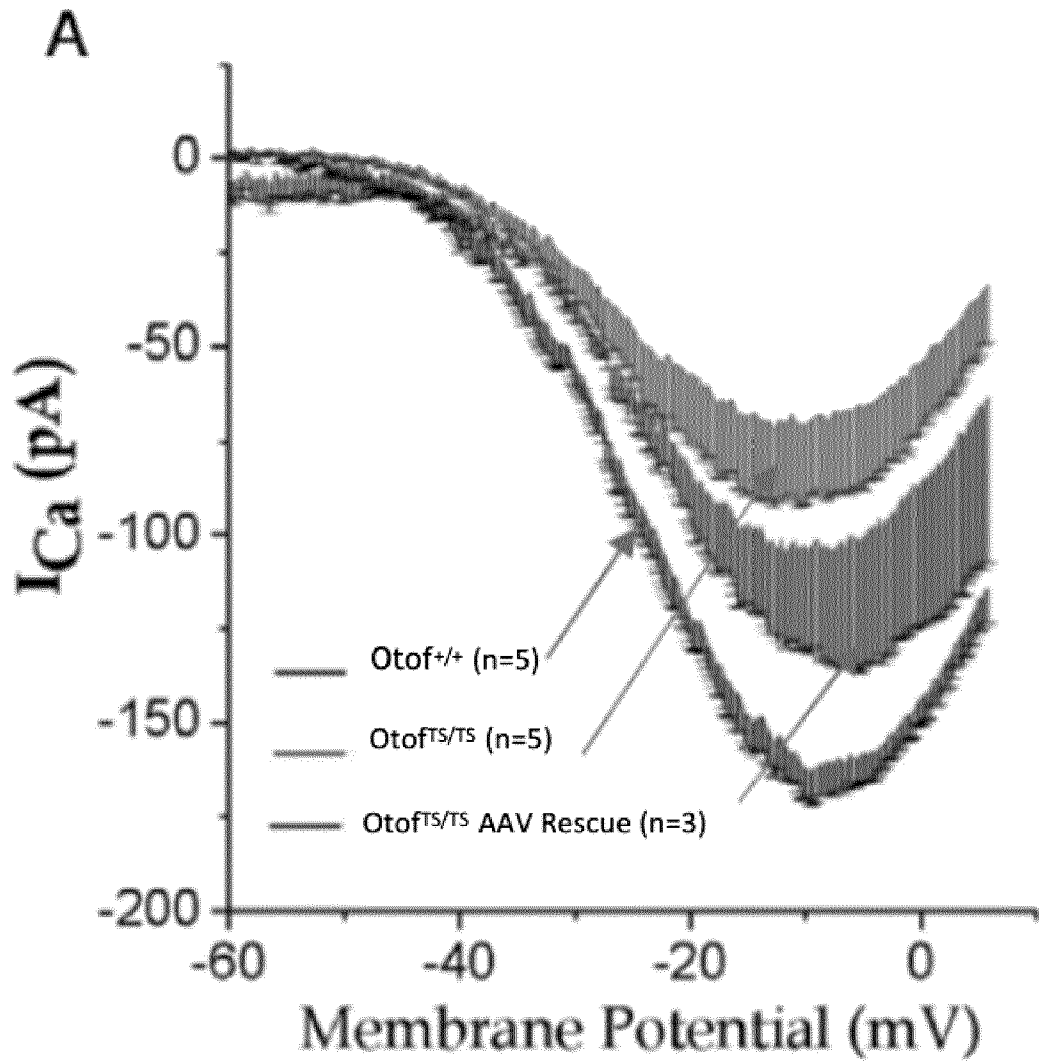


Figure 10 (Continued)

