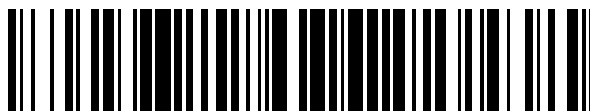


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 792 905**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.05.2016 PCT/EP2016/061488**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2016 WO16185037**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2016 E 16724409 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 3297651**

54 Título: **Combinación sinérgica de factores de viabilidad neuronal y usos de los mismos**

30 Prioridad:

21.05.2015 WO PCT/IB2015/000967

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

12.11.2020

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (20.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) (20.0%);
SORBONNE UNIVERSITE (20.0%);
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (20.0%) y
THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (20.0%)**

72 Inventor/es:

**LEVEILLARD, THIERRY;
FLANNERY, JOHN;
MEI, XIN;
BYRNE, LEAH;
SAHEL, JOSÉ-ALAIN;
CLERIN-LACHAPELLE, EMMANUELLE;
SUN, JUNWEI;
BENNICELLI, JEANETTE y
BENNETT, JEAN**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 792 905 T3

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

DESCRIPCIÓN

Combinación sinérgica de factores de viabilidad neuronal y usos de los mismos

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende un primer ácido nucleico que codifica una isoforma corta del gen *NXNL1*, factor de viabilidad de conos derivados de bastones (RdCVF; del inglés, Rod-derived Cone Viability Factor) y un segundo ácido nucleico que codifica una isoforma larga del gen *NXNL1*, RdCVFL.

10

Estado de la técnica

El trastorno neurodegenerativo abarca un intervalo de afecciones seriamente debilitantes que se caracterizan por la degeneración neuronal.

15

Las distrofias de conos y bastones, tales como la retinitis pigmentosa (RP), son enfermedades degenerativas de la retina genéticamente heterogéneas caracterizadas por la muerte progresiva de fotorreceptores de bastones seguida de la pérdida consecutiva de conos. La RP es una de las formas más comunes de degeneración retiniana hereditaria, que afecta a alrededor de 1:3.500 personas en todo el mundo (1). Se han identificado hasta la fecha más de 54 mutaciones que causan RP con la mayoría de estas mutaciones en transcritos específicos de bastones. Los pacientes de RP presentan inicialmente pérdida de visión en condiciones de poca luz como resultado de la disfunción de los bastones, con una conservación relativa de la visión mediada por conos de la mácula. A medida que la enfermedad progresa, sin embargo, a la pérdida primaria de bastones le sigue la degeneración de conos y un déficit en la visión correspondiente mediada por conos. En la sociedad moderna, en la que muchos ambientes se iluminan artificialmente y muchas actividades dependen de la visión de colores con elevada precisión, la conservación de la vista mediada por conos en pacientes de RP conllevaría una mejora significativa en la calidad de vida.

20

25

La pérdida de conos en subgrupos de RP causada por mutaciones específicas de bastones se conoce poco, aunque se han propuesto varios mecanismos, que no son necesariamente excluyentes mutuamente. Algunos mecanismos hipotéticos implican un 'efecto de vecindad' por el que la muerte de conos es una consecuencia de la liberación de endotoxinas a partir de la degeneración de bastones circundantes o como resultado de la pérdida de contacto con bastones, el epitelio pigmentario de la retina (EPR; en inglés, RPE) o la glía de Müller. Como alternativa, podrían desempeñar un papel la activación de las células de Müller y la liberación de moléculas tóxicas. Otra hipótesis consiste en que las cantidades de oxígeno o de retinoides liberados a la capa fotorreceptora por el EPR a partir de la circulación de sangre coroidea son excesivas y tóxicas a medida que la carga metabólica de los bastones se pierde (2). Punzo et al. evidenciaron en modelos murinos de degeneración de la retina que los conos mueren, en parte, como resultado de inanición y desequilibrio nutricional, motivado por la ruta insulina/diana de rapamicina de mamífero (3). Adicionalmente, se ha sugerido que la pérdida de un factor de supervivencia secretado por bastones y requerido para la supervivencia de los conos puede contribuir a la pérdida de conos (4, 5).

30

35

40

De acuerdo con la última hipótesis, se ha comprobado que el tejido retiniano sano trasplantado apoya la supervivencia de conos en áreas distantes del tejido trasplantado en el ratón *rdl* (6, 7).

45

La Solicitud de Patente Internacional N°. WO2008/148860A1 describe una familia de factores tróficos, denominados factor de viabilidad de conos derivados de bastones (RdCVF) y RdCVF2, que son capaces de incrementar la supervivencia neuronal y son útiles para tratar y/o prevenir trastornos neurodegenerativos tales como la RP.

50

55

El factor de viabilidad de conos derivados de bastones (RdCVF) se identificó originalmente a partir de un método de alto rendimiento de cribado de librerías de ADNc como una molécula candidata responsable para este efecto de rescate (4). Los bastones secretan RdCVF y por tanto, según mueren los conos, la fuente de este factor paracrino se pierde y descienden los niveles de RdCVF. La pérdida de expresión de RdCVF y de factores secretados parecidos, puede contribuir por tanto a la segunda ola de degeneración de conos observada en las distrofias de conos y bastones. Se ha observado que el RdCVF media en la supervivencia de conos tanto en cultivo (8) como cuando se inyecta de forma subretiniana en modelos de ratones y ratas de formas recesivas y dominantes de retinitis pigmentosa (4, 9). La alteración de *Nxn1*, el gen que codifica RdCVF, vuelve a los fotorreceptores de ratón cada vez más susceptibles a la disfunción de los fotorreceptores y a la pérdida de conos a lo largo del tiempo (10).

60

65

El *Nxn1* codifica dos isoformas de RdCVF mediante corte y empalme alternativo. La isoforma que media la supervivencia de los conos es una forma truncada de su homólogo más largo, RdCVFL, que incluye una extensión del extremo C terminal que confiere una función enzimática (11). RdCVFL, que contiene todos los aminoácidos del RdCVF, está codificado por los exones 1 y 2 del gen *Nxn1* y es un miembro de la familia tiorredoxina (12). Las tiorredoxinas tienen diferentes funciones, incluyendo el mantenimiento del entorno reductor adecuado en las células y la participación en rutas de apoptosis. Estas funciones se consiguen a través de reacciones de tioloxidoreductasas mediadas por un sitio catalítico CXXC dentro de un pliegue de tiorredoxina (13).

Sin embargo, se necesitan tratamientos neuroprotectores adicionales para los trastornos neurodegenerativos.

Objeto de la invención

5 Los inventores han descubierto que, sorprendentemente, combinando las isoformas corta (RdCVF) y larga (RdCVFL) del gen *NXNL1*, se puede obtener un efecto sinérgico.

10 La presente solicitud se refiere a un método para tratar a un paciente que sufre de una enfermedad degenerativa de la retina que comprende la etapa consistente en administrar a dicho paciente una dosis eficaz terapéuticamente de un primer ácido nucleico que codifica una isoforma corta del gen *NXNL1*, factor de viabilidad de conos derivados de bastones (RdCVF) y un segundo ácido nucleico que codifica una isoforma larga del gen *NXNL1*, RdCVFL.

Dichas isoformas corta y larga pueden administrarse mediante vectores separados o mediante un vector único.

15 La presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende un primer ácido nucleico que codifica una isoforma corta del gen *NXNL1*, factor de viabilidad de conos derivados de bastones (RdCVF) y un segundo ácido nucleico que codifica una isoforma larga del gen *NXNL1*, RdCVFL.

20 La presente solicitud se refiere también a un kit de partes para utilizar en un método para tratar un trastorno degenerativo de los fotorreceptores que comprende:

- un primer vector de expresión que comprende un primer ácido nucleico que codifica un factor de viabilidad de conos derivados de bastones (RdCVF) de isoforma corta y
- un segundo vector de expresión que comprende un segundo ácido nucleico que codifica un RdCVFL de isoforma larga.

25

Descripción detallada de la invención

30 La presente solicitud se refiere a un método para tratar a un paciente que sufre una enfermedad degenerativa de la retina que comprende la etapa consistente en administrar a dicho paciente una dosis eficaz terapéuticamente de un primer ácido nucleico que codifica una isoforma corta del factor de viabilidad de conos derivados de bastones (RdCVF) y un segundo ácido nucleico que codifica un RdCVF de isoforma larga.

Dichas isoformas corta y larga pueden administrarse mediante vectores separados o mediante un vector único.

35 Por tanto, la presente solicitud se refiere a un método para tratar a un paciente que sufre una enfermedad degenerativa de la retina que comprende la etapa consistente en administrar a dicho paciente una dosis eficaz terapéuticamente de un primer ácido nucleico que codifica una isoforma corta del factor de viabilidad de conos derivados de bastones (RdCVF) y un segundo ácido nucleico que codifica un RdCVFL de isoforma larga, en la que dicho primer ácido nucleico y dicho segundo ácido nucleico se encuentran en un vector de expresión único.

40

La presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende un primer ácido nucleico que codifica un gen *NXNL1* de isoforma corta, factor de viabilidad de conos derivados de bastones (RdCVF) y un segundo ácido nucleico que codifica una isoforma larga del gen *NXNL1*, RdCVFL.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión factor de viabilidad de conos derivados de bastones (RdCVF) se refiere a la proteína codificada por el gen similar a tiorredoxina 6 (Txnl6) o similar a nucleorredoxina 1 (*NXNL1*). Abarca las proteínas RdCVF de cualquier especie animal. Normalmente, según la presente invención, las proteínas RdCVF pueden ser proteínas RdCVF de mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a ratones, ratas, gatos, perros, primates no humanos y seres humanos.

50

A menos que se especifique otra cosa, el término "RdCVF" se refiere a la isoforma corta del gen *NXNL1* y "RdCVFL" o "RdCVF-L" a la isoforma larga del gen *NXNL1*.

55 Normalmente, en ratones, la isoforma corta (RdCVF) es una proteína de 109 aminoácidos de longitud a la que hace se referencia en virtud del número de registro de Uniprot Q91W38. La isoforma murino larga (RdCVF-L) es una proteína de 217 aminoácidos de longitud a la que se hace referencia como Q8VC33.

60 En una realización, el vector de expresión según la invención es un vector de expresión en el que dicha isoforma corta de RdCVF es la isoforma corta del RdCVF humano y en el que dicha isoforma larga es la isoforma larga del RdCVFL humano.

En particular, la isoforma corta del RdCVF es la isoforma corta humana del RdCVF (hRdCVF), más particularmente la siguiente secuencia:

ES 2 792 905 T3

```

      10          20          30          40          50
MASLFSGRIL IRNNSDQDEL DTEAEVSRRL ENRLVLLFFG AGACPQCQAF
      60          70          80          90         100
VPILKDFVVR LTDEFYVLRA AQLALVYVSQ DSTEEQQDLF LKDMPKKWLF
      109
LPFEDDLRR (SEQ ID No.1)

```

- 5 En particular, la isoforma larga del gen *NXNL1* es la isoforma larga humana del RdCVFL (hRdCVFL), más particularmente la secuencia a la que se hace referencia en virtud del número de registro Q96CM4 y que se expone a continuación:

```

      10          20          30          40          50
MASLFSGRIL IRNNSDQDEL DTEAEVSRRL ENRLVLLFFG AGACPQCQAF
      60          70          80          90         100
VPILKDFVVR LTDEFYVLRA AQLALVYVSQ DSTEEQQDLF LKDMPKKWLF
      110         120         130         140         150
LPFEDDLRRD LGRQFSVERL PAVVVLKPDG DVLTRDGADE IQRLGTACFA
      160         170         180         190         200
NWQEAAEVLD RNFQLPEDLE DQEPRSLTEC LRRHKYRVEK AARGGRDPGG
      210
GGGEEGGAGG LF (SEQ ID No.2)

```

- 10 Las secuencias de las proteínas RdCVF y RdCVFL se describen en Chalmel et al. 2007, BMC Molecular Biology 2007, 8:74 y en la Solicitud de Patente Internacional N°. WO2008/148860.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "vector" y "vector de expresión" se usan indistintamente para referirse a un vector de expresión. El vector de expresión según la invención puede ser en forma de un plásmido, un virus, un fago, etc.

En una realización de la presente invención, el vector de expresión según la presente invención es un virus.

En una realización particular de la presente invención, el vector de expresión es un vector adenoasociado (AAV; del inglés, adeno-associated vector).

- 20 Se han descrito AAV ampliamente en la técnica como vectores adecuados para la administración de genes. De hecho, los AAV no son patógenos y muestran una gama amplia de especificidad tisular. Normalmente, los AAV según la presente invención son AAV que pueden dirigirse a células retinianas.

Entre los ejemplos se incluyen, pero sin limitarse a, AAV2, AAV2/8, AAV9 y AAV7m8.

- 25 En una realización, el vector de expresión según la presente invención es un AAV seleccionado del grupo que consiste en AAV2, AAV2/8, AAV9 y AAV7m8.

En particular, el AAV según la presente invención se obtiene según el método descrito en la Solicitud de Patente Internacional N°. WO2012/158757.

- 30 Normalmente, los ácidos nucleicos primero y segundo, que codifican las isoformas corta y larga del gen *NXNL1* respectivamente, están bajo el control de un promotor que permite la expresión dicha isoforma corta y larga en las células diana. Los promotores adecuados pueden ser promotores ubicuos, tales como el promotor de CMV.

Los promotores adecuados pueden ser promotores que permitan la expresión en la retina, preferentemente en células epiteliales pigmentadas de la retina y en células fotorreceptoras.

En una realización, el promotor permite la expresión génica en células epiteliales pigmentadas de retina.

- 35 En una realización, el promotor permite la expresión génica en fotorreceptores de conos. Un ejemplo no limitativo es el promotor de opsina.

Normalmente, la isoforma corta del gen *NXNL1* se expresa al menos por las células epiteliales pigmentadas de la

retina y la isoforma larga se expresa al menos por las células fotorreceptoras de conos.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión tal como se ha descrito anteriormente en un método para tratar una enfermedad degenerativa de la retina.

5 En el contexto de la invención, los términos "tratar" o "tratamiento", tal como se usa en el presente documento, significan revertir, aliviar, inhibir el progreso de o prevenir el trastorno o afección al que se aplica dicho término o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección (por ejemplo, enfermedades degenerativas de la retina).

10 La expresión "enfermedades degenerativas de la retina" abarca todas las enfermedades asociadas con la degeneración de los conos. La enfermedad degenerativa de la retina incluye, pero no se limita a la retinitis pigmentosa, degeneración macular asociada a la edad, síndrome de Bardet-Biedel, síndrome de Bassen-Kornzweig, enfermedad de Best, coroidema, atrofia girada, amaurosis congénita de Leber, enfermedad de Refsum, enfermedad de Stargardt o síndrome de Usher.

15 En una realización de la invención, la enfermedad degenerativa de la retina es la retinitis pigmentosa.

Según la invención, la expresión "paciente" o "paciente que lo necesita" tiene por objeto un ser humano o un mamífero no humano afectado o con probabilidad de verse afectado por enfermedades degenerativas de la retina.

20 Según la presente invención, una "cantidad eficaz terapéuticamente" de una composición es una que es suficiente para lograr un efecto biológico deseado, en este caso incrementando la viabilidad neuronal. Se entiende que la posología eficaz dependerá de la edad, sexo, salud y peso del receptor, tipo de tratamiento concomitante, si lo hay, frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. Sin embargo, la posología preferida se puede adaptar al sujeto individual, tal como se entiende y se puede determinar por un experto en la técnica, sin excesiva experimentación.

El vector de expresión de la invención puede ser adecuado para administración intravenosa o administración intraocular. En una realización particular, el vector de expresión se administra mediante inyección intravítrea.

30 En una realización de la invención, el vector de expresión es para administrar mediante inyección subretiniana o mediante inyección intravítrea.

En una realización de la invención, el vector de expresión es para administrar mediante inyección intravenosa.

35 La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende un vector de expresión que comprende un primer ácido nucleico que codifica una isoforma corta del gen *NXNL1*, factor de viabilidad de conos derivados de bastones (RdCVF) y un segundo ácido nucleico que codifica una isoforma larga del gen *NXNL1*, RdCVF-L y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 Sin deseos de adherirse a ninguna teoría, se cree que la administración de la isoforma corta RdCVF y de la isoforma larga RdCVF-L dan lugar a un efecto sinérgico.

Por un lado, la isoforma corta de RdCVF se produce y secreta por el epitelio pigmentado de la retina (EPR; en inglés, RPE), que protege los conos estimulando la glucólisis aerobia a través del receptor de RdCVF en la superficie celular de los conos mediante un mecanismo autónomo no de la célula.

45 Por otro lado, la isoforma larga, RdCVFL, protege los conos contra el deterioro oxidativo de una manera autónoma de la célula, debido a su función de tioloxidoreductasa.

La presente solicitud también describe el caso donde las isoformas corta y larga RdCVF y RdCVF-L se administran por vectores separados, los cuales pueden administrarse de forma simultánea o secuencial.

50 La presente solicitud se refiere también a un método para tratar a un paciente que sufre una enfermedad degenerativa de la retina que comprende la etapa de administrar a dicho paciente una dosis eficaz terapéuticamente de un primer ácido nucleico que codifica un RdCVF de isoforma corta y un segundo ácido nucleico que codifica un RdCVFL de isoforma larga, en el que dichos primer ácido nucleico y segundo ácido nucleico se encuentran en vectores de expresión separados.

55 La presente solicitud se refiere también a un kit de partes para utilizar en un método para tratar un trastorno degenerativo de los fotorreceptores que comprende:

- 60 - un primer vector de expresión que comprende un primer ácido nucleico que codifica una isoforma corta del gen *NXNL1*, factor de viabilidad de conos derivados de bastones (RdCVF) y
- un segundo vector de expresión que comprende un segundo ácido nucleico que codifica una isoforma larga del gen *NXNL1*, RdCVF-L.

La invención se ilustrará adicionalmente a través de los siguientes ejemplos y figuras.

65

Descripción de las figuras

Figura 1: representación esquemática del vector 2xRdCVF (plásmido p857 y AAV CT-39)

Kanamicina: Selección de plásmidos en bacterias

repetición terminal invertida de AAV ITR 5'

5 promotor CMV/CBA - delta 390: citomegalovirus mezclado/beta actina de pollo (promotor ubicuo y fuerte)

hRdCVF: ADNc de RdCVF humano

poliA de HCB (en inglés, BGH): Estabilización de ARNm

pTF3, terminador bla txn, terminador rpn txn: conjunto de terminadores transcripcionales y un aislante, localizado externo al ITR 3' en el plásmido (es decir, no en el genoma de AAVr). El pTF3 está integrado en el bla txn.

10 promotor CMV/CBA - delta 390 citomegalovirus mezclado/beta actina de pollo (promotor ubicuo y fuerte) hRdCVF: ADNc de RdCVF humano

poliA de HCB: Estabilización de ARNm

repetición terminal invertida de AAV ITR 3'

15 **Figura 2: representación esquemática del vector RdCVF-RdCVFL (plásmido p853 y AAV CT-35)**

El vector contiene los siguientes elementos Kanamicina: Selección de plásmidos en bacterias

repetición terminal invertida de AAV ITR 5'

promotor CMV/CBA - delta 390 beta actina de pollo/citomegalovirus mezclado (promotor ubicuo y fuerte)

20 hRdCVF: ADNc de RdCVF humano

poliA de HCB: Estabilización de ARNm

pTF3, terminador bla txn, terminador rpn txn: conjunto de terminadores transcripcionales y un aislante, localizado externo al ITR 3' en el plásmido (es decir, no en el genoma de AAVr). El pTF3 está integrado en el bla txn.

promotor CMV/CBA - delta 390: citomegalovirus mezclado/beta actina de pollo (promotor ubicuo y fuerte)

25 hRdCVFL: ADNc de RdCVFL humano

poliA de HCB: Estabilización de ARNm

repetición terminal invertida de AAV ITR 3'

30 **Figura 3: Densidad de conos (PN44) después de inyección subretiniana del ratón *rd1* (PN14) de AAV2-GFP frente a AAV2RdCVF/RdCVFL [CT35]**

Figura 4: Agudeza visual del ratón *rd10* después de inyección subretiniana de AAV2RdCVF/RdCVFL [CT35] (Figura 4A) frente a AAV2RdCVF[CT37](Figura 4B)

35 **Ejemplos**

Ejemplo 1: El AAV-RdCVF rescata conos y el AAV-RdCVFL protege bastones en la degeneración de la retina

El ejemplo 1 se corresponde con los datos experimentales publicados por los inventores en la publicación siguiente: Byrne, L.C., Dalkara, D., Luna, G., Fisher, S.K., Clerin, E., Sahel, J.A., Léveillard, T., Flannery, J.G., J Clin Invest., 2015 Jan; 125(1): 105-16. doi: 10.1172/JCI65654. Publicación electrónica 21 de noviembre de 2014. "Viral-mediated RdCVF and RdCVFL expression protects cone and rod photoreceptors in retinal degeneration". (32 en la lista de referencias de más adelante)

Los inventores describen experimentos que estudian la naturaleza bifuncional del gen *Nxn1* mediante la evaluación de los efectos de expresión de las dos isoformas de RdCVF, RdCVF y RdCVFL, a través de la transferencia génica del ratón *rd10*, un modelo bien caracterizado de distrofia de conos y bastones resultante a partir de la mutación en la subunidad β de PDE6, la fosfodiesterasa de GMP cíclico específica de bastones (14, 15). La degeneración de la retina del *rd10* es más lenta que la tasa de degeneración en el modelo estudiado más ampliamente de degeneración recesiva de la retina, el ratón *rd1*, que pierde la mayoría de fotorreceptores por P15-P20. En el ratón *rd10* la pérdida de bastones comienza en el P18 y alcanza el máximo alrededor del P25, de modo que la fase principal de pérdida de bastones no solapa con la diferenciación terminal de fotorreceptores (16). El modelo de ratón *rd10* es susceptible de terapia génica (17, 18) y se ha demostrado que los tratamientos antioxidantes retardan la pérdida de bastones en este modelo de ratón (19). Además, se ha demostrado que la cría en condiciones de poca luz reduce el ritmo de degeneración de la retina, ampliando la oportunidad de tratamiento terapéutico (17).

Aquí, los presentes inventores investigan los efectos de la expresión de RdCVF y RdCVFL mediada por AAV. Estos estudios utilizan dos rutas para la administración del vector viral: la inyección sistémica de AAV9 a través de la vena de la cola en P1 y la inyección intravítrea en P15. La inyección sistémica temprana permite el comienzo de la expresión del transgen codificado por el vector de AAV en un punto temporal temprano en el curso de la degeneración, antes de la fase principal de muerte celular de bastones y de forma segura dentro del momento propicio para evaluar el efecto de la expresión del transgen sobre la degeneración de bastones y conos. Sin embargo, la administración sistémica no es un modo relevante clínicamente de administración a la retina, dado que se infectan simultáneamente otros muchos tejidos y las respuestas inmunitarias representan una barrera principal para este enfoque. Por tanto, los presentes investigadores también examinaron los efectos de la inyección intravítrea (una técnica utilizada habitualmente para la administración intraocular) de una variante nueva de AAV denominada 7m8, que transduce fotorreceptores a partir del vítreo (20).

Los presentes investigadores muestran aquí que la expresión de las dos isoformas de RdCVF tiene efectos positivos, de contraste sobre la supervivencia de bastones y conos. La expresión incrementada de RdCVF a través de inyecciones sistémicas e intravítreas permitieron el rescate estructural y funcional de fotorreceptores de conos, pero

- 5 tuvieron poco efecto sobre bastones. El RdCVF en sí mismo no rescata conos de forma significativa, aunque la coexpresión de RdCVF y RdCVFL incrementó el efecto de rescate observado. En cambio, la expresión de RdCVFL de forma temprana en el curso de la enfermedad en animales *rd10* criados en oscuridad prolongó la función de los bastones, incrementó los niveles de rodopsina y disminuyó los subproductos de estrés oxidativo celular.
- 10 Estos resultados indican que RdCVF y RdCVFL protegen los fotorreceptores mediante mecanismos separados complementarios y muestran la prueba de concepto para una terapia génica mediada por vectores virales ampliamente aplicable que puede llegar a prolongar la visión en pacientes que sufren de diversas distrofias de conos y bastones, independiente de la mutación subyacente.

15 **Métodos**

Animales

- Los ratones C57B1/6J *rd10* y P23H se consiguieron de The Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine) y se criaron en un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad, a menos que se llevaran a una caja oscura para crianza en oscuridad. Todos los experimentos se llevaron a cabo según la declaración de ARVO (la asociación para la investigación de la visión y oftalmología; del inglés, Association for Research in Vision and Ophthalmology) para el uso de animales en la investigación oftálmica y de la visión y las directrices de la Oficina de Cuidado de Animales de Laboratorio de la Universidad de California, Berkeley, California.

25

Producción de vectores víricos

- Los vectores AAV transportadores de ADNc que codifica RdCVF, RdCVFL o eGFP de ratón se produjeron mediante el método de cotransfección de plásmidos (31). Se purificó AAV recombinante mediante ultracentrifugación en gradiente de iodixanol y cromatografía en columna de heparina (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido). El eluyente vírico se intercambió de tampón y se concentró con Ultra-15 Centrifugal Filter Units de Amicon en PBS y se valoró mediante PCR cuantitativa en referencia a una recta de calibrado.

30

Sección de agarosa y microscopía confocal

35

Las retinas recién diseccionadas se colocaron inmediatamente en paraformaldehído al 4 % durante la noche a 4 °C. Se realizaron cortes de alivio y las retinas enteras se embebieron en agarosa al 5 %. Se realizaron cortes de secciones transversales de 150 µm en un vibratomo (VT 1000S, Leica Microsystems). Las secciones se montaron a continuación con medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, California) sobre portaobjetos para microscopía confocal (LSM710, Carl Zeiss; Thornwood, Nueva York).

40

Inyecciones intravasculares.

- Se inmovilizaron crías postnatales de 1 día y se utilizó un microscopio de operaciones para ver la vena de la cola. Se extrajeron 10 µl de la solución de vectores en una jeringa de insulina de 3/10cc. La aguja de calibre 30 se insertó en la vena y se presionó el émbolo manualmente. Se inyectaron un total de 5×10^{11} partículas resistentes a ADNasa. Se verificó una inyección correcta notando la palidez de la vena. Después de la inyección, se dejó que las crías se recuperan durante varios minutos sobre una plataforma calentada a 37 °C antes de devolverlas a sus cajas.

45

50 *Inyecciones intravítreas*

Se anestesió a los ratones con ketamina (72 mg/kg) y xilacina (64 mg/kg) mediante inyección intraperitoneal. La mitad de una aguja desechable de 30 se pasó a través de la esclerótica, en el ecuador y posterior del limbo, en la cavidad vítrea. Un total de 5×10^{10} partículas resistentes a ADNasa en un µl de volumen se inyectaron posteriormente en la cavidad vítrea con observación directa sobre la cabeza del nervio óptico. Los ojos de control contralaterales recibieron vectores que portan el gen que codifica GFP o PBS.

55

Crianza en oscuridad

- Los ratones criados en oscuridad nacieron y se criaron en cajas a prueba de luz bajo luz roja, que se abrieron solo durante breves periodos de tiempo para la cría de los animales, que se hizo bajo luz roja. Los animales se transportaron a y desde la caja para los experimentos en cajas cubiertas.

60

qRT-PCR

65

Se eutanizaron los animales humanitariamente mediante sobredosis de CO₂ y luxación cervical. Se recogió una

retina de cada ratón en cada condición experimental (n=5). Se extrajo ARN de cada retina de forma separada (micro kit de Rneasy, Qiagen, Valencia, California) y se sometió a digestión por ADNasa y el ARN resultante se utilizó para crear ADNc. El gen constitutivo gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH; del inglés, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) se utilizó como un control interno y se utilizaron controles sin RT sin transcriptasa interna para confirmar la ausencia de ADN genómico. Se realizó qRT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real) en muestras que utilizan cebadores validados para **RdCVF** o rodopsina. Se determinaron los niveles de ARNm utilizando el método de la recta de calibrado relativo de qRT-PCR utilizando una curva estándar de ADNc de WT y se expresan en porcentaje de WT. Las muestras individuales se realizaron en triplicados como réplicas técnicas.

Fotografía de fondo

Las imágenes de fondo se realizaron con una cámara de fondo (Micron II; Phoenix Research Labs Inc., Pleasanton, California) equipada con un filtro para monitorizar la expresión de GFP en ratones vivos, anestesiados. Tras aplicar proximetaína, se dilataron las pupilas para la imagen de fondo con fenilefrina (2,5 %) y sulfato de atropina (1 %).

ERG

Se dejó a los ratones acostumbrarse a la oscuridad durante 2 horas y a continuación se les anestesió, seguido de dilatación de las pupilas. Se dejó a los ratones sobre una plataforma calentada a 37 °C y se les colocó lentes de contacto sobre la córnea de ambos ojos. Se insertó un electrodo de referencia en la frente y un electrodo de masa en la cola. Para examinar la función de la retina en condiciones escotópicas se grabaron los ERG (electrorretinogramas) (Espion E2 ERG system; Diagnosys LLC, Littleton, Massachusetts) bajo intensidades de destellos que varían de -3 a 1 log cds/m² sobre un fondo oscuro. Cada estímulo se presentó en series de tres destellos. Para grabar los ERG fotópicos, los ratones se expusieron inicialmente a un fondo de saturación de bastones durante 10 minutos. Se presentaron estímulos que varían de -0,9 a 1,4 log cds/m² 20 veces sobre un fondo iluminado. Los ERG de flicker (estímulo luminoso repetitivo) se obtuvieron tras la presentación de un estímulo de 30 Hz sobre un fondo de saturación de bastones. La intensidad de estímulo y el momento se controlaron por ordenador. Los datos se analizaron con MatLab (v7.7; Mathworks, Natick, Massachusetts). Las amplitudes de ERG se compararon utilizando una prueba t de Student.

Captación de mosaico y cuantificación de conos

Las muestras completas de retina se bloquearon durante la noche utilizando suero normal de burro (Jackson ImmunoResearch Laboratories; West Grove, Pensilvania) en PBS 1:20 que contiene ASB (en inglés, BSA) al 0,5 % Triton X-100 al 0,1 % y Azida (PBTA) al 0,1 % a 4 °C y se colocaron sobre un rotador para agitación continua. Los cócteles de anticuerpos que contienen anti-S-opsina de cabra (goat-anti-S-Opsin; 1:100; Santa Cruz Biotechnologies; Santa Cruz, California), anti-M/l-opsina de conejo (rabbit-anti-M/l-opsin; 1:500; Chemicon International; Temecula, California) y antirrodopsina de ratón (mouse-anti-Rhodopsin; 1:100; obsequio del Dr. Robert Molday, University of British Columbia) se añadieron a continuación a una solución de PBTA y se incubaron durante 2 días. Las preparaciones de retina se lavaron a continuación en PBTA 3 x 15 min y 1 x hora y posteriormente se añadieron los fluoróforos secundarios correspondientes y se incubaron durante la noche a 4 °C. Finalmente, se aclararon las muestras, se montaron y se colocaron cubreobjetos en Vectashield (Vector Labs; Burlingame, California). Las imágenes de retina de ratón se vieron y recogieron utilizando un microscopio confocal láser de barrido Olympus Fluoview 1000 (Center Valley, Pensilvania) utilizando una lente de inmersión en aceite 40x UPlanFLN (N.A. 1,3). Se utilizó una etapa automatizada (Applied Scientific Instrumentation; Eugene, Oregón) para capturar secciones ópticas en intervalos de 1 µm en el eje z y una resolución de píxel de 1024 x 1024 en la dirección x-y. A continuación se utilizaron estos archivos para crear proyecciones de máxima intensidad utilizando el software de análisis de bioimágenes, Imago (Santa Barbara, California). Las imágenes digitales se capturaron con un solapamiento del 20 % entre imágenes individuales y las ~300-400 imágenes resultantes se montaron utilizando Imago. El recuento de conos se realizó posteriormente utilizando el software Imaris (Bitplane AG, Zurich, Suiza) y el software personalizado se escribió en Python.

Ensayo de TBARS

Las concentraciones de malondialdehído (MDA) se determinaron utilizando un ensayo de TBARS (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, EE.UU.). Se agruparon tres retinas para cada condición para cada ensayo y el ensayo se repitió 3 veces. Se utilizó un total de 25 mg de tejido de retina sonicado para cada ensayo. Las retinas se sonicaron en tampón de lisis que contiene un cóctel inhibidor de proteinasas, a continuación se centrifugaron. El sobrenadante se usó para el ensayo de TBARS, que se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, con réplicas técnicas preparadas por triplicado. Se preparó una curva estándar utilizando muestras de MDA de concentración conocida y las concentraciones de MDA de las muestras se determinaron frente a la curva resultante.

Estadística

Se utilizó una prueba t de Student pareada o desapareada de dos colas para las comparaciones de los grupos

experimentales. Se consideró un p-valor menor de 0,05 estadísticamente significativo y se indicó mediante un asterisco. Los p-valores menores de 0,01 se indicaron con un doble asterisco. Las barras de error indican la desviación estándar.

5 Resultados

Administración sistémica de AAV92YF a través de inyecciones en la vena de la cola en P1.

Los presentes inventores examinaron los efectos terapéuticos de la administración temprana de RdCVF y RdCVFL administrados mediante inyección intravenosa (vena de la cola) de un vector autocomplementario AAV9 con dos mutaciones de tirosina a fenilalanina (AAV92YF). Las inyecciones intraoculares en el ojo en desarrollo son poco prácticas en la semana inicial postnatal, sin embargo, se ha observado que AAV92YF cruza la barrera hematorretinal cuando se inyectó en la vena de la cola en P1, dando lugar a niveles de expresión génica elevados a través de la retina (21). La administración sistémica da lugar al comienzo de la expresión en la retina más tempranamente en el desarrollo de forma significativa, antes de que se pierda un número significativo de bastones. El AAV92YF con un promotor CAG ubicuo que impulsa la expresión de GFP (AAV92YF-scCAG-GFP) dio como resultado una expresión temprana de la retina, que resultó visible en los montajes planos de retina en P8 y mediante imágenes de fondo *in vivo* inmediatamente después de la apertura del ojo en P15. Las imágenes de fondo en P35 mostraron una fuerte expresión de GFP a través de la retina. Los montajes planos de retina revelaron que se transdujeron gran número de fotorreceptores. La expresión de GFP en P35 se observó en todas las capas de la retina, en células ganglionares, glía de Müller, células amacrinas y fotorreceptores, así como en EPR. Un patrón similar de expresión generalizada y fuerte, que resultó fácilmente visible sin inmunomarcaje, se observó en retinas de WT y *rd10*. La qRT-PCR realizada sobre ARNm recogido a partir de ratones *rd10* criados en un ciclo de luz-oscuridad normal inyectados en P1 con AAV92YF-scCAG-RdCVF, AAV92YF-scCAG-RdCVFL o PBS reveló que la inyección intravenosa del virus dio como resultado niveles elevados de expresión de RdCVF en la retina en P35. Como cabía esperar, los niveles de ARNm de RdCVF se redujeron considerablemente, en comparación con WT en animales *rd10* inyectados con PBS de la misma edad ($5\% \pm 5\% \text{WT}$). En cambio, los niveles de expresión tras la administración de genes mediada por AAV fueron comparables a los niveles de RdCVF endógenos en animales WT (AAV92YF-RdCVF = $79\% \pm 30\% \text{WT}$; AAV92YF-RdCVFL = $59\% \pm 13\% \text{WT}$). Los niveles de expresión de ARNm de rodopsina permanecieron bajos a través de las condiciones, indicando tasas similares de pérdida de fotorreceptores de bastones en animales tratados y sin tratar en P35 (AAV92YF-RdCVF = $8\% \pm 3\% \text{WT}$; AAV92YF-RdCVFL = $1\% \pm 1\% \text{WT}$; PBS $6\% \pm 1\% \text{WT}$).

La expresión del transgén a partir de la administración mediada por AAV es dependiente de la dosis. Los animales inyectados con $2\text{E}+11$, $5\text{E}+11$ o $1\text{E}+12$ partículas virales de AAV92YF-scCAG-GFP y visualizados un mes después de la inyección mostraron que los niveles de GFP se incrementaron con una valoración vírica más elevada. Adicionalmente, la qRT-PCR de animales inyectados con un intervalo de valoraciones de AAV92YF-scCAG-RdCVF mostró que la expresión de RdCVF se incrementó con la inyección de un número más elevado de partículas víricas.

Efecto de la inyección de AAV92YF.scCAG.RdCVF sobre la función de los conos.

Se inyectaron ratones de forma intravenosa con AAV92YF-scCAG-RdCVF en P1 y se criaron posteriormente en un ciclo de luz-oscuridad normal. A continuación se midieron los electroretinogramas fotópicos (ERG) para determinar el efecto de la expresión de RdCVF sobre la función de los conos. Las trazas de ERG representativas ilustran la mejora de la forma de onda y la amplitud de los ERG grabados a partir de ojos inyectados con AAV92YF-scCAG-RdCVF, en comparación con inyecciones de AAV92YF-scCAG-RdCVFL, AAV92YF-scCAG-GFP o PBS. La expresión de RdCVF mediada por AAV92YF-scCAG dio como resultado una amplitud significativamente mayor de ondas b de ERG fotópicos ($97,1 \pm 10,67 \mu\text{V}$) en comparación con animales inyectados con AAV92YF-scCAG-RdCVFL ($46,7 \pm 6,4 \mu\text{V}$, $p < 0,005$) AAV92YF-scCAG-GFP ($46,6 \pm 14,9 \mu\text{V}$, $p < 0,01$) o PBS ($56,5 \pm 4,64 \mu\text{V}$, $p < 0,01$). Las amplitudes de ondas b de WT fueron $156,6 \pm 11,4 \mu\text{V}$. Los ERG se grabaron de 5 animales para cada condición. Los datos se representan como la media \pm SD (desviación estándar). Los ERG de flicker fotópicos se grabaron también como medida de la función de los conos. Las trazas de ERG de flicker representativas ilustran la mejora de la forma de la onda y la amplitud en comparación con animales inyectados con GFP.

El rescate de ERG fotópico es dependiente de la dosis, indicando que se debe alcanzar un nivel de expresión de RdCVF necesario para que se produzca un rescate significativo. Si bien las amplitudes de ERG se incrementaron ligeramente con la inyección de E+11 vg, la diferencia no fue significativa, si bien la inyección de E+12 vg dio como resultado amplitudes mayores de ERG.

La expresión de transgenes es duradera, con expresión de GFP en animales inyectados con AAV9-scCAG-GFP fácilmente visible en montajes planos de retina visualizados un año después de la inyección. En los animales *rd10* inyectados con AAV92YF-scCAG-RdCVF, la qRT-PCR revela niveles elevados de RdCVF un año después de la inyección.

Densidades de conos en animales inyectados con AAV92YF.scCAG.RdCVF.

Se utilizó un recuento automático de segmentos externos de conos marcados con inmunofluorescencia para cuantificar

la supervivencia de conos. Se montaron en plano retinas enteras de animales utilizados previamente para grabar ERG y se tiñeron con anticuerpos contra S-opsina (marcado azul) y M/I-opsina (marcado rojo). Se recogieron imágenes de alta resolución 40x con enfoque de apilamiento (en inglés, z-stack images) a través de la retina entera, se registraron y se cosieron juntas para crear mosaicos. Los mosaicos de montajes planos de retinas revelaron números más elevados de conos marcados tanto con S- como con M/I-opsina en montajes planos completos a partir de animales inyectados con AAV92YF-scCAG-RdCVF. Se observan números más elevados de conos supervivientes de ambos tipos en imágenes de mayor resolución cerca de la cabeza del nervio óptico, la región de la retina con la degeneración más grave. La cuantificación automática de densidad de conos en inyectadas con AAV92YF-scCAG-RdCVF y PBS reveló números significativamente más elevados tanto de conos S como de M/I por mm² en ojos tratados. Las densidades de conos S fueron: ojos tratados con RdCVF: 5573 ± 211/ mm²; ojos tratados con PBS: 2.961 ± 917/ mm²; p<0,01, conos WT: 7446 ± 868/ mm². Las densidades de conos M/I fueron: ojos tratados con RdCVF: 8755 ± 1572/ mm²; ojos tratados con PBS: 2682 ± 293/ mm²; p<0,01; conos WT 9761 ± 784/ mm².

Efecto de la inyección sistémica de AAV92YF-scCAG-RdCVFL.

Los animales se criaron en la oscuridad para reducir la tasa de pérdida de bastones y permitir el comienzo de la expresión de RdCVFL en los bastones antes de la apoptosis. La reducción de la exposición a la luz redujo la tasa de degeneración de fotorreceptores, como se mostró previamente (17). A los ratones se les inyectó en P1 AAV92YF-scCAG-RdCVFL, AAV92YF-scCAG-GFP o PBS (cada grupo n=6). Se grabaron ERG escotópicos de campo completo semanalmente. Las grabaciones a partir del estímulo de intensidad de luz más elevado hechas 3, 4 y 5 semanas después de la inyección revelaron una pérdida menor de la amplitud de ondas a en las semanas 3 y 4, pero esta mejoría ya no era evidente a las 5 semanas. La diferencia fue estadísticamente significativa (p < 0,05) solo a las 4 semanas tras la inyección. Se realizó un análisis más detallado en una segunda camada de ratones inyectados con AAV92YF-scCAG-RdCVFL o PBS. En este grupo, cuatro semanas después de la inyección, las diferencias más significativas en amplitudes de ondas a se hicieron notorias a intensidades de luz menores (-1 y - 2 log cds/m²). Las trazas de ERG representativas ilustran la conservación de la amplitud de ondas a y ondas b en animales inyectados con AAV92YF-scCAG-RdCVFL en comparación con animales control inyectados con GFP o PBS. Las grabaciones de ERG del ERG fotópico revelaron una demora en la disminución del ERG de conos en ojos que expresan RdCVFL que fue más notoria 5 semanas después de la inyección, no obstante, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

qRT-PCR sobre ARNm de rodopsina en animales criados en oscuridad inyectados sistémicamente con AAV92YF-scCAG-RdCVFL.

La qRT-PCR realizada sobre ARNm recogido de P28 animales inyectados con AAV92YF-RdCVFL, GFP o RdCVF en P1 y criados en oscuridad completa, reveló un incremento de los niveles de ARNm de rodopsina en animales inyectados con AAV92YF-RdCVFL (82 %±21 % WT, p<0,05), pero no con PBS (56 %±6 % WT), AAV92YF-GFP (59 %±15 % WT) o AAV92YF-RdCVF (57 %±16 % WT). Estos resultados, junto con los niveles de ARNm de rodopsina medidos en animales criados en un ciclo de luz-oscuridad normal, indicaron la importancia de la administración de RdCVFL durante un momento propicio para que los efectos de la expresión se observen en este modelo de degeneración de retina relativamente rápido, que empieza a perder fotorreceptores en las primeras pocas semanas de vida, dado que no se observó efecto sobre los niveles de ARNm de rodopsina en animales inyectados con AAV92YF-RdCVFL y criados bajo la luz.

Medición de la peroxidación lipídica.

Se utilizó un ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS; del inglés, thiobarbituric acid reactive substances) para determinar los niveles del subproducto de la peroxidación lipídica malondialdehído (MDA) en retinas tratadas con AAV92YF-scCAG-RdCVFL, AAV92YF-scCAG-RdCVF, AAV92YF-scCAG-GFP o PBS. La prueba se realizó en tres retinas agrupadas y se repitió tres veces. Los niveles de MDA disminuyeron un 18 % ±0.9 % en ojos tratados con RdCVFL en comparación con ojos sin tratar.

Inyección intravítrea de la nueva variante viral 7m8.

Los presentes inventores caracterizaron el tropismo vírico y el patrón de expresión de la nueva variante vírica 7m8 en ratones WT y *rd10* después de la inyección intravítrea en el día 15 postnatal (P15). El 7m8 es una variante de AAV2 desarrollada para transducir la retina externa después de la inyección intravítrea (20). Fundamentalmente, esta variante transduce fotorreceptores sin inyección subretiniana, la cual se ha observado que causa respuesta a lesiones y liberación de factores tróficos (22). Las inyecciones intravítreas de un vector 7m8 autocomplementario que codifica GFP en P15 dieron como resultado una fuerte expresión durante una semana después de la inyección, la cual fue también claramente visible en imágenes de fondo en P45. Las retinas montadas en plano mostraron que gran número de fotorreceptores se han transducido mediante 7m8. La imagen confocal de secciones transversales de retina reveló que la expresión de GFP en células que yacen en la capa de células ganglionares (GCL; del inglés, ganglion cell layer), capa nuclear interna (INL; del inglés, inner nuclear layer) y capa nuclear externa (ONL; del inglés, outer nuclear layer) en ratones WT y *rd10*.

El nivel de expresión de RdCVF después de la inyección de 7m8 se evaluó mediante la reacción en cadena de la

polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Se cuantificaron los niveles de ARNm en ratones *rd10* en P45 inyectados con los vectores víricos que codifican RdCVF, RdCVFL o GFP. Como cabía esperar, los niveles de ARNm de RdCVF se redujeron en ratones *rd10* inyectados con GFP en comparación con WT (4 % \pm 1 % WT). La inyección intraocular de 7m8-scCAG-RdCVF o 7m8-scCAG-RdCVFL en P14 dio como resultado niveles más elevados de ARNm de RdCVF. Los niveles fueron WT 127 % \pm 35 % en animales inyectados con 7m8-scCAG-RdCVF y WT 91 % \pm 10 % en animales inyectados con 7m8-scCAG-RdCVFL. Los niveles de rodopsina fueron uniformemente bajos en todas las retinas medidas (RdCVF = WT 3 % \pm 1 %; RdCVFL = WT 1 % \pm 1 %; PBS WT 1 % \pm 1 %). Los datos se representan como la media \pm SD (desviación estándar) con un n=5 animales para cada condición.

10 *Efectos de la expresión de RdCVF y RdCVFL en la estructura y función de los conos.*

Los presentes investigadores a continuación examinaron el efecto de la inyección intraocular de 7m8 que codifica para RdCVF y RdCVFL sobre el rescate de conos en ratones *rd10* criados en oscuridad. La inyección de 7m8-scCAG-RdCVFL en P14 dio como resultado un incremento pequeño estadísticamente no significativo en la amplitud de la onda b del ERG fotópico (74 \pm 4,8 μ V) en comparación con los ojos inyectados con PBS (65 \pm 5 μ V) o GFP (69 \pm 7,3 μ V). La inyección de 7m8-scCAG-RdCVF incrementó significativamente la amplitud de la onda b del ERG fotópico (89 \pm 7,9 μ V, p<0,05) en comparación con los ojos inyectados con GFP o PBS. La inyección simultánea de 7m8-scCAG-RdCVF y 7m8-scCAG-RdCVFL dio como resultado un rescate mayor del ERG fotópico, que fue un 53 % más elevado que de ojos no tratados (99,75 \pm 5,7 μ V, p<0,01) y fue un 17 % más elevado que de RdCVF solo (p<0.05). En todos los animales, se inyectó un ojo con 7m8-scCAG-GFP o PBS como un control interno.

Marcaje de conos en ojos inyectados con 7m8-scCAG-RdCVF.

Se utilizaron anticuerpos anti-S y anti-M/I-opsina para marcar poblaciones de conos en ojos inyectados con 7m8-scCAG-RdCVF o 7m8-scCAG-GFP y se crearon mosaicos de imágenes de alta resolución 40x. El marcaje reveló un incremento del número de conos, más notoriamente en las áreas centrales de la retina, cerca de la cabeza del nervio óptico. La cuantificación automatizada de conos marcados a través de la retina entera reveló un incremento en la expresión de S- y M/I-opsina de conos en ojos que expresan 7m8-scCAG-RdCVF (conos de S: 1644 \pm 436 p<0,05, conos de M/I: 2205 \pm 264, p<0,05) en comparación con ojos contralaterales inyectados con 7m8-scCAG-GFP (conos de S: 1254 \pm 326, conos de M/I 1112 \pm 419).

Efectos de la expresión de RdCVF y RdCVFL en el ratón P23H.

Se utilizó 7m8 a continuación para administrar RdCVF o RdCVFL en el ratón P23H homocigoto o herocigoto, un modelo de retinitis pigmentosa recesiva. La cuantificación de las grabaciones de ERG mostraron que la inyección de 7m8-scCAG-RdCVF dio como resultado un incremento de la amplitud del ERG fotópico en comparación con ratones P23H/P23H homocigotos inyectados con PBS (RdCVF: 39 \pm 15,7 μ V, PBS: 19 \pm 11,3 μ V, n=6, P<0,01). En ratones heterocigotos P23H/+, la inyección de 7m8-scCAG-RdCVF dio como resultado un incremento en la amplitud de las grabaciones de ERG fotópico hasta 4 meses después del tratamiento, en comparación con ojos control, contralaterales tratados con GFP. (Un mes tras la inyección, RdCVF: 175 \pm 21,4 μ V frente a PBS: 107 \pm 17,2 μ V, 4 meses tras la inyección, RdCVF: 71,5 \pm 18 μ V frente a PBS: 45 \pm 15,6 μ V, 6 meses tras la inyección de RdCVF: 23.8 \pm 14,9 μ V frente a PBS: 18 \pm 10,4 μ V.). En cambio, el tratamiento con RdCVFL no dio como resultado ningún cambio significativo en la amplitud de las grabaciones de ERG fotópicos en ninguno de los puntos temporales medidos. Un mes tras la inyección, RdCVFL: 135 \pm 47,3 μ V frente a PBS: 120.25 \pm 53.7 μ V, 4 meses tras la inyección, RdCVFL: 72 \pm 38 μ V frente a PBS: 72,8 \pm 45,2 μ V, 6 meses tras la inyección de RdCVFL: 47,2 \pm 55,8 μ V frente a PBS: 31 \pm 32 μ V)

Conclusión

Los inventores han demostrado la eficacia de los vectores AAV como una estrategia de administración para RdCVF y muestran que la expresión de RdCVF resulta un enfoque prometedor para demorar la pérdida de conos en pacientes con distrofia de conos y bastones.

Estos resultados demuestran, por primera vez, el rescate de fotorreceptores funcionales en la retina utilizando la administración de AAV a través de inyección intravascular.

De forma similar a la administración sistémica de AAV92YF, las inyecciones intraoculares de 7m8 que codifican RdCVF rescataron la función de los conos y prolongan la supervivencia de los conos. Finalmente, los efectos de rescate observados después de la administración intravítrea de 7m8-scCAG-RdCVF se acentuaron mediante la administración simultánea de 7m8-scCAG-RdCVFL, sugiriendo el potencial para una estrategia de terapia génica de coexpresión aprovechando las actividades sinérgicas de RdCVF y RdCVFL.

En suma, estos experimentos sustentan el papel de *Nxn1* como un gen bifuncional que codifica dos isoformas de RdCVF con diferentes actividades en la retina. RdCVF se muestra aquí como apoyo de la supervivencia de los conos, mientras que RdCVFL tiene poco efecto directo sobre los conos, pero protege la función de los bastones a través de la actividad de tioloxidorreductasa.

Ejemplo 2: la combinación de RdCVF y RdCVFL da como resultado un efecto sinérgico

Los siguientes constructos se han producido e introducido en un vector AAV2.

- 5 El plásmido proviral p618 y sus elementos se describen en la Solicitud de Patente Internacional publicada como el documento WO2012158757A1 y en la publicación (33).

2xRdCVF: plásmido p857 y AAV CT-39

- 10 El P857/CT39 se diseñó para incrementar el nivel de expresión de RdCVF en comparación con CT-37 (RdCVF-stuffer (de relleno)) para conseguir suficiente protección de conos en pacientes que sufren de retinitis pigmentosa (RP).

RdCVF-RdCVFL: plásmido p853 y AAV CT-35

- 15 Este vector es capaz de coexpresar las isoformas corta y larga de RdCVF.

Estos vectores se utilizaron para expresar de forma exitosa las proteínas RdCVF y/o RdCVFL en células del epitelio pigmentado de la retina (EPR). Los efectos protectores de estos cultivos se evaluaron en cultivos de conos enriquecidos de embriones de pollos y resultaron altamente satisfactorios.

- 20 Los constructos también se sometieron a prueba respecto al su efecto protector sobre los conos del ratón *rd1* después de la inyección subretiniana. Se observó un incremento significativo en la densidad de los conos (véase la figura 3).

- 25 En conclusión, los inventores han mostrado que la combinación de isoformas cortas y largas del gen *NXNL1*, RdCVF y RdCVFL, en un solo vector de expresión proporciona un efecto sinérgico en el aumento de la viabilidad de los conos *in situ* en la retina.

Según la presente invención, la combinación es útil para tratar y/o prevenir la degeneración de los conos y otra degeneración neuronal.

- 30 **Ejemplo 3: La expresión de RdCVFL en fotorreceptores de conos protege a los fotorreceptores de conos contra el estrés oxidativo.**

El ejemplo 3 se corresponde con los datos experimentales publicados por los inventores en la publicación siguiente:

- 35 Mei et al., Antioxid Redox Signal. 12 de mayo de 2016. [Publicación electrónica previa a la impresión]
La tioredoxina codificada por el gen del factor de viabilidad de conos derivados de bastones protege los fotorreceptores de los conos contra el estrés oxidativo.
(34 en la lista de referencias de más adelante, incorporado mediante referencia)

- 40 En este ejemplo, los inventores han encontrado que los conos expresan solo uno de los dos productos del gen *Nxn1*, la tioredoxina RdCVFL. La administración de RdCVFL al ratón que porta una delección del gen *Nxn1* en los conos reduce el daño producido por estrés oxidativo. Silenciando la expresión de RdCVFL en cultivo enriquecido de conos se reduce la viabilidad celular, mostrando que el RdCVFL es un mecanismo autónomo celular de protección.

- 45 **Ejemplo 4: La inyección de AAV2-(RdCVF-RdCVFL) previene la pérdida de agudeza visual del ratón *rd10*, un modelo recesivo de retinitis pigmentosa.**

Métodos

- 50 *Animales*

Los ratones C57B1/6N y *rd10* se obtuvieron de los laboratorios Charles River laboratories y The Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME), respectivamente y se criaron en un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad. Todos los experimentos se llevaron a cabo según la declaración de ARVO para el uso de animales en la investigación oftálmica y de la visión y las directrices de la Oficina de Cuidado de Animales de Laboratorio de la Universidad de California, Berkeley, California.

Producción de vectores víricos

- 60 Los vectores de AAV portadores de ADNc que codifican RdCVF humano, RdCVFL o eGFP de produjeron mediante el método de cotransfección. Se purificó AAV recombinante mediante ultracentrifugación en gradiente de iodixanol y cromatografía en columna de heparina (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido). El eluyente vírico se intercambió de tampón y se concentró con Ultra-15 Centrifugal Filter Units de Amicon en PBS y se valoró mediante PCR cuantitativa en referencia a una recta de calibrado.

- 65 *Inyecciones intravítreas*

Se anestesió a los ratones con ketamina (72 mg/kg) y xilacina (64 mg/kg) mediante inyección intraperitoneal. La mitad de una aguja desechable de 30 se pasó a través de la esclerótica, en el ecuador y posterior del limbo, en la cavidad vítrea. Un total de 5×10^{10} partículas resistentes a ADNasa en 1 μ l de volumen se inyectaron posteriormente en la cavidad vítrea con observación directa de la aguja directamente sobre la cabeza del nervio óptico. Los ojos de control contralaterales recibieron vectores que portan el gen que codifica GFP o PBS.

Respuesta optomotora

Se midieron las agudezas visuales de ojos tratados y sin tratar utilizando una optometría de Cerebral Mechanics Inc. Canadá y OptoMotryTM, 1.77 system, mediante la observación de respuestas optomotoras de ratones al rotar rejillas sinusoidales. Brevemente, los ratones responden instintivamente a las rejillas de rotación vertical moviendo su cabeza en la dirección de rotación de la rejilla. El protocolo utilizado produce mediciones independientes de las agudezas de los ojos derecho e izquierdo basándose en las sensibilidades desiguales de los dos ojos respecto al patrón de rotación: los ojos derecho e izquierdo son más sensibles al giro en sentido antihorario y horario, respectivamente. Se utilizó un procedimiento de doble ciego, en el que al observador se le "enmascaró" tanto la dirección como el patrón de rotación, qué ojo recibió el tratamiento y qué ojo recibió AAV-RdCVF o AAV2-RdCVF-RdCVFL y AAV2-GFP. Brevemente, se situó a cada ratón en un pedestal localizado en el dentro de cuatro pantallas LCD de monitores de ordenadores mirando hacia dentro y se observó mediante una cámara de vídeo de infrarrojos con una fuente de luz infrarroja sobre la cabeza. Una vez que el ratón se acostumbró al pedestal se inició una prueba de 7 segundos mediante la presentación al ratón de un patrón rayado sinusoidal que rota en sentido horario o antihorario, según el software OptoMotryTM determinó aleatoriamente. Las respuestas de reflejo involuntario de seguimiento de la cabeza se impulsan por los ojos izquierdo (rotaciones en sentido horario) y derecho (rotaciones en sentido antihorario), respectivamente. El contraste de sensibilidad se midió en una frecuencia espacial de 0,042 ciclos/grado y a una velocidad de rotación de 0,5 Hz. Para calcular la agudeza visual, las rejillas tienen un contraste constante del 100 % y el estímulo inicial fue un 0,042 ciclos/grado. Utilizando un paradigma de escalera, el programa converge en mediciones de las agudezas o sensibilidad de contraste de ambos ojos definidas como la frecuencia espacial o el % de contraste que produce ≥ 70 % de las respuestas correctas del observador. Se definió la agudeza como la frecuencia espacial más elevada que produce una respuesta umbral. De forma similar, el contraste de sensibilidad se definió como 100 dividido por el porcentaje de contraste más bajo que produce una respuesta umbral. Si bien este protocolo permite la separación de las sensibilidades del ojo derecho e izquierdo, el ojo contralateral no está 'ciego' al estímulo.

Resultados: La inyección subretiniana de AAV2-RdCVF-RdCVFL previene la pérdida de agudeza visual más ampliamente que AAV2-RdCVF.

Los presentes inventores compararon la acción de un AAV2 que expresa RdCVF (CT37) respecto a otro que expresa tanto RdCVF como RdCVFL (CT35). La medición de la agudeza visual del ratón rd10 utilizando nistagmo optocinético demuestra que la combinación de RdCVF + RdCVFL (Fig. 4A) tiene un efecto protector más pronunciado que RdCVF (Fig. 4B). Cuando se trasladó a la pérdida de visión central en pacientes que sufren de retinitis pigmentosa, la demora en la pérdida de agudeza visual de RdCVF+ RdCVFL se corresponde con 44 años de prevención de ceguera.

REFERENCIAS

A lo largo de la presente solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica al que pertenece esta invención.

1. Buch, H. et al. Prevalence and causes of visual impairment and blindness among 9980 Scandinavian adults: the Copenhagen City Eye Study. *Ophthalmology*. 2004; 111(1): 53-61.
2. Bramall, A.N., Wright, A.F., Jacobson, S.G., McInnes, R.R. The genomic, biochemical, and cellular responses of the retina in inherited photoreceptor degenerations and prospects for the treatment of these disorders. *Annu Rev Neurosci*. 2010; 33(1): 441-472.
3. Punzo, C., Kornacker, K., Cepko, C.L. Stimulation of the insulin/mTOR pathway delays cone death in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Nat Neurosci*. 2009; 12(1): 44-52.
4. Léveillard T et al. Identification and characterization of rod-derived cone viability factor. *Nat Genet*. 2004; 36(7): 755-759.
5. Mohand-Said S et al. Normal retina releases a diffusible factor stimulating cone survival in the retinal degeneration mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(14): 8357-8362.
6. Mohand-Said S et al. Photoreceptor transplants increase host cone survival in the retinal degeneration (rd) mouse. *Ophthalmic Res*. 1997; 29(5): 290-297.
7. Mohand-Said, S., Hicks, D., Dreyfus, H., Sahel, J.-A. Selective transplantation of rods delays cone loss in a

retinitis pigmentosa model. Arch Ophthalmol. 2000; 118(6): 807-811.

8. Wang, X.W., Tan, B.Z., Sun, M., Ho, B., Ding, J.L. Thioredoxin-like 6 protects retinal cell line from photooxidative damage by upregulating NF-kappaB activity. Free Radic Biol Med. 2008; 45(3): 336-344.

5 9. Yang, Y. et al. Functional Cone Rescue by RdCVF Protein in a Dominant Model of Retinitis Pigmentosa. Mol Ther. 2009; 17(5): 787-795.

10 10. Cronin, T. et al. The disruption of the rod-derived cone viability gene leads to photoreceptor dysfunction and susceptibility to oxidative stress. Cell Death Differ. 2010; 17(7): 1199-1210.

11. Brennan, L.A., Lee, W., Kantorow, M. TXNL6 is a novel oxidative stress-induced reducing system for methionine sulfoxide reductase a repair of α -crystallin and cytochrome C in the eye lens. PLoS ONE. [publicado en línea antes de impreso: 2010]; doi:10.1371/journal.pone.0015421.g008

15 12. Funato, Y., Miki, H. Nucleoredoxin, a Novel Thioredoxin Family Member Involved in Cell Growth and Differentiation. Antioxid Redox Signal. 2007; 9(8): 1035-1058.

13. Lillig, C.H., Holmgren, A. Thioredoxin and Related Molecules-From Biology to Health and Disease. Antioxid Redox Signal. 2007; 9(1): 25-47.

20 14. Barhoum, R. et al. Functional and structural modifications during retinal degeneration in the rd10 mouse. Neuroscience. 2008; 155(3): 698-713.

25 15. Phillips, M.J., Otteson, D.C., Sherry, D.M. Progression of neuronal and synaptic remodeling in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa. J Comp Neurol. 2010; 518(11): 2071-2089.

16. Gargini, C. et al. Retinal organization in the retinal degeneration 10 (rd10) mutant mouse: A morphological and ERG study. J Comp Neurol. 2006; 500(2): 222-238.

30 17. Pang, J.J. et al. AAV-mediated gene therapy for retinal degeneration in the rd10 mouse containing a recessive PDEbeta mutation. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2008; 49(10): 4278-4283.

18. Pang, J.J. et al. Long-term retinal function and structure rescue using capsid mutant AAV8 vector in the rd10 mouse, a model of recessive retinitis pigmentosa. Mol Ther. 2011; 19(2): 234-242.

35 19. Komeima, K., Rogers, B.S., Campochiaro, P.A. Antioxidants slow photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. J Cell Physiol. 2007; 213(3): 809-815.

40 20. Dalkara, D. et al. *In vivo*-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. Science Translational Medicine. 2013; 5(189): 189ra76.

21. Dalkara, D. et al. Enhanced gene delivery to the neonatal retina through systemic administration of tyrosine-mutated AAV9. Gene Ther. 2012; 19(2): 176-181.

45 22. Cao, W., Wen, R., Li, F., Lavail, M.M., Steinberg, R.H. Mechanical injury increases bFGF and CNTF mRNA expression in the mouse retina. Experimental Eye Research. 1997; 65(2): 241-248.

23. Hollander den Al, Black, A., Bennett, J., Cremers, F.P.M. Lighting a candle in the dark: advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies. J Clin Invest. 2010; 120(9): 3042-3053.

50 24. Maguire, A.M. et al. Safety and Efficacy of Gene Transfer for Leber's Congenital Amaurosis. N Engl J Med. 2008; 358(21): 2240-2248.

55 25. Cideciyan, A.V. et al. Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008; 105(39): 15112-15117.

26. Bainbridge, J.W.B. et al. Effect of Gene Therapy on Visual Function in Leber's Congenital Amaurosis. N Engl J Med. 2008; 358(21): 2231-2239.

60 27. Fridlich, R. et al. The Thioredoxin-like Protein Rod-derived Cone Viability Factor (RdCVFL) Interacts with TAU and Inhibits Its Phosphorylation in the Retina. Molecular & Cellular Proteomics. 2009; 8(6): 1206-1218.

28. Mingozzi, F. et al. CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. Nat Med. 2007; 13(4): 419-422.

65

29. Manno, C.S. et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med.* 2006; 12(3): 342-347.
- 5 30. Jacobson, S.G. et al. Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. *Arch Ophthalmol.* 2012; 130(1): 9-24.
31. Grieger, J.C., Choi, V.W., Samulski, R.J. Production and characterization of adeno-associated viral vectors. *Nat Protoc.* 2006; 1(3): 1412-1428.
- 10 32. Byrne, L.C., Dalkara, D., Luna, G., Fisher, S.K., Clerin, E., Sahel, J.A., Léveillard, T., Flannery, J.G. Viral-mediated RdCVF and RdCVFL expression protects cone and rod photoreceptors in retinal degeneration. *J Clin Invest.* 2015; 125(1): 105-16.
- 15 33. Vasireddy, V., Mills, J.A., Gaddameedi, R., Basner-Tschakarjan, E., Kohnke, M., Black, A.H., Alexandrov, K., Maguire, A.M., Chung, D.C., Mac, H., Sullivan, L., Gadue, P., Bennicelli, J.L., French, D.L. y Bennett, J. AAV-mediated gene therapy for choroideremia: Preclinical studies in personalized models. *PLoS ONE* 01/2013; 8(5): e61396.
- 20 34. Mei X., Chaffiol, A., Kole, C., Yang Y., Millet-Puel G., Clerin E., Ait-Ali N., Bennett, J., Dalkara D., Sahel, J.A., Duebel, J., Léveillard T., The thioredoxin encoded by the Rod-derived Cone Viability Factor gene protects cone photoreceptors against oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 12 de mayo de 2016. [Publicación electrónica previa a la impresión].

LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> INSERM
- <120> Combinación sinérgica de factores de viabilidad neuronal y usos de los mismos
- 30 <130> BI015085 LEVEILLARD
- <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.5
- 35 <210> 1
- <211> 109
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- 40 <400> 1

ES 2 792 905 T3

Met Ala Ser Leu Phe Ser Gly Arg Ile Leu Ile Arg Asn Asn Ser Asp
1 5 10 15

Gln Asp Glu Leu Asp Thr Glu Ala Glu Val Ser Arg Arg Leu Glu Asn
20 25 30

Arg Leu Val Leu Leu Phe Phe Gly Ala Gly Ala Cys Pro Gln Cys Gln
35 40 45

Ala Phe Val Pro Ile Leu Lys Asp Phe Phe Val Arg Leu Thr Asp Glu
50 55 60

Phe Tyr Val Leu Arg Ala Ala Gln Leu Ala Leu Val Tyr Val Ser Gln
65 70 75 80

Asp Ser Thr Glu Glu Gln Gln Asp Leu Phe Leu Lys Asp Met Pro Lys
85 90 95

Lys Trp Leu Phe Leu Pro Phe Glu Asp Asp Leu Arg Arg
100 105

5

<210> 2
<211> 212
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 792 905 T3

Met Ala Ser Leu Phe Ser Gly Arg Ile Leu Ile Arg Asn Asn Ser Asp
1 5 10 15

Gln Asp Glu Leu Asp Thr Glu Ala Glu Val Ser Arg Arg Leu Glu Asn
20 25 30

Arg Leu Val Leu Leu Phe Phe Gly Ala Gly Ala Cys Pro Gln Cys Gln
35 40 45

Ala Phe Val Pro Ile Leu Lys Asp Phe Phe Val Arg Leu Thr Asp Glu
50 55 60

Phe Tyr Val Leu Arg Ala Ala Gln Leu Ala Leu Val Tyr Val Ser Gln
65 70 75 80

Asp Ser Thr Glu Glu Gln Gln Asp Leu Phe Leu Lys Asp Met Pro Lys
85 90 95

Lys Trp Leu Phe Leu Pro Phe Glu Asp Asp Leu Arg Arg Asp Leu Gly
100 105 110

Arg Gln Phe Ser Val Glu Arg Leu Pro Ala Val Val Val Leu Lys Pro
115 120 125

Asp Gly Asp Val Leu Thr Arg Asp Gly Ala Asp Glu Ile Gln Arg Leu
130 135 140

Gly Thr Ala Cys Phe Ala Asn Trp Gln Glu Ala Ala Glu Val Leu Asp
145 150 155 160

Arg Asn Phe Gln Leu Pro Glu Asp Leu Glu Asp Gln Glu Pro Arg Ser
165 170 175

Leu Thr Glu Cys Leu Arg Arg His Lys Tyr Arg Val Glu Lys Ala Ala
180 185 190

Arg Gly Gly Arg Asp Pro Gly Gly Gly Gly Gly Glu Glu Gly Gly Ala
195 200 205

Gly Gly Leu Phe
210

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector de expresión que comprende un primer ácido nucleico que codifica una isoforma corta del gen *NXNL1*, factor de viabilidad de conos derivados de bastones (RdCVF) y un segundo ácido nucleico que codifica una isoforma larga del gen *NXNL1*, RdCVFL.
2. Un vector de expresión según la reivindicación 1, en el que dicho vector de expresión es un virus.
- 10 3. Un vector de expresión según la reivindicación 2 en el que dicho virus es un virus adenoasociado (AAV).
4. Un vector de expresión según la reivindicación 3 en el que dicho AAV se selecciona del grupo que consiste en AAV2, AAV9 y AAV7m8.
- 15 5. Un vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que dicha isoforma corta de RdCVF es la isoforma corta del RdCVF humano y en el que dicha isoforma larga es la isoforma larga del RdCVFL humano.
6. Un vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para utilizar en un método para tratar una enfermedad degenerativa de la retina.
- 20 7. Un vector de expresión para utilizar según la reivindicación 6 en el que dicha enfermedad degenerativa de la retina es la retinitis pigmentosa.
8. Un vector de expresión para utilizar según la reivindicación 6 o 7, en el que dicho vector de expresión es para administrar mediante inyección subretiniana o mediante inyección intravítrea.
- 25 9. Un vector de expresión para utilizar según la reivindicación 6 o 7, en el que dicho vector de expresión es para administrar mediante inyección intravenosa.

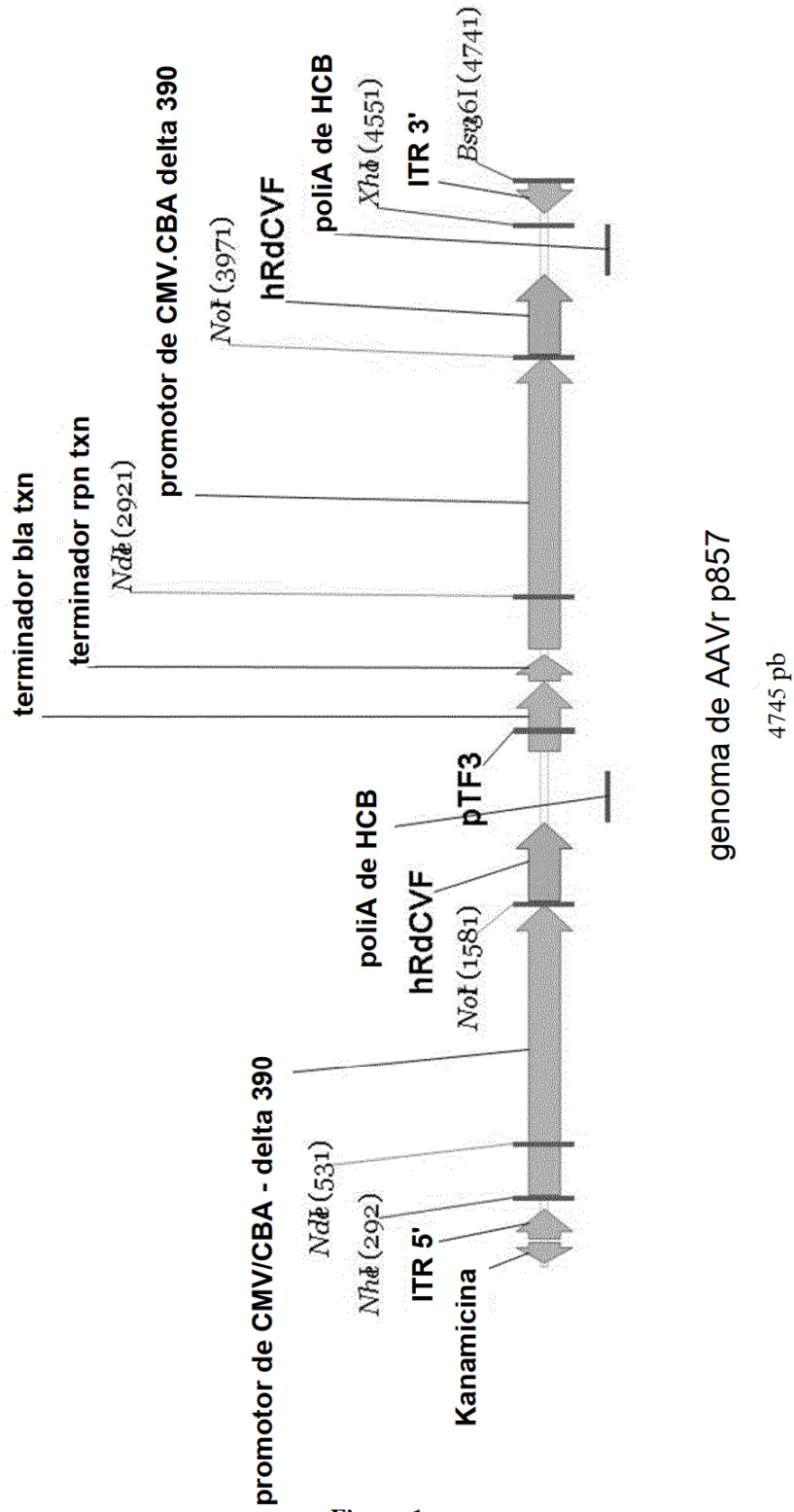


Figura 1

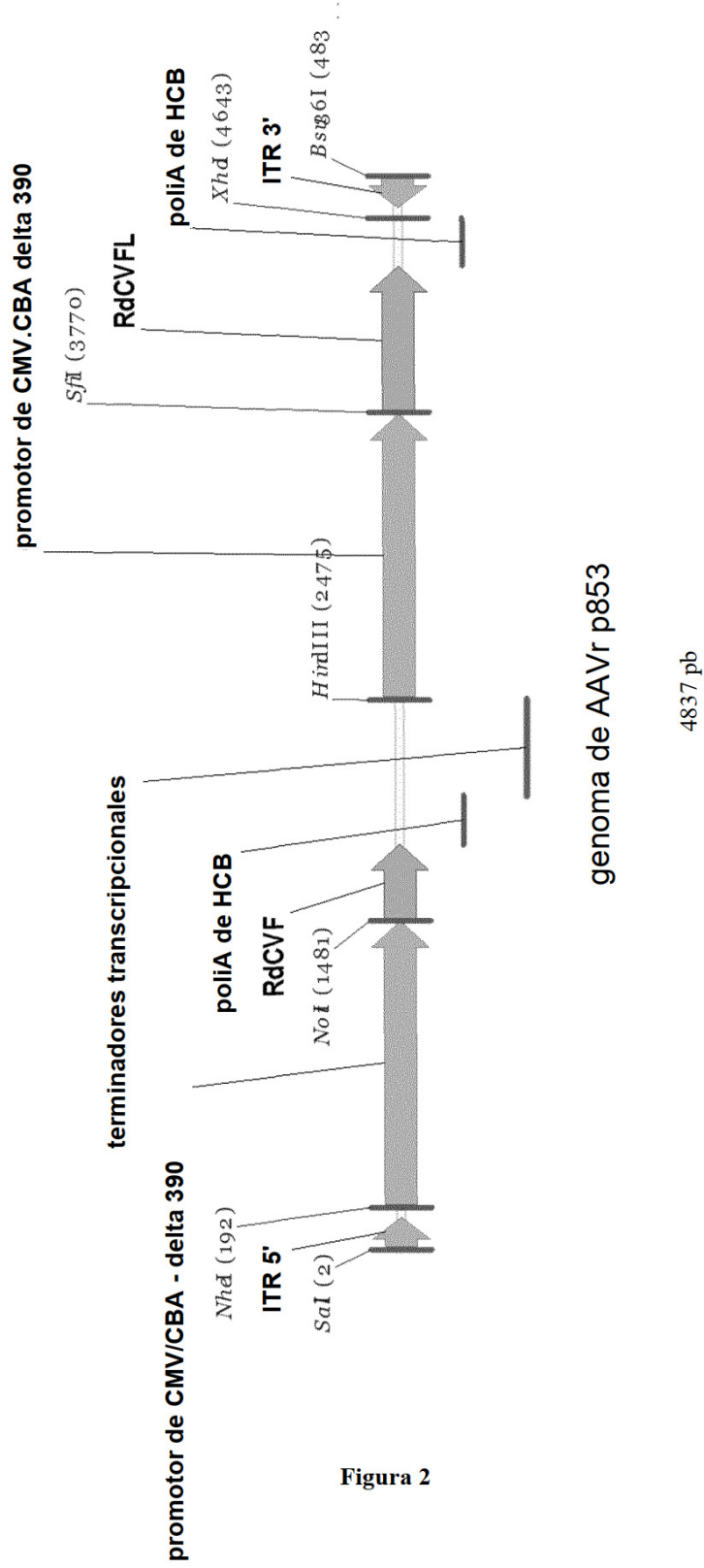


Figura 2

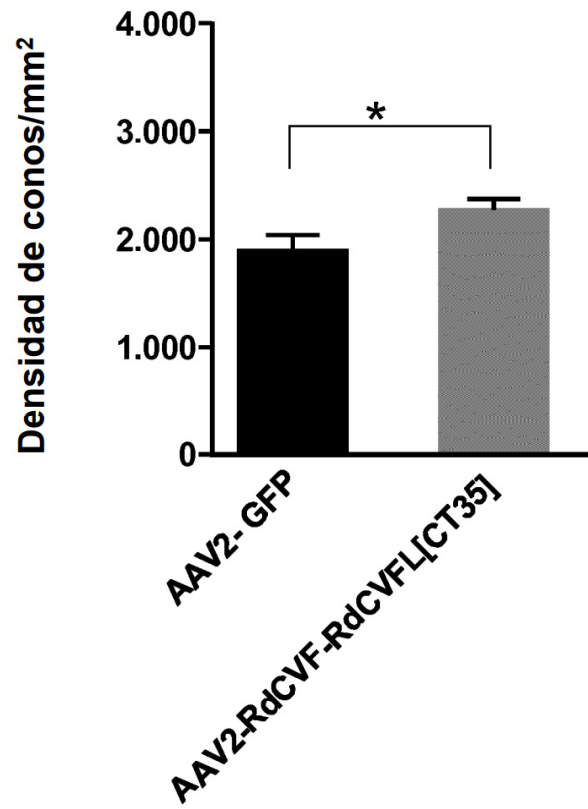


Figura 3

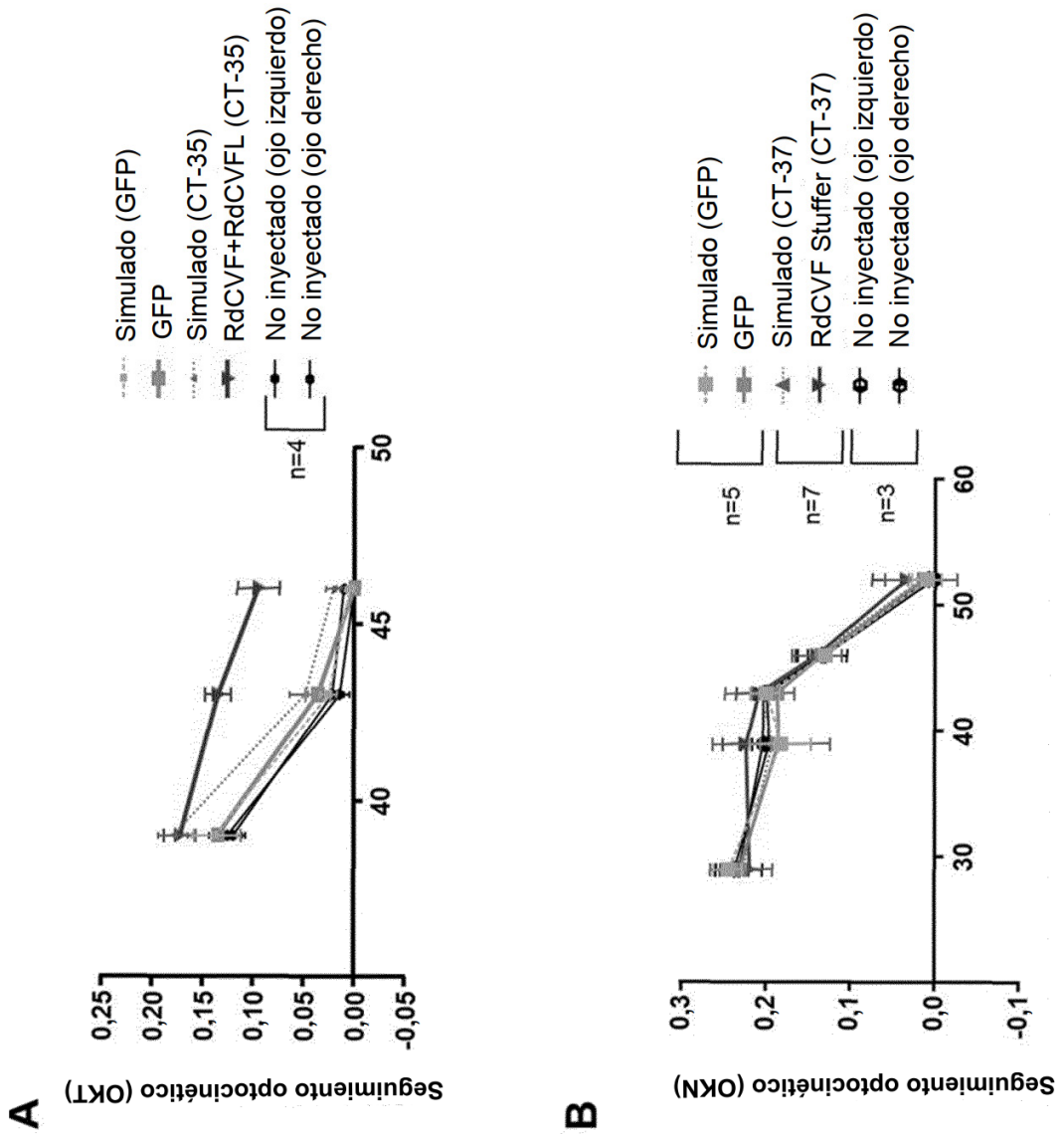


Figura 4