



Universitat Autònoma de Barcelona

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA BIOLOGIA MOLECULAR I BIOMEDICINA

FACULTAT DE VETERINÀRIA

CENTRE DE BIOTECNOLOGIA ANIMAL I TERÀPIA GÈNICA

**DESENVOLUPAMENT D'UNA ESTRATÈGIA
DE TERÀPIA GÈNICA PEL TRACTAMENT
DE LA PATOLOGIA NEUROLÒGICA I
SOMÀTICA DE LA MPSIIIA**

SARA MARCÓ COSTA

Aquesta tesi s'ha realitzat sota la direcció de la Dra. Fàtima Bosch i Tubert i la Dra. Virginia Haurigot al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Veterinària i al Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG)

FÀTIMA BOSCH I TUBERT

VIRGINIA HAURIGOT

SARA MARCÓ COSTA

JUNY 2014

BELLATERRA

En primer lloc, vull donar les gràcies a la Dra. Fàtima Bosch per haver-me donat la oportunitat de realitzar la tesi doctoral en el teu grup d'investigació. Gràcies per la teva energia, vitalitat i entusiasme que has dedicat en aquest projecte tan engrescador.

Moltes gràcies a en Jordi, la Mercè i la Sofia, la seva empenta inicial ens ha catapultat cap al gran projecte que tenim entre mans. Gràcies per la confiança dipositada en nosaltres. La vostra lluita diària ens ajuda a tirar endavant.

Vicky, Virginia, codirectora d'aquesta tesi doctoral, gràcies per la companyia en aquest llarg viatge que vam iniciar fa uns anys i ara acabarem juntes. M'has transmès la passió per la ciència, l'esforç i el treball constant. Tot és possible al teu costat.

Miquel *Calb* has estat un suport constant i incondicional tant científicament com emocionalment. El teu ingeni intel·lectual i humor excel·lent han marcat la meva experiència al CBATEG, sense tu no hagués estat el mateix.

Vull donar les gràcies a tots els companys de laboratori que m'han ajudat a la realització d'aquest treball. Gràcies pels moments que hem compartit durant tots aquests anys, i per l'experiència inoblidable que he viscut al vostre costat. Sou la canya!

Els meus inicis amb en Ruzo van ser caòtics i divertits, gràcies per la teva dedicació que ha sembrat la llavor d'aquesta tesi. Albert, Ribera, Ribí... han estat moltes hores d'estabulari, laboratori i gosseres, com també moltes d'altres de gresca i xerinola. Gràcies per la teva ajuda constant, junts hem aconseguit tirar el projecte endavant. Pilar i Sandra, les nenes *simpàtiques* d'ulls, sou unes cracks! Sempre a punt per deixar-ho tot i donar un cop de mà. Us agraeixo molt l'ajuda i suport rebut, i per acollir-me sempre que ho he necessitat. Xavi, Maria i Carles gràcies per les xerrades que hem tingut, m'han fet créixer com a persona. Gràcies Edu i Fede per les fructíferes discussions científiques sobre aquest projecte. I finalment, gràcies a la resta de companys MPS com en Sergio, en Miquel Calero, en Cristian, en Luca i en Víctor.

Gràcies a les *tesinandes* Cristina, Meritxell i Tami, per ser amb mi als inicis d'aquesta experiència i, en especial a la Tami, per ser al meu costat en tot moment.

També vull donar les gràcies a la resta de companys diabètics del laboratori com la Estefanía, la Clàudia, la Vero, la Marisa, l'Alba, la Laia, la Ivet, la Sylvie, la Tura, en

Víctor i en Jordi. Com també als que hi van ser, i han marxat: l'Anguela, la Mercè, en Ricardo, l'Iris, en Calle...

Moltes gràcies a tot l'equip tècnic. Marta, gràcies per tots els centenars de milers de blocs i immunos que m'has preparat incansablement. Jenny i Lidia, gràcies per les mil solucions. Heu estat, sou i sereu les més rialleres del CBATEG! Mola mil!

Gràcies al Dr. Jesús Rubert i a tot el seu equip. En especial, a la Vero i l'Angel per totes les reixetes de microscòpia electrònica elaborades, com també a en David Ramos per les hores de confocal dedicades.

Gràcies a tots els veterinaris que han col·laborat en el projecte de gossos d'aquesta tesi doctoral. A la Sònia Añor, moltes gràcies per totes les intervencions quirúrgiques. A l'equip d'anestèsia, format per l'Ana Andaluz i en Xavi Moll, gràcies per cuidar els gossos durant tots els procediments.

Moltíssimes gràcies al Dr. Martí Pumarola i al seu equip tècnic per l'ajuda i coneixement científic compartit. Gràcies per les hores dedicades que m'han ajudat a comprendre una mica més l'inexplorable món del SNC.

Gràcies a la Mercè Pineda i a la Gemma Garcia Fructuoso per col·laborar molt amablement en la realització d'aquest treball.

També, gràcies a tot l'equip del servei d'estabulari SER-CBATEG: Pedro, Mireia, Marta, Carles, Pere, Edurne, entre d'altres. Gràcies per entendre i permetre'm les organitzacions i desorganitzacions d'última hora. Gràcies al servei de la UAT, amb l'Anna Pujol al capdavant. Gràcies a la Rosmi i la Montse Bellido pel seu suport en tots els tràmits administratius, a en Carles Ros i al seu equip de manteniment, al SLIPI, i als companys de seguretat i neteja (en aquest punt, vull fer un agraïment molt especial a la Montse per la seva simpatia i alegria matinal).

Gràcies als meus amics saltencs i saltenques, del cau i del no-cau. A tots aquells que són o han estat del cau els vull agrair els millors moments d'esbarjo que hem compartit junts. Créixer amb vosaltres ha estat un plaer. En especial, a la meva colla i a les nostres xerrades sobre política, "*ètica i moral*", o fins i tot, a les converses més banals, gràcies a vosaltres per ser com sou: Núria, Marta, Pau, Mar, Roser, Jepa, Marta S., i també

Albertain. I als més esporàdics, també us vull donar les gràcies per les hores que ens han fet parlar i explicar-nos-ho tot, Marc i Camp, no deixeu mai de trobar-me a faltar.

Sobretot, vull donar moltíssimes gràcies a la meva família, pel vostre inestimable suport que m'ha permès superar els moments més difícils d'aquest llarg viatge. Des dels meus inicis fins al final d'aquesta etapa, no heu deixat mai de confiar en mi. Moltes gràcies a tots! Papes, sempre hi sou i mai m'heu fallat. Judit, sempre a punt amb un somriure, hippieflower! Iaies, avis, Lluís i Nuri, simplement gràcies. També vull donar les gràcies a la família Bonet Carbó. I per últim, i no menys important, a en Peri.

Després de tot aquest reguitzell d'agraïments, vull donar gràcies a la persona més especial de la meua vida, l'Enric. Estic molt agraïda per tots aquests anys al meu costat. La muntanya russa que hem viscut junts ens ha portat a indrets i experiències inimaginables, gràcies per ser-hi constantment. Ets el meu amor.

Aquesta tesi ha estat possible, en primer lloc, gràcies a una beca predoctoral FI finançada per la Generalitat de Catalunya, de la qual n'he estat beneficiària durant tres anys. Les investigacions s'han realitzat també gràcies al finançament rebut del Ministerio de Educación y Ciencia, Plan Nacional I+D+I (SAF2011-24698) i Infraestructura Científico-Tecnológica (UNAB10-4E-156); del Ministerio de Economía y Competitividad (INNPACTO, IPT-2012-0772-300000); de l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR), Generalitat de Catalunya (2009 SGR 224); de la Asociación de las Mucopolisacaridosis y Síndromes Relacionados (MPS ESPAÑA); i dels Laboratoris del Dr. Esteve S.A.

µg	Microgram
µl	Microlitre
µm	Micròmetre
µM	Micromolar
4-MU	4-metilumbeliferona
aa	Aminoàcid
AAV	Vector adenoassociat o <i>adenoassociated vector</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfat o <i>Adenosine Triphosphate</i>
BHE	Barrera Hematoencefàlica
bp	Parells de base o <i>base pairs</i>
BSA	Albúmina de sèrum boví o <i>Bovine Serum Albumin</i>
BSI-B4	Isolectina B4
BSI-B4	Isolectina B4
CAG	Promotor híbrid format pel potenciador del citomegalovirus, el promotor de la β-actina i el primer intró del gen de la β-globina humana
CBATEG	Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica
CD4	Clúster de diferenciació 4
CD8	Clúster de diferenciació 8
cDNA	Àcid desoxiribonucleic complementari
cm	Centímetre
CMV	Citomegalovirus
cSgsh	Sulfamidasa canina
DA	Dosi Alta
DB	Dosi Baixa
DBS	Sang seca recollida en un paper o <i>Dried-Blood Spot</i>
dg	genoma diploide
DLFP	Leucòcits secs impregnats en un paper de filtre o <i>Dried Leukocytes impregnated in Filter Paper</i> .
DMB	Blau de dimetil metilè o <i>Dimethyl methylene Blue</i>
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DNase	Desoxiribunocleasa
dNTP	Desoxinucleòsid Trifosfat
dsDNA	DNA de doble cadena o <i>double strand DNA</i>
DUFP	Orina seca recollida en un paper de filtre o <i>Dried-Urine Filter Paper</i>
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	àcid etilè diamino tetraacètic
EE.UU.	Estats Units
EMA	Agència Europea del Medicament o <i>European Medicines Agency</i>
ERT	Teràpia de substitució enzimàtica o <i>Enzyme Replacement Therapy</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF-2	Factor de creixement de fibroblasts tipus 2 o <i>Fibroblast Growth-Factor 2</i>
FGly	Formilglicina o <i>FormilGlycine</i>
g	gram
G	Gauge
GAG	Glicosaminoglicà
GFAP	Proteïna àcida fibril·lar glial o <i>Glial Fibrillar Acidic Protein</i>
GFP	Proteïna verd fluorescent o <i>Green Fluorescent Protein</i>

GRIL-LC/MS	Cromatografia líquida/ Espectrometria de masses marcant isòtops reductors de glicans o <i>Glycan Reductive Isotope Labeling–Liquid Chromatography/Mass Spectrometry</i>
h	Hora
Hgsnat	Heparan- α -Glucosaminida N-Acetiltransferasa
HS	Heparan Sulfat
HSCT	Transplantament de cèl·lules mare hematopoètiques o <i>Hematopoietic Stem Cell Transplantation</i>
hSgsh	Sulfamidasa humana
IC	Intracisternal
ICV	Intracerebroventricular
IGFII	Factor de creixement similar a la insulina tipus II o <i>Insuline-like Growth Factor II</i>
IgG	Immunoglobulines G
ITR	Terminals invertits repetits o <i>Inverted Terminal Repeats</i>
Kb	Kilobase
KDa	KiloDalton
Kg	Kilogram
LAMP1	Proteïna lisosòmica associada a la membrana tipus 1 o <i>Lysosomal Associated-Membrane Protein 1</i>
LAMP2	Proteïna associada a la membrana lisosòmica tipus 2 o <i>Lysosomal Associated-Membrane Protein 2</i>
LCR	Líquid Cefaloraquidi
LIMP2	Proteïna lisosòmica integral de membrana tipus 2 o <i>Lysosomal Integral-Membrane Protein type 2</i>
LINCL	Lipofusinosi neuronal ceroide infantil tardana o <i>Late Infantil Neuronal Ceroid Lipofuscinosis</i>
LSD	Malaltia d'acumulació lisosòmica o <i>Lysosomal Storage disease</i>
M	Molar
M6P	Manosa-6-fosfat
MET	Microscòpia electrònica de transmissió
mg	Mil·ligram
min	Minut
ml	Mil·lilitre
mm	Mil·límetre
mM	Mil·limolar
mm³	Mil·límetre cúbic
MPS	Mucopolisacaridosi
mRNA	RNA missatger
mSgsh	Sulfamidasa murina
n	Número d'animals
NAbs	Anticossos neutralitzants o <i>Neutralizing Antibodies</i>
NeuN	Nucli neuronal o <i>Neuronal Nuclei</i>
ng	Nanogram
nm	Nanòmetre
nmol	Nanomol
NRE	Terminal no reduït o <i>Non-Reducing End</i>
°	Graus
°C	Grau centígrad
OF	Prova de camp obert o <i>Open-Field</i>

Oligo-DT	Oligonucleòtid desoxitimina
ORF	Marc de lectura obert o <i>Open reading frame</i>
p.i.	Post-injecció
PBS	Tampó Fosfat Salí o <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa o <i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polietilè glicol
pv	partícula viral
qPCR	PCR quantitativa
RB	<i>Roller bottles</i>
RNA	Àcid ribonucleic
RNase	Ribonucleasa
rpm	Revolucions per minut
s	Segons
S.E.M.	Error estàndard de la mitjana o <i>Standard Error of the Mean</i>
SDS	Dodecil Sulfat de Sodi o <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	Electroforesi en Gel de Poliacrilamida amb Dodecil Sulfat de Sodi o <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
Sgsh	Sulfamidasa
SNC	Sistema nerviós central
SNP	Sistema Nerviós Perifèric
ssDNA	DNA d'una cadena o <i>single strand DNA</i>
ssRNA	RNA d'una cadena o <i>single strand RNA</i>
SUMF1	Factor modificador de les sulfatases tipus 1 o <i>Sulfatase-Modifying Factor 1</i>
U	Unitat
U.E.	Unió Europea
UAB	Universitat Autònoma de Barcelona
V	Volt
v/v	volum/volum
vg	Genomes virals o <i>vector genomes</i>
vs.	Versus
w/v	pes (o <i>weight</i>)/volum
WPRE	Element regulador post-transcripcional del virus de l'hepatitis de marmota o <i>Woodchuck Posttranscriptional Regulator Element</i>
WT	control/sa o <i>Wild-Type</i>

I. RESUM.....	1
II. INTRODUCCIÓ.....	4
1. MALALTIES D'ACUMULACIÓ LISOSÒMICA.....	5
1.1. Lisosomes i enzims lisosòmics	5
1.2. Malalties d'acumulació lisosòmica.....	8
1.3. Classificació de les LSDs.....	9
1.4. Simptomatologia, diagnòstic i tractament de les LSD	11
2. MUCOPOLISACARIDOSI TIPUS IIIA	14
2.1. Incidència de la MPSIIIA	14
2.2. Heparan Sulfat	16
2.2.1. Estructura i funció de l'heparan sulfat	16
2.2.2. Catabolisme de l'heparan sulfat	18
2.3. N-Sulfoglucosamina sulfohidrolasa, SGSH.....	21
2.3.1. Gen de la sulfamidasa	21
2.3.2. Enzim sulfamidasa	22
2.3.3. Mutacions al gen de la sulfamidasa humana	25
2.3.4. Correlació genotip-fenotip de la MPSIIIA.....	26
2.4. Fisiopatologia de la MPSIIIA	27
2.5. Patologia clínica de la MPSIIIA	29
2.5.1. Desenvolupament inicial i primers símptomes.....	30
2.5.2. Patologia neurològica.....	31
2.5.3. Trastorns del son.....	32
2.5.4. Patologia somàtica	32
2.5.5. Mort.....	33
2.6. Diagnòstic de la MPSIIIA.....	34
2.6.1. Diagnòstic prenatal de la MPSIIIA.....	37
2.6.2. Diagnòstic postnatal de la MPSIIIA	37
2.7. Models animals de la MPSIIIA.....	38
2.7.1. Model de ratolí per a la MPSIIIA	38
2.7.2. Model caní de la MPSIIIA.....	40
2.8. Tractaments per a la MPSIIIA	41
2.8.1. Tractament simptomàtic.....	41
2.8.2. Teràpia de reducció de substrat.....	41

2.8.3. <i>Teràpia de millora de l'activitat enzimàtica</i>	43
2.8.4. <i>Teràpia de substitució enzimàtica</i>	44
2.8.5. <i>Teràpia amb cèl·lules mare hematopoètiques</i>	46
3. TERÀPIA GÈNICA	47
3.1. Introducció a la teràpia gènica	47
3.2. Vectors virals	48
3.3. Vectors virals adenoassociats	50
3.3.1. <i>Biologia dels virus AAVs</i>	51
3.3.2. <i>Característiques dels vectors AAVs</i>	52
3.4. Teràpia gènica pel tractament de la MPSIIIa	55
3.4.1. <i>Administració de vectors per la ruta intravenosa</i>	55
3.4.2. <i>Administració de vectors per la ruta intraparenquimàtica</i>	57
3.4.3. <i>Administració de vectors per la ruta intra-LCR</i>	58
3.4.4. <i>Combinació de rutes d'administració</i>	59
3.4. Efecte de la immunitat humoral anti-AAV a la teràpia gènica	60
 III. OBJECTIUS	 62
 IV. RESULTATS	 62
 1. ADMINISTRACIÓ INTRA-LCR DE L'AAV9 SULFAMIDASA EN RATOLINS	 65
1.1. Disseny experimental de l'administració intra-LCR de l'AAV9-Sgsh.....	66
1.2. Eficàcia al SNC de l'administració intra-LCR del vector AAV9-mSgsh.....	68
1.2.1. <i>Activitat sulfamidasa al cervell</i>	68
1.2.2. <i>Acumulació de GAGs al cervell</i>	70
1.2.3. <i>Patologia lisosòmica al SNC</i>	72
1.2.4. <i>Tipus cel·lular amb distensió lisosòmica</i>	75
1.2.5. <i>Ultraestructura del còrtex cerebral</i>	77
1.2.6. <i>Anàlisi de la neuroinflamació</i>	79
1.3. Efecte en la patologia somàtica de l'administració intra-LCR de l'AAV9-mSgsh	82
1.3.1. <i>Activitat sulfamidasa a fetge i sèrum</i>	82
1.3.2. <i>Acumulació de GAGs a teixits perifèrics</i>	85
1.3.3. <i>Distensió lisosòmica dels teixits perifèrics</i>	88
1.3.4. <i>Ultraestructura del fetge</i>	89

1.3.5. Correcció funcional de la MPSIIIA després de l'administració directa al LCR de l'AAV9-mSgsh	91
1.3.6. Supervivència dels ratolins MPSIIIA després de la transferència gènica	93
1.4. Determinació de la mínima dosi amb eficàcia terapèutica del vector AAV9-mSgsh administrat directament al LCR	94
1.4.1. Acumulació de GAGs al cervell	96
1.4.2. Neuroinflamació al SNC	98
1.4.3. Acumulació de GAGs als òrgans somàtics	101
1.4.4. Correcció funcional després de l'administració intra-LCR de l'AAV9-mSgsh	103
1.5. Administració intra-LCR de l'AAV9-mSgsh a estadis més avançats de la MPSIIIA ...	105
1.5.1. Eficàcia terapèutica al SNC de l'administració intra-LCR de l'AAV9-mSgsh a ratolins amb la malaltia avançada	106
1.4.1.1. Activitat sulfamidasa a cervell	106
1.4.1.2. Acumulació de GAGs al cervell	108
1.4.1.3. Correcció de la distensió lisosòmica	108
1.4.1.4. Avaluació de la neuroinflamació	111
1.5.2. Efecte als teixits perifèrics de l'administració intra-LCR de l'AAV9-mSgsh de ratolins amb la malaltia més avançada	113
1.4.2.1. Activitat sulfamidasa a fetge i sèrum	113
1.4.2.2. Acumulació de GAGs a òrgans somàtics	115
1.4.2.3. Distensió lisosòmica a teixits perifèrics	117

2. TRANSLACIÓ DEL TRACTAMENT PER A LA MPSIIIA A GOSSOS

BEAGLE ADULTS	118
2.1. Estudi de la biodistribució del vector viral AAV9 després de l'administració intra-LCR a gossos	118
2.1.1. Determinació del número de còpies de genomes virals	120
2.1.2. Expressió del transgèn	122
2.2. Transferència del gen de la sulfamidasa al SNC de gossos Beagle mitjançant l'administració del vector AAV9	125
2.2.1. Transferència del gen de la sulfamidasa humana	125
2.2.1.1. Activitat sulfamidasa al LCR	126
2.2.1.2. Expressió del gen de la sulfamidasa humana	128
2.2.2. Transferència del gen de la sulfamidasa canina	130
2.3. Comparació de la biodistribució del vector AAV9 després de l'administració per la via intracisternal i intracerebroventricular	133

2.3.1. <i>Anàlisi histològic de les dues rutes d'administració</i>	135
2.3.2. <i>Número de còpies de genomes virals i expressió del mRNA</i>	137
2.4. <i>Resum de l'administració intra-LCR del vector AAV9</i>	140
3. IMPACTE DE LA IMMUNITAT HUMORAL PREEXISTENT EN L'EFICIÈNCIA DE LA TRANSDUCCIÓ DEL SNC	141
3.1. <i>Distribució asimètrica dels anticossos neutralitzants anti-AAV a causa de la barrera hematoencefàlica</i>	141
3.1.1. <i>Títols d'anticossos neutralitzants a pacients humans</i>	141
3.1.2. <i>Títols d'anticossos neutralitzants a gossos</i>	142
3.2. <i>Administració intracisternal d'AAV9 en gossos Beagle preimmunitzats contra l'AAV9</i>	144
3.2.1. <i>Títols d'anticossos neutralitzants</i>	146
3.2.2. <i>Anàlisi immunohistològic de la transducció del SNC</i>	146
3.2.3. <i>Número de còpies de genomes virals i expressió del mRNA</i>	148
V. DISCUSSIÓ	150
VI. CONCLUSIONS	164
VII. MATERIALS I MÈTODES	167
1. MATERIALS	168
1.1. <i>Animals</i>	168
1.2. <i>Soques bacterianes</i>	168
1.3. <i>Anticossos</i>	169
1.4. <i>Plasmidis</i>	170
1.5. <i>Reactius</i>	171
2. MÈTODES	172
2.1. <i>Preparacions de DNA plasmídic</i>	172
2.2. <i>Modificacions del DNA</i>	172
2.2.1. <i>Digestions del DNA amb enzims de restricció</i>	172
2.2.2. <i>Purificació i resolució del DNA</i>	172
2.2.3. <i>Lligació dels fragments de DNA</i>	173

2.2.4. Transformació de l'E. Coli competent	174
2.3. Genotipificació de ratolins MPSIIIA	174
2.3.1. Aïllament del DNA genòmic	174
2.3.2. Genotipificació per PCR	175
2.3.3. Digestió MspAII del producte de PCR	175
2.4. Producció, purificació i caracterització dels vectors AAVs	176
2.4.1. Producció i purificació dels AAVs	176
2.4.2. Quantificació de genomes virals per PCR quantitativa (qPCR)	178
2.4.3. Quantificació de les partícules virals per tinció de plata	180
2.5. Administració in vivo del vector AAV9	182
2.5.1. Administració intracisternal en ratolins	182
2.5.2. Administració intracisternal en gossos	182
2.5.3. Administració intracerebroventricular en gossos	183
2.5.4. Administració intravenosa en gossos	183
2.6. Prova de camp obert (o Open Field Test)	184
2.7. Obtenció de mostres de sèrum i LCR in vivo	184
2.7.1. Obtenció de mostres de sèrum de ratolins	184
2.7.2. Obtenció de mostres de sèrum de gossos	185
2.7.3. Obtenció de mostres de LCR de gossos	185
2.8. Determinació dels paràmetres bioquímics i hematològics	185
2.9. Obtenció de les mostres biològiques postmortem	186
2.9.1. Obtenció de les mostres biològiques postmortem de ratolins	186
2.9.2. Obtenció de les mostres biològiques postmortem de gossos	187
2.10. Quantificació de proteïna pel mètode de Bradford	187
2.11. Determinació d'activitat Sulfamidasa	188
2.12. Quantificació del contingut de GAGs	189
2.13. Immunohistoquímica en seccions de teixits	189
2.14. Anàlisi morfomètric	190
2.15. Microscòpia electrònica de transmissió	191
2.16. Extracció i quantificació de les còpies de genomes virals per qPCR	191
2.16.1. Extracció de genomes virals dels teixits	191
2.16.2. Quantificació del nombre de còpies de genomes virals per qPCR	192
2.16.2.1. Generació de la recta patrò de referència.	192
2.16.2.2. Quantificació del nombre de còpies de genomes virals per qPCR	192
2.17. Anàlisi d'expressió de mRNA	193
2.17.1. Aïllament de RNA Total	193

2.17.2. <i>Síntesi del cDNA</i>	194
2.17.3. <i>Quantificació de l'expressió de mRNA per qPCR</i>	194
2.18. Determinació d'anticossos neutralitzants.....	195
2.19. Anàlisi estadística	196
VIII. BIBLIOGRAFIA	197

I. RESUM

La Mucopolisacaridosi tipus IIIA (MPSIIIA) o Síndrome de Sanfilippo és una malaltia d'acumulació lisosòmica (o *Lysosomal Storage Disease*, LSD) d'herència autosòmica recessiva, causada per la deficiència de l'enzim sulfamidasa (Sgsh). Aquesta sulfatasa està involucrada en la degradació del glicosaminoglicà (GAG) heparan sulfat, el qual s'acumula als lisosomes de les cèl·lules. Els signes i símptomes clínics de la MPSIIIA es caracteritzen per una severa neurodegeneració juntament amb unes alteracions somàtiques més lleugeres que provoquen la mort durant l'adolescència. Actualment no hi ha cap teràpia efectiva aprovada pel tractament d'aquesta malaltia.

En primer lloc, es va dur a terme una sèrie d'estudis per tal de determinar l'eficàcia terapèutica de l'administració a dins la cisterna magna d'un virus adenoassociat (o *Adenoassociated Vector*, AAV) de serotip 9 codificant per a la sulfamidasa en un model murí de la malaltia, el ratolí MPSIIIA. L'administració del vector va resultar en un increment de l'activitat sulfamidasa a tot l'encèfal, que va ser al voltant d'un 40% de l'activitat present al cervell d'un animal sa. Aquest increment de sulfamidasa va portar a una normalització del contingut de GAGs i de la patologia lisosòmica a tot el cervell. Cal destacar especialment la completa correcció de la neuroinflamació, característica d'aquest model animal i de la MPSIIIA humana. D'altra banda, es va verificar un augment de l'activitat sulfamidasa al fetge i al sèrum dels animals tractats, augment relacionat amb el fet que els vectors drenen des del Líquid Cefaloraquídi (LCR) cap a la sang i arriben a transduir el fetge. Aquest augment de la sulfamidasa circulant va resultar en la reducció de l'acumulació de GAGs fins a nivells normals a la majoria dels teixits analitzats. Finalment, el tractament va aconseguir corregir els dèficits de comportament dels animals MPSIIIA i va perllongar considerablement la seva supervivència, que va ser similar a la d'animals sans. A més a més d'aquest estudi, es va realitzar un exhaustiu estudi de dosi-resposta per tal de determinar la mínima dosi terapèutica necessària per contrarestar la malaltia, i així com també la màxima edat de tractament que permet assolir eficàcia terapèutica abans que la malaltia no provoqui danys irreversibles. Els resultats d'aquesta part han constituït la base de l'atorgament l'any 2011 de la condició de medicament orfe per part de l'Agència Europea del Medicament i la *Food and Drug Administration* a l'AAV9-sulfamidasa.

La segona part de l'estudi es va centrar en demostrar l'escalabilitat de l'aproximació a models animals grans, pas fonamental per a la translació d'aquesta

teràpia cap a la clínica en pacients. Així doncs, es va avaluar en gossos la distribució del vector a tot el Sistema Nerviós Central (SNC), Sistema Nerviós Perifèric (SNP) i en òrgans somàtics. A més a més, es va avaluar l'efecte sobre l'eficiència de transducció del vector segons la velocitat d'infusió i la ruta d'administració. Finalment, es va demostrar l'eficient producció i secreció de sulfamidasa al LCR dels animals tractats amb vector codificant per a l'enzim, així com la seguretat del tractament després d'un seguiment de >16 mesos.

Els anticossos neutralitzants (o *neutralizing antibodies*, NAbs) dirigits contra el vector viral suposen la principal limitació per a l'eficàcia de la transferència gènica. Per tant, l'última part d'aquesta tesi va avaluar l'impacte de la immunitat humoral anti-AAV en l'eficiència de transducció dels vectors AAV9 quan són administrats directament al LCR. Primer es va dur a terme un estudi per analitzar la distribució dels NAbs a través de la barrera hemato-encefàlica en individus sans i afectats per la MPSIIIA, així com també en tots el gossos tractats. Així es va confirmar la distribució asimètrica dels anticossos, presents a títols molt més baixos al LCR respecte el sèrum. Aquests resultats van concordar amb l'observació de l'eficient transducció del SNC i del PNS en gossos amb immunitat anti-AAV prèvia quan se'ls administrava el vector directament al LCR, tot i que, com caldria esperar, es va perdre l'eficàcia en teixits perifèrics. Tenint en compte que la MPSIIIA és una malaltia predominantment neurodegenerativa, aquest resultats indiquen que es podrien tractar pacients amb anticossos neutralitzants.

Tots aquests resultats constitueixen la base preclínica per a la translació cap a la clínica de l'administració al líquid cefaloraquidi d'AAV9-sulfamidasa com a tractament per a la MPSIIIA, com també per altres LSDs amb afectació, principalment, del SNC.

II. INTRODUCCIÓ

1. MALALTIES D'ACUMULACIÓ LISOSÒMICA

Les malalties d'acumulació lisosòmica (*Lysosomal Storage Disease*, LSD) són un grup de malalties rares que es caracteritzen per l'acumulació de productes no degradats als lisosomes, com a conseqüència de la deficiència d'un enzim lisosòmic. La primera LSD que es va descriure l'any 1882 va ser la malaltia de Gaucher, seguit del descobriment de la malaltia de Fabry el 1898. Durant la dècada dels anys 50-60, es va identificar un nou orgànul al citoplasma cel·lular que es va anomenar lisosoma (De Duve, 1955). Aquest fet va permetre relacionar per primera vegada la malaltia de Pompe, deficiència de l'àcid α -glucosidasa, com a una LSD provocada per l'absència de l'activitat d'un enzim present al lisosoma (Hers, 1963).

1.1. Lisosomes i enzims lisosòmics

Els lisosomes són vesícules intracel·lulars amb pH interior àcid integrades al sistema dinàmic endo-lisosòmic que s'encarreguen de la internalització, reciclatge, transport i degradació, tant de components cel·lulars com extracel·lulars. Contenen més de 50 hidrolases àcides capaces de degradar qualsevol tipus de biomolècules: proteïnes, àcids nucleics, carbohidrats, lípids i restes cel·lulars. Aquests enzims només són actius a l'ambient àcid present al lisosoma (pH 5), el qual es manté gràcies a una bomba de protons dirigida per ATP que internalitza protons a l'interior del lisosoma. D'aquesta manera, la cèl·lula presenta un mecanisme de seguretat que evita l'atac del propi sistema de degradació a la seva maquinària cel·lular, tot impedit l'activació dels enzims lisosòmics a entorns no-acídic com el citoplasma. El sistema endo-lisosòmic està format per endosomes i lisosomes que es diferencien en el seu grau d'acidificació i els nivells de proteïna lisosòmica associada a la membrana tipus 1 i 2 (*Lysosomal Associated-Membrane Protein 1 and 2*, o LAMP1 i LAMP2) (Platt, 2012). Per tant, els enzims lisosòmics actuen de forma òptima a l'ambient àcid present al lisosoma, tot i que també poden tenir certa capacitat de degradació als endosomes, un ambient menys acidificat.

Els enzims lisosòmics se sintetitzen al reticle endoplasmàtic rugós i seguidament entren al reticle endoplasmàtic llis gràcies a la seqüència senyal N-terminal (Vellodi, 2005). En aquest punt, els enzims són N-glicosilats i se'ls elimina la senyal N-terminal

(Vellodi, 2005). Després, es dirigeixen cap a l'aparell de Golgi on, aquells enzims que ho necessitin, adquireixen la senyal manosa-6-fosfat (o *Mannose-6-Phosphate*, M6P) gràcies a l'acció seqüencial de la fosfotransferasa i la diesterasa (Reitman, 1981; Varki, 1981; W aheadl, 1981) (Figura 1). Aleshores, el receptor M6P /IGF II (*Insuline-like Growth Factor II* o Factor de Creixement similar a la Insulina Tipus II), ubicat principalment a les vesícules àcides adjacents a l'aparell de Golgi i en menor proporció a la xarxa trans-Golgi i la membrana plasmàtica (Griffiths, 1988), s'uneix a la senyal M6P de ls enzims lisosòmics per dirigir-los correctament cap a ls lisosomes (Hickman, 1972) (Figura 2). Cal tenir en compte que no tots els enzims lisosòmics utilitzen la via dependent de la senyal M6P per arribar al lisosoma, sinó que utilitzen d'altres mecanismes com: (i) la proteïna lisosòmica integral de membrana tipus 2 (o *Lysosomal Integral-Membrane Protein 2*, LIMP2), un receptor que dirigeix la glucocerebrosidasa als lisosomes; o bé (ii) la sortilina, un receptor multifuncional que s'uneix a diferents lligands, com les proteïnes activadores i les catepsines que són proteïnes necessàries pel funcionament d'alguns enzims lisosòmics (Reczek, 2007; Lefrancois, 2003; Canel, 2008). Independentment de la via utilitzada, el complex receptor-proteïna arriba al lisosoma, on el pH àcid en provoca la seva dissociació (Gonzalez-Noriega, 1980). Finalment, els enzims lisosòmics se sotmeten als últims passos de maduració al lisosoma mitjançant processos de proteòlisi, plegament i agregació per tal de ser enzims plenament funcionals.

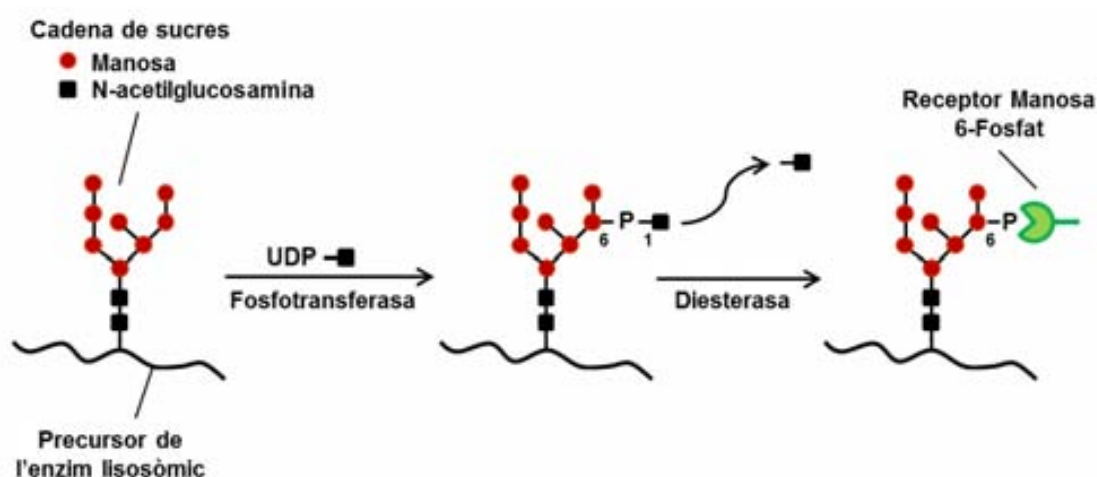


Figura 1. Formació de l'etiqueta M6P per dirigir els enzims als lisosomes. En primer lloc, actua la fosfotransferasa que s'encarrega de la fosforilació de la posició 6 de la manosa. Consecutivament, la diesterasa trenca l'enllaç fosfodièster entre el grup fosfat i la N-acetilglucosamina (Adaptat de Vellodi, 2005).

Tot i que la majoria d'enzims lisosòmics es dirigeixen correctament als lisosomes, una petita part segueix la via clàssica de processament de proteïnes de secreció, és a dir, les hidrolases es dirigeixen des de l'aparell de Golgi directament cap al medi extracel·lular (Figura 2A). Per altra banda, els receptors que ja han dut els enzims als lisosomes es reciclen cap a l'aparell de Golgi per recollir-ne de nous, tot i que una part d'aquests receptors es dirigeixen cap a la membrana plasmàtica on poden internalitzar enzims lisosòmics provinents de l'exterior cel·lular (Figura 2A). Aquest fenomen permet l'anomenada correcció creuada on, el subministrament d'enzims lisosòmics de forma exògena o bé la modificació genètica d'una cèl·lula com a font productora i secretora de l'enzim lisosòmic deficient, permet la recaptació de l'enzim per part de les cèl·lules veïnes mitjançant els receptors M6P de la membrana plasmàtica (Figura 2).

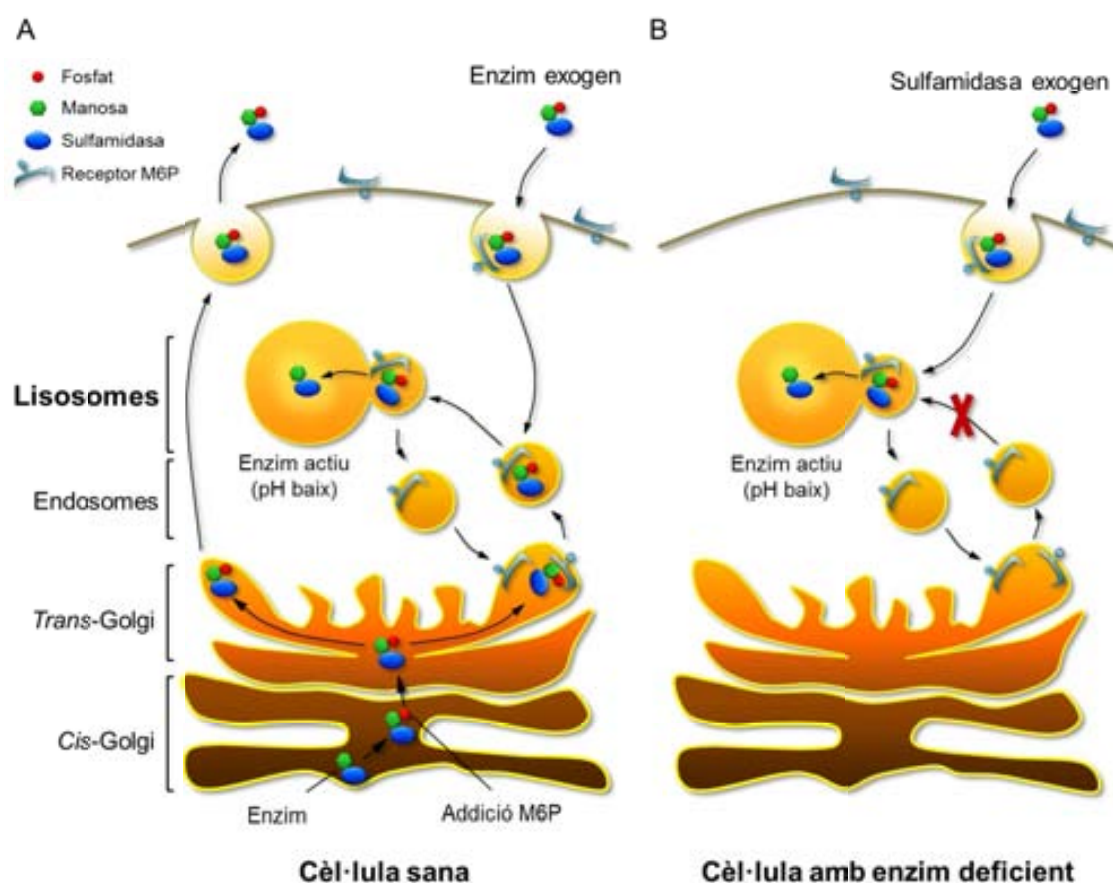


Figura 2. Tràfic dels enzims lisosòmics a dins la cèl·lula. (A, B) Representació de la síntesi i tràfic de l'enzim lisosòmic sulfamidasa a una cèl·lula sana (A) i a una altra amb la deficiència d'un enzim lisosòmic (B).

El material que s'encarreguen de degradar els lisosomes pot ser tant extracel·lular com intracel·lular. El material extracel·lular entra a dins la cèl·lula mitjançant endocitosi o fagocitosi depenent de la naturalesa de la molècula. L'endocitosi dirigida per receptor és el mètode principal d'entrada del material biològic extracel·lular unint-se de forma específica a receptors de la superfície cel·lular tot formant els endosomes (Goldstein, 1985). Per altra banda, la majoria de microorganismes i restes cel·lulars entren mitjançant fagocitosis, gràcies a la creació d'una invaginació per part de la membrana plasmàtica per tal d'internalitzar-los. Finalment, el material intracel·lular es capta mitjançant la formació de membranes a l'interior de la cèl·lula que segresten regions del citosol que contenen proteïnes desnaturalitzades, lípids, carbohidrats, i orgànuls vells o danyats amb la finalitat de crear un autofagosoma. En últim terme, les diferents vesícules que contenen material biològic divers s'acaben fusionant amb els lisosomes, orgànul on es duu a terme el procés de degradació de les molècules per part dels enzims lisosòmics (Vellodi, 2005).

1.2. Malalties d'acumulació lisosòmica

Tal com s'ha mencionat anteriorment, les malalties d'acumulació lisosòmica són un grup de malalties metabòliques hereditàries rares causades per la mutació dels gens codificants pels enzims lisosòmics, els quals poden ser proteïnes solubles, transportadores o bé integrals de membrana. La deficiència enzimàtica provoca l'acumulació de determinades macromolècules no degradades, com els esfingolípid, els glicosaminoglicans (GAGs), les glicoproteïnes, el glicogen, etc., a dins dels lisosomes de diversos teixits i òrgans. A més, en la majoria de casos també s'acumulen productes secundaris d'altres vies metabòliques que estan alterades a causa del mal funcionament dels lisosomes. Habitualment, una única deficiència enzimàtica és la causa principal de la majoria de LSDs. No obstant això, l'absència d'un activador comú de diversos enzims lisosòmics pot provocar la pèrdua de diverses activitats enzimàtiques. Per exemple, el Dèficit de Sulfatasa Múltiple provoca una pèrdua de totes les activitats sulfatases a causa de la manca del factor modificador de les sulfatases tipus 1 (o *Sulfatase-Modifying Factor 1*, SUMF1), activador comú del centre actiu de les sulfatases (Cosma, 2003).

Totes les malalties d'acumulació lisosòmica són monogèniques, autosòmiques i recessives, excepte la Síndrome de Fabry i la Mucopolisacaridosi (MPS) tipus II (o Síndrome de Hunter) que tenen una herència lligada al cromosoma X. A totes les regions estudiades, s'ha detectat una incidència molt baixa de cada tipus de malaltia, però si es tracten com a conjunt la incidència és relativament alta comparada amb d'altres grups de malalties rares (Parenti, 2013). Per les LSDs, s'ha calculat que la incidència es troba al voltant de 1 en cada 5000 naixements (Fuller, 2006). L'estudi i predicció de l'evolució clínica d'aquestes malalties és complicat a causa del poc nombre de pacients i la gran diversitat de mutacions presents a cada malaltia.

1.2.1. Classificació de les LSDs

Avui en dia, s'han identificat més de cinquanta LSDs que es classifiquen segons les propietats químiques del substrat acumulat. D'aquesta manera, aquest tipus de classificació associa malalties que acumulen el mateix producte no-degradat, i solen presentar una simptomatologia bastant similar. La Taula 1 presenta la classificació de les diferents LSDs.

Taula 1. Classificació de les malalties d'acumulació lisosòmica. (Part I)

Malaltia	Proteïna lisosòmica deficient	Principal material acumulat
Deficiència en el metabolisme dels glicosaminoglicans (mucopolisacaridosis)		
MPS I (Hurler, Hurler/Scheie, Scheie)	α -L-iduronidasa	Dermatan i Heparan sulfat
MPS II (Hunter)	Iduronat-2-sulfatasa	Dermatan i Heparan sulfat
MPS IIIA (Sanfilippo A)	N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa o Sulfamidasa	Heparan sulfat
MPS IIIB (Sanfilippo B)	N-Acetil- α -glucosaminidasa	Heparan sulfat
MPS IIIC (Sanfilippo C)	Heparan- α -glucosaminidasa o N-acetiltransferasa	Heparan sulfat
MPS IIID (Sanfilippo D)	N-acetilglucosamina 6-sulfatasa	Heparan sulfat
MPS IVA (Morquio A)	Galactosamina 6-sulfat sulfatasa	Queratan sulfat i condroitin sulfat
MPS IVB (Morquio B)	β -Galactosidasa	Queratan sulfat
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	N-Acetilgalactosamina-4-sulfatasa	Dermatan sulfat
MPS VII (Sly)	β -Glucuronidasa	Heparan, dermatan i condroitin sulfat
MPS IX (Natowicz)	Hialuronidasa	Àcid hialurònic

Adaptada de Wilcox, 2004, i Futerman, 2004.

Taula 1. Classificació de les malalties d'acumulació lisosòmica. (Part II)

Malaltia	Proteïna lisosòmica deficient	Principal material acumulat
Deficiència en la degradació dels glicans procedents dels proteoglicans		
Aspartilglicosaminúria	Aspartilglicosaminidasa	Oligosacàrids rics en aspartilglicosamina
Mucopolidiosi I – Sialidosi (Tipus I i II) α-N-Acetilgalactosaminida: Schindler (Tipus I i III) Kanzaki (Tipus II) α-Fucosidosis (Tipus I i II)	Neuraminidasa α-N-Acetilgalactosaminidasa α-L- Fucosidasa	Sialiloligosacàrids i sialilglicopèptids Glicoconjugats que contenen α-N-Acetilgalactosaminil Glicoproteïnes i glicolípid que contenen fucoses
α-Manosidosis (Tipus I i II) β-Manosidosis	α-Manosidasa β-Manosidasa	Oligosacàrids rics en manosa Oligosacàrids rics en manosa
Deficiència en la degradació del glicogen		
Glicogenosis tipus II (Pompe)	α-Glucosidasa	Glicogen
Deficiència en el metabolisme dels esfingolípid		
Fabry Farber Lipogranulomatosi Gaucher (Tipus I, II, III) <i>variant</i> Gangliosidosi GM1 (Tipus I, II, III) Gangliosidosi GM2 Tay-Sachs Schandoff <i>variant</i> AB Leucodistròfia cel·lular Globoide (Krabbe) <i>variant</i> Leucodistròfia metacromàtica <i>variant</i> Niemann-Pick (Tipus A i B)	α-Galactosidasa A N-Acilesfingosina Amidohidrolasa β-Glucosidasa Saposina C β-Galactosidasa 1 α-Hexosaminidasa A β-Hexosaminidasa B Activador Gangliòsid GM2 Galactosilceramidasa Saposina A Ariulfatasa A Saposina B Esfingomielinasa	Globotriaosilceramida Ceràmida Glicosilceramida Glicosilceramida Gangliòsid GM1 i glicolípid relacionats Gangliòsid GM2 i glicolípid relacionats Gangliòsid GM2 i glicolípid relacionats Gangliòsid GM2 i glicolípid relacionats Galactosilceramida Galactosilceramida Sulfatats de cerebrósida Sulfatats de cerebrósida Esfingomielina
Deficiència en la degradació dels polipèptids		
Picnodisostosis	Catepsina K	Proteïnes òssies
Deficiència en múltiples enzims lisosòmics		
Deficiència de la sulfatasa múltiple Galactosialidosi Mucopolidiosi (Tipus II i III)	SUMF1 Catepsina A GlcNAc-I-P transferasa	Ésters sulfatats Sialiloligosacàrids Oligosacàrids, mucopolisacàrids, lípids

Adaptada de Wilcox, 2004, i Futerman, 2004.

Taula 1. Classificació de les malalties d'acumulació lisosòmica. (Part III)

Malaltia	Proteïna lisosòmica deficient	Principal material acumulat
Deficiència en el transport i el tràfic lisosòmic		
Cistinosis Malaltia de Danon	Cistinosina LAMP2	Cistina Glicogen i restes citoplasmàtiques
Malaltia d'acumulació d'àcid siàlic infantil i malaltia Salla Mucopolidiosi IV	Sialina Mucopolina-1	Àcid siàlic Oligosacàrids, mucopolisacàrids, lípids
Hermansky-Pudlak	HPS1	Materials ceroides
Deficiència en la degradació o transport del colesterol o altres lípids complexos		
Lipofuscinosi Neuronal Ceroide (NCL) NCL1 (INCL – Infantil NCL) NCL2 (LINCL – Infantil Tardana NCL) NCL3 (Malaltia de Batten) NCL4A (ANCL – Adult NCL) NCL4B (Malaltia de Kufs) NCL5 NCL6 NCL7 NCL8 NCL9 NCL10 NCL11 NCL12 NCL13 NCL14	Proteïna palmitoleat tioesterasa-1 Tripeptidil peptidasa-1 CLN3 CLN6 CSP CLN5 CLN6 MFSD8 CLN8 CLN9 Catepsina D Precursor Granulina ATP13A2 Catepsina F KCTD7	Lipofuscina (lipopigment) Lipofuscina (lipopigment) Lipofuscina (lipopigment) Lipofuscina (lipopigment) Lipofuscina (lipopigment) Lipofuscina (lipopigment) Lipofuscina (lipopigment) Lipofuscina (lipopigment) Lipofuscina (lipopigment) Lipofuscina (lipopigment) Lipofuscina (lipopigment) Lipofuscina (lipopigment) Lipofuscina (lipopigment) Lipofuscina (lipopigment) Lipofuscina (lipopigment) Lipofuscina (lipopigment) Lipofuscina (lipopigment)
Deficiència de la Lipasa àcida lisosòmica: Wolman Malaltia d'Acumulació d'Éster de Colesterol (CESD) Niemann-Pick C (Tipus 1 i 2)	Lipasa A lisosòmica Lipasa A lisosòmica NPC1 i 2	Ésters de colesterol i triglicèrids Ésters de colesterol i triglicèrids Colesterol i lípids

Adaptada de Wilcox, 2004, i Futerman, 2004.

1.2.2. Simptomatologia, diagnòstic i tractament de les LSDs

Les LSDs presenten una elevada heterogeneïtat clínica com a conseqüència de la funció proteica afectada per la mutació subjacent, el tipus de material acumulat i el tipus cel·lular on s'acumulen els productes no degradats (Platt, 2012). A més a més, dins d'un mateix tipus o subtipus de malaltia pot variar molt l'edat d'aparició com també la severitat dels símptomes clínics en funció de la mutació que porti el pacient i el grau d'activitat residual de la proteïna mutada. En general, la majoria de recent nascuts afectats per alguna LSD no presenten cap símptoma, ja que se solen desenvolupar

durant els primers anys de vida. Ara bé, hi ha alguns tipus de LSDs on la manifestació de les primeres característiques clíniques succeeix durant l'edat adulta (Spada, 2006; Nixon 2008; Shapiro, 2008). Els fenotips dels pacients són bastant complexos a causa de la combinació de les manifestacions neurològiques com també somàtiques, tot i que no totes les LSDs tenen afectació al sistema nerviós central (SNC). El grau de severitat de les manifestacions neurològiques difereix segons l'efecte dels metabòlits acumulats a les diferents poblacions neuronals i la seva vulnerabilitat (Platt, 2012). Per tant, aquest tipus de pacient són un gran repte pels pediatres que els tracten a causa de l'aspecte multidisciplinar, la manca de predicció de l'evolució clínica i el grau de severitat de la malaltia present a cada pacient.

El diagnòstic es realitza gràcies a l'aparició dels primers símptomes clínics que suggereixen algun tipus de LSD. Com que són malalties poc freqüents i amb una gran variabilitat clínica, moltes vegades és difícil arribar al diagnòstic definitiu. Ara bé, el primer pas consisteix en la detecció en orina d'elevats nivells d'algun producte no degradat causat per alguna LSD. Per tal d'obtenir el diagnòstic definitiu, és necessari mesurar l'activitat enzimàtica de la LSD de la qual se'n té sospita.

La majoria de LSDs no tenen cap teràpia efectiva. El tractament dels pacients consisteix en teràpies pal·liatives o de suport. Ara bé, la investigació preclínica d'estratègies terapèutiques dirigides a la correcció de la deficiència enzimàtica ha permès el descobriment de noves aproximacions eficaces pel tractament de les LSDs. La majoria d'aquestes aproximacions consisteixen en incrementar els nivells d'enzim deficient al teixits i cèl·lules dels pacients afectats per reduir l'acumulació de metabòlits i millorar-ne el quadre clínic. La teràpia de substitució enzimàtica (o *Enzyme Replacement Therapy*, ERT), la qual consisteix en l'administració de l'enzim recombinant per via intravenosa, ja s'està comercialitzant per a la MPS I, II i VI, com també per a les malalties de Fabry, Gaucher i Pompe (Valenzano, 2011). Ara bé, l'enzim recombinant no és capaç de creuar la Barrera Hematoencefàlica (BHE) per tractar les afectacions neurològiques de la majoria de LSDs. Per aquest motiu, es va desenvolupar una nova teràpia basada en l'ERT directa al Líquid Cefaloraquidi (LCR) a través d'un dispositiu intratecal per algunes LSDs, com per exemple la MPSIIIA (NCT01155778, NCT01299727 i NCT02060526, clinicaltrials.gov). Tot i això, és necessari la investigació de noves teràpies per superar aquesta limitació biològica.

Actualment, hi ha molts estudis prometedors pel tractament de les LSDs com el transplantament de cèl·lules hematopoètiques, la teràpia gènica, l'ús de xaperones, la teràpia de reducció de substrat, entre molts d'altres. Algunes aproximacions terapèutiques ja han arribat a la fase clínica amb èxit, com per exemple, el transplantament de cèl·lules hematopoètiques modificades amb lentivirus *ex vivo* pel tractament de la leucodistrofia metacromàtica o la malaltia de Wiskott-Aldrich (Biffi, 2013; Aiuti, 2013).

2. MUCOPOLISACARIDOSI TIPUS IIIA

La Síndrome de Sanfilippo, o Mucopolisacaridosi tipus III, va ser descrita per primera vegada l'any 1963 pel pediatre Sylvester Sanfilippo. Durant el seu doctorat, va detectar 8 infants amb retard mental que presentaven l'increment d'un únic compost, Heparan Sulfat (HS), respecte a una trentena de pacients amb MPSI o MPSII els quals acumulaven dos compostos (HS i condroitin sulfat). Els pacients d'aquesta nova malaltia també patien una patologia somàtica lleugera amb la presència d'hepatomegàlia i alguns problemes ossis.

Més endavant, es va detectar que la Síndrome de Sanfilippo tenia diversos subtipus segons l'enzim deficient (Kresse, 1971). El 1972 es va descobrir l'enzim deficient en la Síndrome de Sanfilippo A, una heparan sulfat sulfatasa, que causava l'acumulació d'HS altament N-sulfatat (Kresse, 1972). Amb el pas del temps, la MPSIII es va acabar classificant en quatre subtipus diferents segons la deficiència enzimàtica involucrada en la degradació de l'HS, producte d'acumulació comú a totes les MPSIII. Aquests subtipus són: MPSIIIA, causat per la deficiència en la N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa o sulfamidasa (Sgsh) (Kresse, 1972); MPSIIIB, en l' α -N-acetilglucosaminidasa (von Figura, 1972); MPSIIIC, en l'heparan- α -glucosaminida N-acetiltransferasa (Klein, 1978) i la MPSIIID, deficient en l'N-acetil-glucosamina-6-sulfatasa (Kresse, 1980). Recentment, s'ha descobert que la deficiència enzimàtica de la N-sulfoglucosamina 3-O-sulfatasa en un model de ratolí provoca l'acumulació d'HS i resultaria en una possible MPSIIIE, tot i que a dia d'avui no se n'ha descrit cap pacient (Kowalewski, 2012).

2.1. Incidència de la MPSIIIA

Els quatre subtipus de la Síndrome de Sanfilippo són unes de les MPSs més freqüents (Meikle, 1999, Poorthuis, 1999) amb una incidència d'entre el 0,27 - 4,1 naixements per 100.000 habitants (Taula 2). De totes les regions estudiades, Holanda és el país amb més casos (van de Kamp, 1981; Poorthuis, 1999); mentre que Noruega, Dinamarca, Irlanda del Nord i British Columbia (Canadà) són els països amb menys casos (Malm, 2008; Nelson, 1997; Lowry, 1990). La MPSIIIA és el subtipus més comú

al nord d'Europa i Austràlia (Malm, 2008; Meikle, 1999; Poorthuis, 1999, Baehner, 2005; Héron, 2011), mentre que la MPSIIIB és la més freqüent al Sud d'Europa i Brasil (Pinto, 2004; Weber, 1999; Emre, 2002, Coelho, 1997; Michelakakis, 1995; Héron, 2011). La MPSIIIC i D són els dos subtipus més rars amb una incidència o prevalença molt baixa en comparació amb la MPSIIIA i B (Poorthuis, 1999; Héron, 2011).

Tot i el patró de distribució de la Síndrome de Sanfilippo a les regions europees analitzades, un estudi recent sobre la Síndrome de Sanfilippo a Espanya ha evidenciat que la MPSIIIA és el subtipus més freqüent seguit de la MPSIIIB (Delgadillo, 2013). Per tant, tot i que la MPSIIIA és el subtipus més freqüent a les regions del nord d'Europa, s'ha observat que a Espanya presenta una elevada freqüència més enllà de l'esperada segons les dades prèviament publicades. Ara bé, la MPSIIIC segueix essent una malaltia amb molt poca freqüència, juntament amb el subtipus D del qual se n'ha detectat un únic cas a tot l'estat espanyol (Delgadillo, 2013).

La MPSIIIA és el subtipus més comú i segons l'últim informe d'Orphanet del Juny de 2013 té una prevalença estimada a la Unió Europea (U.E.) de 0,3/100.000 habitants (http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence_of_rare_diseases_by_alphabetical_list.pdf).

Taula 2 . Incidència i prevalença de la MPSIII i la MPSIIIA a diferents àrees geogràfiques estudiades.

Població d'estudi	Anys d'estudi	Incidència* o Prevalença** (per 100.000 naixements)		Referència
		MPSIII	MPSIIIA	
Alemanya	1980 – 1995	1,57*	1,11*	Baehner (2005)
Austràlia	–	1,52**	0,88**	Meikle (1999)
Oest d'Austràlia	1969 – 1996	1,71*	0,78*	Nelson (2003)
British Columbia (Canàda)	–	0,31*	–	Lowry (1990)
British Columbia (Canadà)	1972 – 1996	-	0,29*	Applegarth (2000)
Dinamarca	1979 – 2004	0,43*	–	Malm (2008)
França	1990 – 1994	0,68*	0,48*	Héron (2011)
Grècia	1990 – 1994	0,97*	0*	Héron (2011)
Holanda	–	1,36-4.1*	–	Van de Kamp (1981)
Holanda	1970 – 1996	1,89**	1,16**	Poorthuis (1999)
Irlanda del Nord	1958 – 1985	0,36*	0,24*	Nelson (1997)
Nord de Portugal	–	0,84**	0**	Pinto (2004)
Noruega	1979 – 2004	0,27*	–	Malm (2008)
Regne Unit	1990 – 1994	1,16*	0,52*	Héron (2011)
República Txeca	1975 – 2008	–	0,047**	Poupetová (2010)
Suècia	1975 – 2004	0,67*	0,14*	Malm (2008)
Utah (EE.UU)	–	0,5-1*	–	Terry and Linker (1964)

Recull de la incidència (*), número de nous casos diagnosticats respecte els naixements en un període determinat de temps, i la prevalença (**), número total de casos respecte els naixements en un període determinat de temps, de la MPSIII i MPSIIIA de la literatura científico-mèdica.

2.2. Heparan sulfat

2.2.1. Estructura i funció de l'heparan sulfat

L'heparan sulfat és un polisacàrid llarg, lineal i c arregat negativament (Valstar, 2008). Aquest GAG està compost per unitats repetitives de disacàrid, formades per residus de D-glucosamina i un àcid urònic, que és àcid D-glucurònic o àcid L-idurònic alternativament (Kjellén, 1991) (Figura 3). Aquests residus estan units entre ells per un enllaç glicosídic $\alpha(1\rightarrow4)$. La unitat D-glucosamina pot estar sulfatada i acetilada al grup amino, com també pot estar sulfatada al grup hidroxil del C6 i, en menor proporció, al grup carboxil del C3 (Valstar, 2008) (Figura 3). Per altra banda, els residus d'àcid L-idurònic també es poden sulfatar al grup hidroxil del C2, mentre que l'àcid D-

glucurònic se sulfata a la mateixa posició però en menor proporció (Valstar, 2008) (Figura 3).

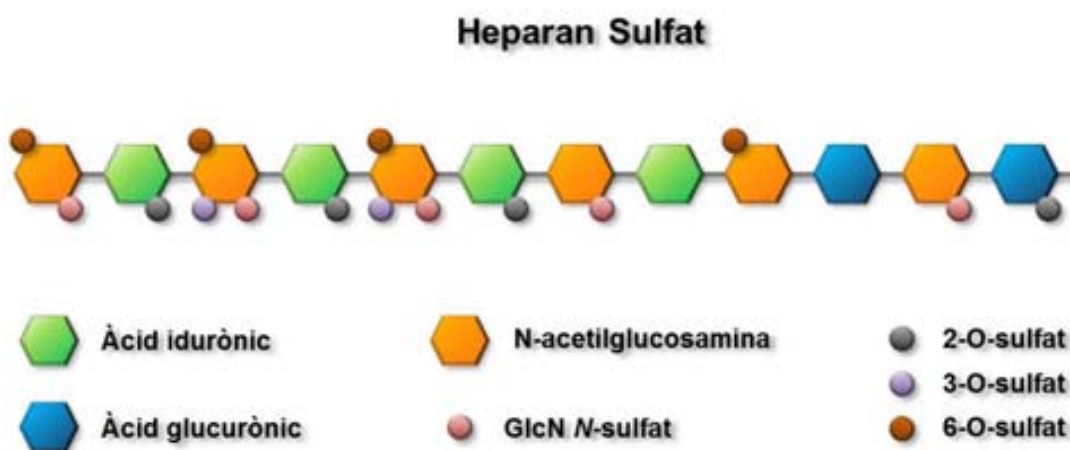


Figura 3. Estructura de l'heparan sulfat. L'esquema il·lustra l'estructura de l'heparan sulfat amb els diferents punts de sulfatació/acetilació. Adaptat de Häcker, 2005.

La funció de l'HS consisteix en la unió a proteïnes per tal de formar els proteoglicans localitzats a la matriu extracel·lular o a la superfície cel·lular. D'aquesta manera, l'HS com a proteoglicà pot interactuar amb una gran diversitat de proteïnes que donen lloc a funcions biològiques molt diverses com proliferació, adhesió, migració, reconeixement, diferenciació i supervivència cel·lular (Dreyfuss, 2009). Fins i tot, també pot intervenir en l'endocitosis, l'assemblatge de la matriu extracel·lular, la inflamació, l'angiogènesis o en mecanismes de defensa (Dreyfuss, 2009). Alguna de les molècules a les quals es pot unir el proteoglicà per tal de realitzar aquestes accions són: factors de creixement, quimiocines, citocines, morfògens, components de la matriu extracel·lular, enzims, entre molts d'altres (Capila, 2002).

2.2.2. Catabolisme de l'heparan sulfat

L'heparan sulfat unit als proteoglicans pateix un procés d'endocitosi des de la superfície cel·lular o matriu extracel·lular fins als lisosomes per a la seva posterior degradació als lisosomes. El primer pas consisteix en un tall endolític per part de les heparanases (endoglicosidases) que allibera l'HS de la proteïna a la qual estava unida prèviament (Bame, 2001). A partir d'aquí, cada un dels fragments d'HS es degrada en una cascada enzimàtica on el producte d'un enzim passa a ser el substrat del següent de la ruta catabòlica.

En el catabolisme de l'HS hi intervenen 3 glucosidases, al menys 3 sulfatases i 1 acetiltransferasa (Neufeld, 2001). Si l'activitat d'un dels enzims de la via metabòlica és deficient, la degradació no pot continuar i provoca l'acumulació de l'HS no degradat als lisosomes. Per exemple, tres d'aquests enzims, α -iduronidasa, iduronat 2-sulfatasa i β -glucuronidasa, degraden el residu d'àcid urònic, també present al GAG dermatan sulfat, i les seves deficiències donen lloc a la MPSI, MPSII i MPSVII, respectivament (Bach, 1972; Bielicki, 1990; Sly, 1973). Mentre que la sulfamidasa, l' α -N-acetilglucosaminidasa, l'heparan- α -glucosaminida N-acetiltransferasa i l'N-acetilglucosamina-6-sulfatasa intervenen en la degradació específica de l'HS i la seva deficiència enzimàtica provoca la Síndrome de Sanfilippo A-D (Kresse, 1972; von Figura, 1972; Klein, 1978; Kresse, 1980).

A la ruta catabòlica de l'HS, actua un enzim o un altre segons el residu present a l'extrem no reduït de l'HS (Figura 4). D'aquesta manera, si hi ha una molècula d'àcid idurònic, hi intervenen dos enzims diferents: en primer lloc, la iduronat 2-sulfatasa s'encarrega d'eliminar el grup sulfat de l'àcid L-idurònic (Bielicki, 1990), i en segon, l' α -L-iduronidasa talla l'àcid L-idurònic no sulfatat de la molècula de l'HS (Bach, 1972). Aleshores, queda exposat el residu de D-glucosamina (molècula específica de l'HS) on actua la sulfamidasa alliberant un grup sulfat unit al grup amino (Kresse, 1972), el qual seguidament és acetilat per l'heparan- α -glucosaminida N-acetiltransferasa (Klein, 1978). Després, la N-acetilglucosamina 6-sulfatasa s'encarrega d'eliminar el grup sulfat de l'hidroxil del C6 dels residus de N-acetilglucosamina que estiguin sulfatats en aquesta posició (Kresse, 1980). Finalment, la N-acetilglucosaminidasa hidrolitza l'enllaç $\alpha(1\rightarrow4)$ entre la N-acetilglucosamina i el següent àcid urònic (von Figura, 1972). Aleshores, l'àcid D-glucurònic present a l'extrem de la molècula d'HS es

degrada gràcies a l'actuació de la β -glucuronidasa, encarregada de tallar la unió d'aquest amb el següent residu de D-glucosamina (Sly, 1973). Es van repetint aquests passos successivament fins que la molècula formada per unitats repetitives de disacàrids està completament degradada. Ara bé, hi ha dos enzims que no provoquen cap malaltia, però que també intervenen en la degradació de l'HS: N-sulfoglucosamina 3-O-sulfatasa i la Glucuronat 2-sulfatasa (Kowalewski, 2012; Shaklee, 1985). El primer enzim s'encarrega de l'eliminació del grup sulfat a la posició C3 de la glucosamina, mentre que el segon elimina el grup sulfat de la posició C2 del residu d'àcid glucurònic. Ambdues sulfatacions de l'HS sulfat són molt poc freqüents, i per tant, l'actuació d'aquests enzims en el catabolisme de l'HS no sempre és necessària. A més, no s'ha detectat cap pacient amb una MPS provocada per una d'aquestes dues deficiències enzimàtiques, tot i que un model de ratolí deficient en N-sulfoglucosamina 3-O-sulfatasa presenta les mateixes característiques clíniques que els altres subtipus de la Síndrome de Sanfilippo (Kowalewski, 2012).

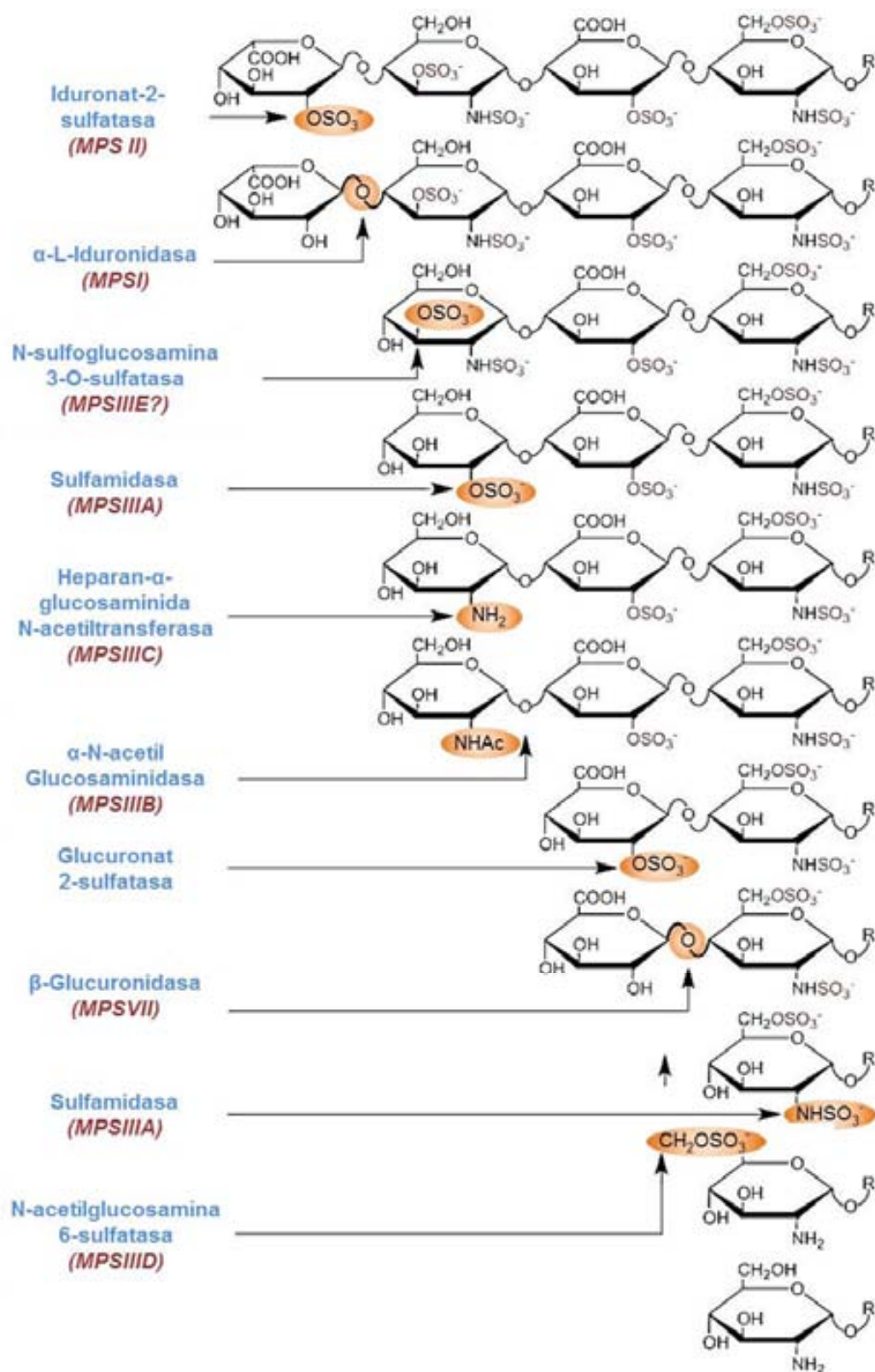


Figura 4. Degradació de l'heparan sulfat. L'esquema il·lustra tots els enzims involucrats en la degradació de l'heparan sulfat. En vermell s'indica la malaltia provocada per la deficiència de cadascun d'aquests enzims. Adaptat de Kowalewski, 2012.

2.3. N-Sulfoglucosamina sulfohidrolasa, SGSH.

La N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa (Sgsh) també s'anomena *heparan N-sulfatasa* o *sulfamidasa*, i intervé en la degradació de l'HS tot eliminant un grup sulfat de la glucosamina.

2.3.1. Gen de la sulfamidasa

El gen de la sulfamidasa humana està format per 8 exons diferents que es troben al llarg d'11 Kb (Karageorgos, 1996) i es localitza al cromosoma 17q25.3 (Scott, 1995) (Figura 5). Aquests exons estan flanquejats per unes regions d'unió amb els introns que presenten unes seqüències de tall i unió (*splicing*) altament conservades (Karageorgos, 1996). Aquesta seqüència gènica genera 3 transcrits de mRNA, produïts molt probablement per un ús diferent dels llocs de poliadenilació, que s'expressen a diversos teixits (Scott, 1995).

El gen de la sulfamidasa murina també està format per 8 exons amb un patró d'unió entre els exons i els introns molt similar al que s'ha detectat en el gen humà (Costanzi, 2000). La seqüència del ratolí només mesura 10 Kb i es localitza al cromosoma 11 (Costanzi, 2000) (Figura 5). Aquest cromosoma del ratolí és homòleg al cromosoma 17 dels humans, on es localitza la seqüència gènica de la sulfamidasa humana. Finalment, el gen de la sulfamidasa canina també presenta la mateixa estructura de 8 exons que la seqüència gènica murina i humana (Aronovich, 2000) (Figura 5). Ara bé, la seva estructura es troba en una seqüència nucleotídica més reduïda, d'únicament 5.732 bp (Aronovich, 2000) (Figura 5). El gen de la sulfamidasa murina i canina presenten un 85% i 87% de similitud, respectivament, amb la seqüència nucleotídica de la sulfamidasa humana (Costanzi, 2000; Aronovich, 2000). Així que tant el gen de la sulfamidasa humana com la canina i la murina són seqüències homòlogues amb una estructura gènica molt similar.

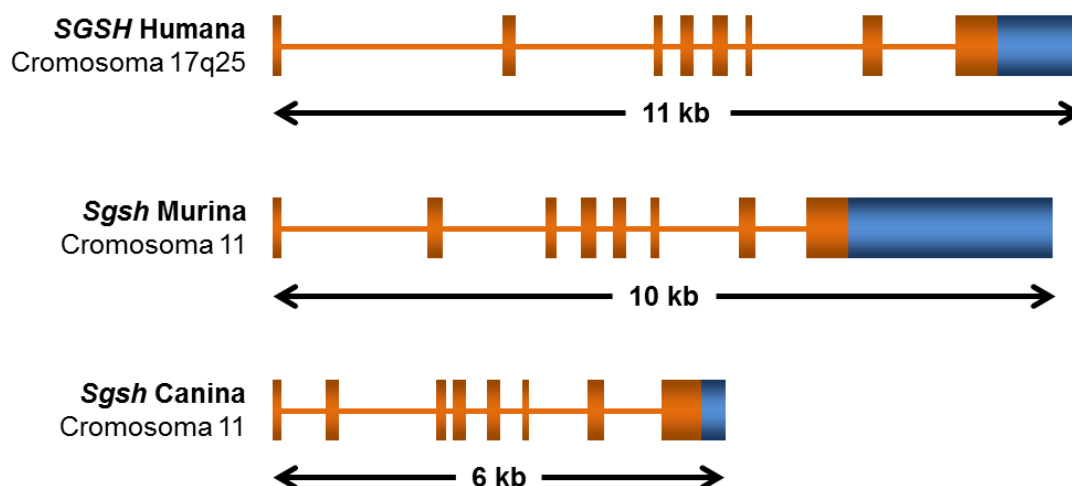


Figura 5. Localització i organització del gen de la sulfamidasa humana, murina i canina.

2.3.2. Enzim sulfamidasa

La seqüència gènica de la sulfamidasa humana conté un marc de lectura obert (o *Open Reading Frame*, ORF) de 1.506 nucleòtids el qual es tradueix en una proteïna activa de 502 aminoàcids (aa), incloent un pèptid senyal de 20 aa (Scott, 1995) (Figura 6). La sulfamidasa és un homodímer, on el pes molecular calculat per a la subunitat no glicosilada és de 56 KDa (Sidhu, 2014). Ara bé, l'anàlisi de la sulfamidasa recombinant va evidenciar dues formes diferents de subunitats, una de 56 KDa i una altre de 62-64 KDa, essent aquesta última la forma més habitual (Bielicki, 1998). El pes molecular del monòmer és d'entre 56-64 KDa depenent del patró de glicosilació existent a la Sgsh, la qual conté 5 possibles punts de glicosilació (Asn-X-Ser/Thr) a les posicions 41, 142, 151, 264 i 413 (Scott, 1995; Di Natale, 2001) (Figura 6). Tot i que prèviament es va determinar que tots els punts de glicosilació eren funcionals (Perkins, 1999), una resolució cristal·logràfica recent no ha detectat cap fosforilació a l'Asn142 (Sidhu, 2014). La mutació de l'Asn41 i Asn151 dóna lloc a l'alteració de la conformació/estabilitat de la proteïna provocant un mal plegament que condueix a una pèrdua de la funció i a una manca de la fosforilació d'aquests punts de glicosilació (Di Natale, 2001).

Entre les sulfatases, s'observen dues regions consens altament conservades localitzades a la posició N-terminal de la proteïna: dels aminoàcids 68 al 80 SSCSPSRASLLRTG, amb els residus Cys 70 i Arg74 altament conservats, com també dels aminoàcids 115 al 124 GVRTGIIGKK (Scott, 1995) (Figura 6). També hi ha l'Asp31, l'Asp32, l'Asp273 i l'Asn274 que estan altament conservades i intervenen en la coordinació del ió del metall divalent (Ca^{2+}) present al centre actiu de la sulfamidasa (Bond, 1997; Sidhu, 2014) (Figura 6). La Cys70 té una funció essencial en l'activitat enzimàtica que consisteix en l'acceptació del grup sulfat de la glucosamina de l'HS, com també intervé en la coordinació del metall divalent (Ca^{2+}) (Sidhu, 2014). Per tal de generar una sulfamidasa activa és necessària la modificació post-traducciona de la Cys70 cap a una Formilglicina (o *FormilGlycine*, FGly), per part de SUMF1 (Bond, 1997; Cosma, 2003). D'altres aa rellevants en el centre catalític de la sulfamidasa són l'Arg74, la Lys123 i la His125 que interactuen amb la FGly70, com també la His181 i l'Arg282 que s'uneixen al grup sulfat de l'HS.

La sulfamidasa murina és molt similar a la humana. Té una seqüència proteica de 502 aa amb les dues regions consens molt conservades juntament amb els altres aminoàcids que intervenen en el centre catalític de la proteïna o els punts de glicosilació (Costanzi, 2000; Bhattacharyya, 2001) (Figura 6). Ara bé, la proteïna canina té un pèptid senyal de 5 aa més respecte la humana i la murina, provocant que tant els punts de glicosilació com els residus o regions conservades estiguin desplaçats 5 posicions a la proteïna canina (Aronovich, 2000) (Figura 6). Per tant, la seqüència proteica de la sulfamidasa canina té un ORF de 1521 bp que codifiquen per 507 aa, en comparació els 502 aa de la murina i la humana. Tot i aquestes petites variacions, tant la proteïna murina com la canina tenen un 88% i un 89% d'homologia, respectivament, amb la sulfamidasa humana (Costanzi, 2000; Aronovich, 2000). Així doncs, les diferents sulfamidases tenen una seqüència proteica molt similar amb regions altament conservades.



Figura 6. Alineació de la seqüència proteica de la sulfamidasa humana, canina i murina. Les regions consens estan subratllades. Els punts de glicosilació estan emmarcats en vermell; els aa essencials per l'activitat sulfatasa, en blau; els aa essencials per la coordinació del ió del metall divalent (Ca²⁺), en verd; els aa que interactuen en la FGly70, en taronja; els aa que s'uneixen al grup sulfat, en gris. La fletxa indica el punt de tall del pèptid senyal N-terminal. *, aa idèntics; :, aa amb característiques químiques comunes; ., aa amb una mida o disposició espacial similar.

2.3.3. Mutacions al gen de la sulfamidasa humana

En el gen de la sulfamidasa humana s'han identificat més de 137 mutacions, les quals inclouen: 104 mutacions sense sentit o d'aturada de codó, 2 mutacions de canvi de lloc de splicing, 20 mutacions que provoquen delecions, 9 insercions a la seqüència nucleotídica, 1 mutació inserció/duplicació i 1 mutació inserció/deleció (Stenson, 2003). El tipus de mutació més predominant d'entre totes les identificades és la mutació sense sentit. A més, >98% dels pacients afectats per la MPSIIIA tenen com a mínim un al·lel que correspon a una mutació sense sentit, la qual dóna lloc a una sulfamidasa amb una seqüència/conformació/estructura similar a la proteïna no-mutada, fet que podria generar un cert grau de tolerància a la proteïna en els tractaments amb la sulfamidasa no-mutada (Valstar, 2010a).

La primera mutació identificada a un pacient amb Síndrome de Sanfilippo A és la deleció d'11 bp, la qual s'ha identificat gràcies a la seqüenciació del gen de la sulfamidasa humana (Scott, 1995). Aleshores, molts investigadors van avançar en la recerca de noves mutacions causants d'aquesta malaltia. Des d'aleshores, s'han identificat una gran varietat de mutacions i polimorfismes que presenten una prevalença diferent segons les àrees geogràfiques estudiades (Valstar, 2008; Meyer 2008). Per exemple, la mutació R245H provoca una desestabilització de l'empaquetament i estructura a causa d'una histidina a la posició 245 massa voluminosa (Sidhu, 2014), i com a conseqüència presenta la pèrdua de l'activitat enzimàtica (Perkins, 1999). Aquesta és una mutació molt freqüent a Alemanya amb un 35,4% de prevalença al·lèlica (Bunge, 1997), a Gran Bretanya amb un 20% (Beesley, 2000) i a Austràlia amb un 31% (Weber, 1997). Un estudi d'aquesta mateixa mutació va evidenciar una freqüència del 56,7% a Holanda (Weber, 1998), mentre que un altre estudi més recent revela la presència de la mutació R245H en un 44,9% dels al·lells (Valstar, 2010a). Tot i això, no s'ha trobat cap pacient amb aquesta mutació a Itàlia ni a Espanya (Di Natale, 2003; Montfort, 1998). La R74C provoca el canvi d'una arginina bàsica, aa essencial en la hidròlisi del sulfat de l'HS, cap a una cisteïna no polar. Aquesta mutació presenta una freqüència al·lèlica del 56,3% en pacients polacs i d'un 20,8% alemanys (Bunge, 1997). Ara bé, a Espanya predomina la mutació 1091delC, basada en la deleció d'una citosina a la posició 1091 i amb una prevalença del 45,45% (Montfort, 1998). A França, la mutació 1079delC afecta al 41% dels pacients (Héron, 2011). Finalment, la mutació

S66W trenca l'empaquetament d'una volta de 5 residus que precedeixen immediatament una hèlix α amb residus del centre actiu com la FGly70. Aquesta mutació presenta una prevalença del 33.3% a Itàlia; i se l'ha identificat a tots els pacients de Sardenya, evidenciant un efecte fundador a aquesta illa (Di Natale, 1998).

2.3.4. Correlació genotip-fenotip de la MPSIIIA

Establir una relació entre el genotip i el fenotip en la Síndrome de Sanfilippo A és complicat (Valstar, 2008). La simptomatologia clínica és molt variable, les mutacions genètiques són molt diverses i les proves clíniques per avaluar l'evolució de la malaltia als pacients són complicades de dur a terme. No obstant això, s'ha aconseguit establir una clara relació entre la mutació S298P i un fenotip més atenuat de la malaltia (Meyer, 2008; Muschol, 2004; Bunge, 1997; Valstar, 2010a). L'alteració del residu de serina, ubicat en un ambient molt hidrofòbic d'una regió no conservada entre les sulfatases, juntament amb els residus de prolina altament conservats a la posició 293 i 299 afecta a la conformació i l'estabilitat de la proteïna provocant-ne una ràpida degradació als proteosomes (Muschol, 2011). Tot i això, sembla ser que una petita part de la proteïna es dirigeix cap als lisosomes, on passa a ser funcional i se'n detecta una certa activitat residual que dona lloc a una forma menys severa de la malaltia (Muschol, 2011). En general, els pacients amb la mutació S298P en heterozigosis amb les mutacions R245H, Q380R, S66W o 1080delC mostren una regressió més lenta tant en la capacitat comunicativa com en les funcions cognitives i motores, i presenten una supervivència més prolongada (Meyer, 2008; Valstar, 2010a). Fins i tot, aquesta mateixa mutació en homozigosis ha evidenciat un fenotip molt més atenuat, amb el qual es manté la parla i la independència motora fins a l'edat adulta (Valstar, 2010a). La presència de les mutacions G122R, R206P, I322S i E369K sembla ser que també estan relacionades amb un fenotip més atenuat de la MPSIIIA (Yogalingam, 2001).

Per altra banda, els pacients amb les mutacions R245H, Q380R, S66W i 1080delC en homozigosis o bé heterozigosis presenten un fenotip molt sever amb una pèrdua de les activitats motores i intel·lectuals durant la primera dècada de vida, i una supervivència mediana de 15 anys (Valstar, 2010a). Les mutacions R74C i S66W, molt freqüents a Polònia i Itàlia respectivament (Bunge, 1997; Di Natale, 2003), presenten

una reducció dràstica de l'activitat enzimàtica com també de l'activitat específica provocant un fenotip sever en la primera mutació i un fenotip sever-intermedi en la segona (Perkins, 1999). Ara bé, la mutació R245H presenta una caiguda significativa de l'activitat enzimàtica amb una activitat específica similar als valors d'un pacient sa, suggerint que la mutació provoca una ràpida degradació de la proteïna mantenint la seva capacitat catalítica (Perkins, 1999). Aquesta mutació es relaciona amb un fenotip molt sever (Weber, 1997).

Meyer *et. al* correlaciona una activitat enzimàtica residual d'entre el 3-11% amb algunes mutacions en pacients que presenten una evolució clínica més suau (Meyer, 2008). Per tant, aquestes dades anteriors suggereixen que un 3% d'activitat sulfamidasa pot ser suficient per a una progressió més lenta de la malaltia. Tot i això, un estudi en pacients francesos amb la Síndrome de Sanfilippo A no ha trobat cap relació entre l'activitat residual de la sulfamidasa (menor del 10% d'un pacient sa) i un fenotip més suau de la malaltia (Héron, 2011). Així doncs, no es pot establir que totes les mutacions al·lèliques que condueixen a una certa activitat residual predirien una evolució més lenta amb un fenotip més lleuger de la MPSIIIA. Tant l'elevada heterogeneïtat al·lèlica com la variabilitat en l'evolució clínica de la malaltia a cada pacient dificulta la correlació genotip-fenotip. L'única correlació clara en la MPSIIIA és el fenotip més lleu present als pacients amb la mutació S298P.

2.4. Fisiopatologia de la MPSIIIA

En general, les MPSs són malalties monogèniques simples que es caracteritzen per unes alteracions fisiopatològiques molt complexes (Walkley, 2009). La MPSIIIA es caracteritza per l'acumulació de GAGs, en concret HS, als lisosomes de les cèl·lules. Els fragments d'HS i oligosacàrids derivats de l'HS acumulats als lisosomes o alliberats al medi extracel·lular poden interferir en les funcions biològiques en les que els proteoglicans formats per HS intervenen habitualment (Valstar, 2008). Ara bé, el mecanisme pel qual l'acumulació de l'HS provoca la severa neurodegeneració del SNC no està del tot elucidat (Valstar, 2008). En ratolins MPSIIIA, s'ha detectat un increment dels oligosacàrids al dia E13,5, el qual augmenta progressivament fins al moment de l'aparició dels símptomes (Hemsley, 2010; Crawley, 2006). S'ha descrit que a la Síndrome de Hurler (MPSI) i a la MPSIIIB l'acumulació extracel·lular d'oligosacàrids

de l'HS dificulta el correcte funcionament del factor de creixement de fibroblasts tipus 2 (o *Fibroblast Growth-Factor 2*, FGF-2), tot unint-se al seu receptor i impedit l'activació normal de la seva cascada de senyalització (Li, 2002; Yayon, 1991). Com que FGF-2 actua com a neuroprotector i activador de la proliferació de les neurones i les cèl·lules precursors neuronals, podria explicar l'augment de l'apoptosi i la reducció de la proliferació neuronal en aquestes malalties (Li, 2002; Yayon, 1991).

A part de l'acumulació d'HS, l'acumulació secundària de gangliòsids GM2 i GM3 i colesterol no-esterificat a diferents vesícules de les neurones també podria presentar un rol important en la patologia neurològica de la MPSIIIA (McGlynn, 2004). De fet, els pacients de la MPSIIIA presenten un marcat increment dels gangliòsids GM2 i GM3 al cervell (Constantopoulos, 1980). Si els GAGs com l'HS poden inhibir l'activitat de diversos enzims lisosòmics, incloent els que intervenen en el catabolisme dels gangliòsids (Kint 1973; Avila, 1975), tot unint-se selectivament a diverses hidrolases àcides (Walkley, 2004); la inhibició de la degradació dels gangliòsids s'hauria de dur a terme a les mateixes vesícules on s'acumula l'HS. Però sorprenentment, en la majoria de casos els gangliòsids es troben en vesícules separades de l'HS (McGlynn, 2004). Per tant, l'acumulació secundària es pot produir per la inhibició del catabolisme dels lípids, però també han d'existir altres mecanismes que la poden produir com la seva síntesi o tràfic aberrant (Hemsley, 2010; McGlynn, 2004). La seqüestració de colesterol no-esterificat a diverses vesícules es relaciona amb una alteració del funcionament correcte del sistema endolisosòmic (Walkley, 2009). De la mateixa manera, si les neurones no poden controlar correctament l'endocitosi mitjançant el sistema endolisosòmic, la disponibilitat dels receptors de neurotransmissors durant les sinapsis excitants no funciona correctament (Bredt, 2003). Per tant, l'alteració del sistema endolisosòmic pot provocar un mal funcionament neuronal que podria influir en la patologia neurològica.

Per altra banda, diverses malalties neurodegeneratives com la MPSIIIA presenten dipòsits de proteïnes ubiquïtinades a dins de les neurones que no se'n coneix la seva identitat (Savas, 2004). A més, també s'ha observat l'acumulació d'inclusions positives per a l' α -sinucleïna en pacients i ratolins de la MPSIIIB (Hamano, 2008; Hemsley, 2010), com també inclusions de la proteïna Tau (Ohmi, 2009). Tant l' α -sinucleïna com les proteïnes Tau fosforilades tendeixen a acumular-se quan hi ha un bloqueig de l'autofàgia a causa d'una fusió defectiva dels lisosomes, plens de material no degradat,

amb els autofagosomes (Settembre, 2008). Aquesta acumulació de productes tòxics a l'interior de la cèl·lula pot produir la mort cel·lular. Així, la identificació del tipus de metabòlits acumulats a les diferents poblacions neuronals podria donar una possible explicació de la patogènesi de la malaltia, i ajudar a la comprensió de la progressió/severitat, facilitant-ne el desenvolupament de noves opcions terapèutiques (Sarkar, 2009).

Un dels altres fenòmens fisiopatològics observats és la neuroinflamació del SNC, la qual consisteix en l'activació dels astròcits i la infiltració per part de la micròglia. Aquesta neuroinflamació s'ha observat a ratolins MPSIIIA tant en fases precoces (dia E18,5) com en fases més tardanes de la malaltia (Savas, 2004; Hemsley, 2008; Ruzo, 2012a; Ruzo 2012b; Hemsley, 2010). A més, s'ha observat que l'administració d'oligosacàrids derivats de l'HS provoca l'inici de l'activació de la micròglia *in vitro* (Ausseil, 2008). Altres LSDs que acumulen com a metabòlit primari els gangliòsids, p.e. la malaltia de Shandhoff, també presenten neuroinflamació al SNC (Jeyakumar, 2003). Per tant, és possible que l'acumulació primària d'HS pugui liderar l'activació de la micròglia i els astròcits del SNC, però també és possible que els metabòlits secundaris acumulats puguin intervenir en aquest procés. El que està clar és que la reducció de GAGs al cervell de ratolins MPSIIIA provoca una reducció de la microglia i l'astrocitosi (Hemsley, 2008; Ruzo, 2012a; Ruzo, 2012b).

2.5. Patologia clínica de la MPSIIIA

La Síndrome de Sanfilippo A es caracteritza per una degeneració del SNC i una afectació somàtica relativament poc severa. L'evolució clínica de la malaltia es pot classificar en tres estadis diferents. Després d'un període de desenvolupament normal, arriba la primera fase de la malaltia on els pacients d'1-4 anys presenten un retràs del desenvolupament, caracteritzat principalment per problemes en la parla (Cleary, 1993). La segona fase, entre els 3-4 anys, es caracteritza per una severa alteració del comportament amb un retràs intel·lectual progressiu (Cleary, 1993). Els atacs d'hiperactivitat, agressivitat i alteracions del son d'aquesta etapa són difícils de gestionar per la família a causa de l'estatura i força muscular normal que presenten els pacients (Cleary, 1993; Bax, 1995). Finalment, l'última etapa de la malaltia apareix al

voltant dels 10 anys caracteritzant-se per una severa demència. Els problemes de comportament desapareixen progressivament a causa de la severa neurodegeneració i la pèrdua de la locomoció fins a arribar a un estat vegetatiu amb greus problemes de disfàgia (Cleary, 1993).

En general, els quatre subtipus de Síndrome de Sanfilippo presenten una simptomatologia clínica molt similar (Valstar, 2008). Tot i això, un estudi d'un grup de pacients amb la Síndrome de Sanfilippo A, B i C suggereix que la MPSIIIA presenta una aparició de la malaltia més precoç amb unes manifestacions clíniques més severes en comparació amb la MPSIIIB i C (van de Kamp, 1981). A més, diversos estudis recents sobre el curs natural de la Síndrome de Sanfilippo també detecten una evolució més severa del subtipus A (Meyer, 2007; Valstar, 2010a; Ruijter, 2008). Tot i això, un altre estudi amb 52 pacients alemanys de la MPSIIIB evidencia una pèrdua de la parla i la independència motora similar al subtipus A, tot i que la supervivència dels pacients amb la MPSIIIB és més elevada (Valstar, 2010b). Per altra banda, un estudi amb 76 pacients francesos de la MPSIIIA, 16 de la MPSIIIB i 13 de la MPSIIIC revela una evolució bastant similar dels dos primers subtipus, amb una evolució més tardana i menys severa de la MPSIIIC (Héron, 2011). Així, tal com havia dit van de Kamp i col·laboradors, existeix molta variabilitat clínica entre els subtipus, i dins dels propis subtipus, associada possiblement a la heterogeneïtat al·lèlica i al número limitat de pacients inclosos als estudis realitzats en determinades àrees geogràfiques (van de Kamp, 1981).

2.5.1. Desenvolupament inicial i primers símptomes

El període gestacional, el part i el període neonatal normalment no presenten complicacions mes enllà de les habituals (Meyer, 2007; Valstar, 2008; Cleary, 1993). Els recent nascuts pesen de mitjana entre 3,4-3,5 Kg, valors que es troben dins dels paràmetres de normalitat (Cleary, 1993, Valstar, 2010a). Ara bé, després d'un any de desenvolupament normal, apareixen els primers símptomes de la malaltia que consisteixen en un retràs del desenvolupament i/o problemes de comportament relacionats amb hiperactivitat i agressivitat, combinat amb els primers trastorns del son (Valstar, 2010a; Meyer, 2007; Delgadillo, 2013; Cleary, 1993). L'edat de diagnòstic

dels pacients afectats per la MPSIIIA és entre els 3 i 5 anys, quan l'aparició dels primers símptomes de la malaltia comença a ser evident. No obstant això, els pacients suecs presenten una edat de diagnòstic més tardana (6,8 anys) (Delgadillo, 2013; Héron, 2011; Valstar, 2010a; Malm, 2010; Meyer, 2007).

2.5.2. Patologia neurològica

Després d'un any de desenvolupament normal adquirint les funcions cognitives i motores corresponents a la seva edat, es comença a detectar les primeres alteracions del comportament de la majoria de pacients al voltant dels 3 a 5 anys (Valstar, 2008; Valstar 2010a; Héron, 2011; Malm, 2010). Habitualment, presenten un comportament inquiet, ansiós i amb atacs de rebequeria que, combinat amb la hiperactivitat i una mobilitat i força física normal, solen ser difícils de controlar (Bax, 1995; Valstar, 2010a; Delgadillo, 2013; Héron, 2011; Malm, 2010; Meyer, 2007). Alguns pacients també mostren un comportament agressiu i totalment destructiu (Valstar, 2010a; Bax, 1995). Tot aquest conjunt de problemes de comportament desapareixen progressivament amb l'edat, com a conseqüència d'una pèrdua progressiva de les funcions del SNC i la mobilitat, donant lloc a una pèrdua total de la iniciativa (Valstar 2010a; Valstar, 2008, Bax, 1995).

A més, també s'ha detectat epilèpsia al 66% dels pacients estudiats per a aquesta afectació (Meyer, 2007; Valstar 2010a). A la majoria de casos, els atacs epilèptics solen aparèixer després de la primera dècada de vida, quan el fenotip i l'evolució de la malaltia és més severa (Valstar, 2010a; Delgadillo 2013).

El retràs del desenvolupament que sol aparèixer entre els 3 i 5 anys consisteix principalment en dificultats en la parla. Des dels 2 anys, la majoria de pacients no milloren les seves habilitats en el llenguatge, fet que els limita a un vocabulari poc extens i la possible construcció de frases curtes per tal de comunicar-se (Valstar, 2010a; Héron, 2011). A la majoria de pacients, la pèrdua de la parla succeeix a finals de la primera dècada de vida, mentre que la pèrdua de la funció motora i cognitiva s'observa a principis de l'adolescència (Meyer, 2007; Delgadillo, 2013; Héron, 2011; Valstar, 2010). Per tant, la regressió total de les funcions intel·lectuals, com la parla o la capacitat comunicativa amb l'entorn que els envolta, es perden abans que les funcions

motores (Meyer, 2007, van de Kamp, 1981, Valstar, 2010; Malm, 2010). Finalment, com a conseqüència d'aquesta regressió motora i cognitiva, els pacients acaben en un estat vegetatiu dependent totalment d'una cadira de rodes i el seu cuidador (Valstar, 2008, Bax, 1995; Cleary, 1993).

2.5.3. Trastorns del son

Els trastorns del son són un conjunt de símptomes clínics molt comuns als pacients amb la Síndrome de Sanfilippo tipus A, amb una incidència d'entre el 67-96% dels infants afectats (Malm, 2010; Valstar, 2010a). L'aparició d'aquests problemes és molt variable, tot i que el període més freqüent és entre els 3 i 5 anys, edat a la qual comencen a tenir dificultat per adormir-se, despertar-se, i fins i tot, s'aixequen diverses vegades al llarg de la nit (Valstar, 2010a; Fraser, 2005). Aquests pacients presenten uns nivells més alts de melatonina durant el dia i uns nivells més baixos durant la nit, respecte als valors d'un infant sa (Guerrero, 2006). Per tant, la producció circadiària de la melatonina està alterada, fet que pot explicar les alteracions del son presents als pacients afectats per la MPSIIIA (Guerrero, 2006; Fraser, 2005).

2.5.4. Patologia somàtica

A part de l'afectació neurològica present als pacients de la MPSIIIA, també s'ha observat tot un seguit d'alteracions somàtiques. La majoria de pacients presenten característiques facials lleugerament tosques amb presència d'hirsutisme (Valstar, 2008; Malm, 2010; Meyer, 2007; Cleary, 1993). No són molt habituals les alteracions esquelètiques als infants afectats de la Síndrome de Sanfilippo A; però els casos que en desenvolupen solen presentar deformacions òssies als malucs i a la pelvis, detectades mitjançant radiografies (Malm, 2010; Cleary, 1993; Valstar, 2010a). A més, les rigidesa d'articulacions, principalment als colzes, són poc freqüents, però poden provocar una reducció de la mobilitat (Cleary, 1993; Valstar, 2010a; Malm, 2010). A alguns pacients, també s'ha detectat cifosis i escoliosis (Malm, 2010; Delgadillo, 2013). La macrocefàlia és un altra alteració esquelètica diagnosticada de forma regular en aquests infants (van de Kamp, 1981; Meyer, 2007, Cleary, 1993). Finalment, la presència d'hepatomegàlia

també és bastant freqüent, mentre que l'esplenomegàlia és més rara (Cleary, 1993; van de Kamp, 1981; Valstar, 2010a).

Les infeccions del tracte respiratori i les otitis són dels primers símptomes que, amb el pas del temps, passen a ser una problemàtica habitual als pacients afectats (Valstar, 2008; Valstar, 2010a; Malm, 2010). Les diarrees són un dels altres símptomes present als infants amb aquesta malaltia (Cleary, 1993; Malm, 2010; Valstar, 2010a). Un dels símptomes més crítics d'avaluar en aquests pacients és la funció auditiva i visual, com a conseqüència de les alteracions cognitives que presenten al SNC. Tot i això, s'ha aconseguit detectar que un bon nombre de pacients presenten problemes d'audició (entre el 33-45% dels pacients), com també alteracions de la visió que, principalment, sol ser miopia (Meyer, 2007; Valstar, 2010a; Malm, 2010). Alguns pacients també presenten hernies (Meyer, 2007; Malm, 2010; Delgadillo, 2013).

2.5.5. Mort

Segons diversos estudis realitzats a la població de pacients afectats per la MPSIIIA procedents de diferents àrees geogràfiques, les afectacions multisistèmiques de la malaltia deterioren la salut del pacient conduint-lo a un estat vegetatiu fins a arribar a la mort durant l'adolescència (Meyer, 2007; Delgadillo, 2013; Malm, 2010; Héron, 2011; Valstar, 2010a; Cleary, 1993). L'edat mediana de mort a la majoria de regions estudiades és al voltant dels 15 anys; tot i que s'ha observat que els pacients del Regne Unit tenen una supervivència menor (13 anys), fet que contrasta amb un estudi de la població holandesa afectada per la MPSIIIA on la mortalitat és més tardana (18 anys) (Meyer, 2007; Delgadillo, 2013; Malm, 2010; Héron, 2011; Valstar, 2010a). La principal causa de mort detectada als pacients holandesos i espanyols és infecció respiratòria (Valstar, 2010a; Delgadillo, 2013).

2.6. Diagnòstic de la MPSIIIA

La deficiència de l'activitat d'un enzim lisosòmic que provoca l'acumulació de GAGs és el primer fenomen bioquímic detectat a les MPSs. Un dels primers diagnòstics realitzats en qualsevol MPS consisteix en la quantificació de GAGs en orina (Lawrence, 2014). Al llarg de la història, s'han descrit diferents tècniques per a realitzar aquesta quantificació, des de mètodes semiquantitatius com els *spot test* fins a mètodes quantitativs (Valstar, 2008). Actualment, el mètode més utilitzat és el test d'unió a un tint de blau de dimetil metilè (o *Dimethylmethylene Blue*, DMB) (de Jong, 1989) seguit d'un assaig espectrofotomètric, gràcies a la seva simplicitat metodològica i el fàcil accés a un kit comercial (*BlyscanTM*) (Lawrence, 2014). Alguns dels principals inconvenients del DMB són: (i) no-identificació del tipus de GAG excretat en orina; i (ii) difícil detecció dels pacients amb un fenotip atenuat que tenen una secreció de GAGs just per sobre dels valors de referència (Lawrence, 2014; Valstar, 2008). Per tant, una combinació del test DMB juntament amb una separació per electroforesis 2-D, la qual permetria la identificació del tipus de GAG, són els mètodes d'elecció pel diagnòstic preliminar de les MPSs. Per tant, si es detecta un augment de l'heparan sulfat, sense cap increment del dermatan sulfat o queratan sulfat, indica que el pacient pateix la Síndrome de Sanfilippo. Finalment, els assaigs enzimàtics amb substrats units a un fluoròfor artificial (4-metilumbeliferona) que es realitzen en plasma, leucòcits o fibroblasts permeten la identificació del subtipus de MPSIII (A, B, C o D) per arribar al diagnòstic definitiu del pacient (Karpova, 1996; Marsh, 1985; Voznyi, 1993; He, 1993).

Un altre mètode útil per a la identificació de l'augment i el tipus de GAG és l'anàlisi dels oligosacàrids derivats de les molècules de GAGs, les quals també s'acumulen tant en plasma com en orina (Lawrence, 2014; Fuller, 2004). La utilització de l'espectrometria de masses en tàndem permet la identificació d'alguns subtipus de MPS mitjançant un perfil d'oligosacàrids totalment específic sense necessitat d'un anàlisi posterior del tipus de GAG (Fuller, 2004). Seguint aquesta línia, s'ha desenvolupat l'assaig *Sensi-Pro[®]* que consisteix en la combinació d'una digestió mitjançant liases bacterianes, i la cromatografia líquida/espectrometria de masses marcant isòtops reductors dels glicans (o *Glycan Reductive Isotope Labeling–Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*, GRIL-LC/MS). Aleshores, els resultats obtinguts permeten la identificació dels diferents tipus de MPSs segons el terminal no reduït (o

Non-Reducing End, NRE) associat com a biomarcador d'un tipus específic de MPS (Lawrence, 2012) (Figura 7). D'aquesta manera, aquesta prometedora tècnica presenta diverses avantatges respecte les anteriors: (i) els biomarcadors NRE són exclusius entre ells i permeten identificar un tipus concret de MPS; (ii) l'anàlisi simultani de múltiples biomarcadors NRE en una mateixa mostra; (iii) els biomarcadors són molt abundants a les mostres dels pacients afectats; i (iv) és un mètode extremadament sensible (Lawrence, 2012). Per tant, l'assaig *Sensi-Pro*[®] és un bon mètode pel diagnòstic dels pacients i com a biomarcador per l'estudi de l'evolució i/o resposta del pacient al tractament.

La majoria de diagnòstics se solen realitzar mitjançant mostres d'orina, plasma, leucòcits o fibroblasts frescs. Ara bé, és necessari algun mètode de recollida de mostres alternatiu amb un resultat robust per a la detecció de les MPSs de regions aïllades o sense un laboratori de referència pròxim. Per aquest motiu, l'orina seca recollida en un paper de filtre (o *Dried-Urine Filter Paper*, DUFP) permet la quantificació de GAGs pel mètode de DMB amb uns valors totalment comparables amb els resultats d'orina en fresc (Civallero, 2013a). A més, els leucòcits secs impregnats en un paper de filtre (o *Dried Leukocytes impregnated in Filter Paper*, DLFP) també serveixen pels assaigs enzimàtics per a la identificació del subtipus A de la Síndrome de Sanfillippo (Civallero, 2013b). Per tant, ambdues tècniques de recollida de mostra permeten la detecció de l'acumulació de GAGs i la identificació de la MPSIIIA. Així doncs, és necessari el desenvolupament d'una bateria d'assaigs enzimàtics en DLFP per a la resta de MPSs per tal de diagnosticar els pacients procedents de regions amb dificultat d'accés o bé limitats recursos per conservar les mostres en fresc (Civallero, 2013a; Civallero, 2013b).

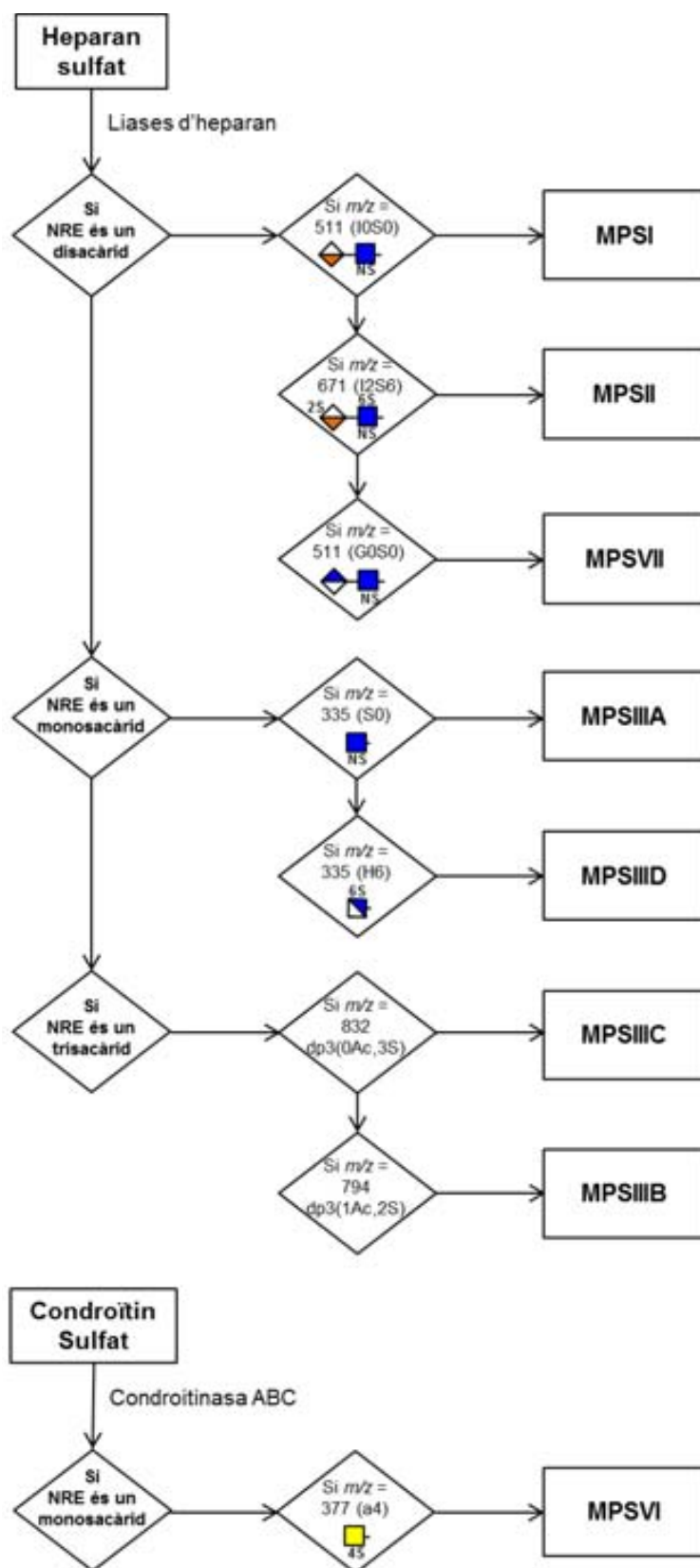


Figura 7. Esquema del diagnòstic sistemàtic de les mostres de GAGs de pacients afectats per una MPS després de la tècnica basada en els NRE dels GAGs. Adaptat de Lawrence, 2012. m/z: coeficient massa/càrrega.

2.6.1. Diagnòstic prenatal de la MPSIIIA

L'elevada heterogeneïtat al·lèlica dins de cada subtipus de MPS provoca que no es pugui realitzar un diagnòstic prenatal ràpid, senzill i econòmic a tota la població. Per tant, el diagnòstic prenatal només se sol realitzar si existeix algun antecedent familiar previ. Aquestes famílies poden recórrer a la identificació genètica de la mutació causant de la MPS per tal de poder fer un diagnòstic genètic preimplantacional als següents embarassos. Ara bé, si la mutació no s'ha identificat, es pot realitzar l'assaig d'activitat enzimàtica de la MPS diagnosticada prèviament a la família en: (i) mostres de les vellositats coriòniques, (ii) cultius cel·lulars de les vellositats coriòniques o bé (iii) mostres d'una amniocentesis (Hopwood, 2005; He, 1994).

2.6.2. Diagnòstic postnatal de la MPSIIIA

La necessitat de diagnosticar les mucopolisacaridosis abans que l'acumulació de GAGs causi efectes irreversibles, i d'aquesta manera es pugui administrar un tractament terapèutic el més aviat possible, ha fet que la ciència evolucioni molt en el diagnòstic de les MPSs en recent nascuts. La tècnica ideal és un únic test senzill i econòmic per a la detecció de qualsevol MPS. En aquesta direcció, diversos estudis han identificat diferents biomarcadors d'aquest grup de malalties, com per exemple: el complex de trombina amb el cofactor II de l'heparina (Randall, 2008); la dipeptidil peptidasa IV (Beesley, 2009); i les proteïnes relacionades en l'estabilitat estructural dels lisosomes, LAMP1 i LAMP2 (Meikle, 1997; Hua, 1998). A més, la identificació dels oligosacàrids derivats de l'HS i el dermatan sulfat pel diagnòstic de la MPS I, II i III en sang seca recollida en un paper (o *Dried-Blood Spot*, DBS), que podria servir per la MPSVI i MPSVII per l'acumulació dels mateixos tipus de GAGs, és un altre mètode possible (de Ruijter, 2012a). Fins i tot, el DBS en recent nascuts pot servir com a material biològic per a l'anàlisi de l'activitat enzimàtica deficient a cada MPS. Actualment, a Catalunya es detecten precoçment fins a 22 malalties metabòliques hereditàries rares mitjançant DBS. No obstant això, alguns mètodes anteriorment mencionats són poc robusts, i a més, no permeten la identificació de cada MPS amb un únic assaig. La nova tècnica *Sensi-Pro*[®] mitjançant la detecció dels NRE específics és una eina de diagnòstic en DBS per a la majoria de MPSs, però és necessària la identificació de NRE per a la MPSIV i

la MPSIX (Lawrence, 2012) (Figura 7). Tot i ser una tècnica robusta i fiable, és necessari el desenvolupament d'altres tècniques més accessibles econòmicament per poder-les realitzar de forma rutinària a tota la població.

2.7. Models animals de la MPSIIIA

Els models animals de malalties humanes són una eina molt útil per a l'estudi dels mecanismes fisiològics que causen la pròpia malaltia com també la investigació de noves aproximacions terapèutiques per tal de trobar la seva cura. Actualment, existeixen molts models animals de malalties que es poden generar mitjançant la manipulació genètica o bé gràcies a les mutacions espontànies en determinades espècies animals. En el cas de la MPSIIIA, hi ha tres models animals que reproduïxen la malaltia humana: el ratolí (Bhaumik, 1999), el gos de raça Huntaway (Jolly, 2000) i el gos de raça Wirehaired Dachsund (Fischer, 1998).

2.7.1. Model murí de la MPSIIIA

El ratolí MPSIIIA que reproduïx la malaltia humana es va generar per una mutació espontània i puntual al gen de la sulfamidasa humana (Bhattacharyya, 2001). En concret, la posició 91 de la seqüència nucleotídica ha patit un canvi de bases puríniques (G91A) que ha provocat el canvi d'un àcid aspàrtic de la seqüència proteica per una asparagina (D31N), interferint directament al centre catalític d'aquesta sulfatasa (Bhattacharyya, 2001). L'àcid aspàrtic D31 en combinació amb el D32 estan involucrats en la coordinació del ió metàl·lic divalent durant el procés de sulfatació (Bond, 1997; Sidhu, 2014). Aquesta mutació provoca que l'activitat residual de la sulfamidasa sigui només d'entre un 3-4% (Bhaumik, 1999, Crawley, 2006). A causa d'aquesta deficiència, el ratolí model de la MPSIIIA acumula heparan sulfat al SNC i a diversos teixits perifèrics com el fetge, el pulmó, la cor, la melsa, el ronyó i la bufeta urinària (Bhaumik, 1999; King, 2006; McGlynn, 2004). L'estudi de la ultraestructura de les neurones del còrtex cerebral, les cèl·lules perivasculars i les cèl·lules Purkinje del cerebel ha revelat que el ratolí model de la MPSIIIA presenta una elevada distensió lisosòmica amb vacuoles de diferents mides (Bhaumik, 1999; Crawley, 2006; Gliddon,

2004; Savas, 2004). Tal com s'observa en la patologia humana (Constantopoulos, 1980), també s'ha detectat l'acumulació secundària de gangliòsids GM2 i GM3 i colesterol no esterificat al cervell dels ratolins afectats (McGlynn, 2004). A més, els ratolins MPSIIIA presenten una reacció inflamatòria molt pronunciada a tot l'encèfal, detectat per una activació dels astròcits i una infiltració de la micròglia activada (Hemsley, 2009a).

Per altra banda, el model murí per a la MPSIIIA també presenta alteracions del comportament. A partir de les 6 setmanes, el ratolins MPSIIIA tenen un comportament menys actiu i ansiós que els controls (Hemsley, 2005; Lau, 2008). A les 15 setmanes d'edat, la reducció de la força neuromuscular i l'amplada dels passos evidencien problemes motors als ratolins MPSIIIA (Crawley, 2006; Hemsley, 2005). A més, també s'ha observat altres alteracions del comportament relacionades amb dèficits cognitius, com la pèrdua de l'aprenentatge i la memòria espacial a les 20 setmanes (Gliddon, 2004; Crawley, 2006).

Finalment, els animals afectats per la malaltia tenen una supervivència d'entre 7-12 mesos (Bhaumik, 1999; Crawley, 2006), tot i que també s'ha publicat una supervivència superior de fins a 13-16 mesos d'edat en ratolins MPSIIIA C57BL/6 establats en instal·lacions lliure de determinats patògens (Ruzo, 2012a; Ruzo, 2012b). Per tant, el tipus d'establació dels animals pot tenir un efecte directe en l'edat de supervivència. A punt final, els ratolins presenten una clara distensió de la bufeta a causa de la retenció d'orina, on s'hi acumula l'heparan sulfat provinent d'altres teixits de l'organisme que l'han eliminat mitjançant exocitosis (Bhaumik, 1999; Crawley, 2006). Tots els ratolins MPSIIIA presenten hepatosplenomegàlia evident a edats avançades (Bhaumik, 1999; Crawley, 2006).

2.7.2. Model caní de la MPSIIIA

Com a model animal caní per a la MPSIIIA, existeixen dos models que reproduïen la malaltia, tot i que presenten dos tipus de mutacions diferents que provoca una aparició i evolució diferent de la malaltia. El gos de raça Huntaway presenta una inserció d'una adenosina a la posició 708-709 que provoca un desplaçament de la pauta de lectura generant una terminació prematura de la traducció de la proteïna en la posició 228 (Yogalingam, 2002). L'aparició clínica de la malaltia succeeix a 1,5 anys d'edat amb una evolució molt ràpida durant un mes, desencadenant una severa atàxia degut a una manca total d'activitat sulfamidasa (Jolly, 2000). A nivell molecular, aquests gossos presenten diverses vacuoles disteses a diferents tipus cel·lulars del cervell com també al fetge i al ronyó (Jolly, 2007). A més, també s'ha observat l'aparició d'acumulacions secundàries de GM2 i GM3 a neurones, astròcits i cèl·lules de la glia (Jolly, 2007). Després de la identificació del model animal caní de la MPSIIIA, es va establir una colònia amb els gossos de raça Huntaway pel desenvolupament d'aproximacions terapèutiques per a la MPSIIIA en un model animal gran (Hemsley, 2009b, Crawley, 2011).

Per altra banda, es va descriure el gos de raça Wirehaired Dachshunds com a model animal de la MPSIIIA a causa de la deleció de tres parells de bases a la posició 737-739 al gen de la sulfamidasa, que causava la pèrdua de la treonina a la posició 246 (Aronovich, 2000). Aquesta mutació va afectar tant al processament com a l'estabilitat de la sulfamidasa provocant un mal plegament de la proteïna al reticle endoplasmàtic (Aronovich, 2000; Yogalingam, 2002). Tot i això, es va detectar al voltant d'un 2% d'activitat residual sulfamidasa, possiblement pel fet que la proteïna mantenia certa capacitat catalítica (Fischer, 1998; Aronovich, 2000; Yogalingam 2002). A més, també es va detectar la presència d'HS a orina, com també l'acumulació d'aquests GAGs a fetge (Fischer, 1998). Gràcies a l'activitat residual de la sulfamidasa, l'aparició de la malaltia va ser més tardana, al voltant dels tres anys d'edat, i va evolucionar progressivament cap a una atàxia espinocerebel·losa durant un període de 2 anys (Fischer, 1998).

2.8. Tractaments per a la MPSIIIA

2.8.1. Tractament simptomàtic

Actualment no hi ha cap teràpia aprovada pel tractament de la MPSIIIA. Així que els pacients únicament poden rebre un tractament per pal·liar la simptomatologia clínica de la malaltia, millorant-ne la seva qualitat de vida. Un dels principals problemes del pacients afectats és el conjunt d'alteracions del comportament, tals com l'agressivitat, hiperactivitat, l'autolesió, etc. Aquests símptomes es poden tractar mitjançant l'ús de fàrmacs, com els antipsicòtics o les benzodiazepines, o bé realitzar un canvi i adaptació de l'entorn per crear un ambient més segur pel pacient (Cleary, 1993). Si els problemes de comportament persisteixen, s'observa una millora gràcies a l'eliminació de la pressió cranioencefàlica de pacients amb la Síndrome de Sanfilippo mitjançant el drenatge del LCR (Robertson, 1998). Aquesta pressió cranioencefàlica sembla ser que la causaria l'augment de la grossor de les meninges per l'acumulació de GAGs (Muenzer, 1986). Per altra banda, els trastorns del son es poden tractar efectivament mitjançant l'ús de melatonina, fàrmac que millora el ritme circadiari del pacient, com també les benzodiazepines, el segon medicament amb eficàcia terapèutica demostrada per a aquest símptoma (Fraser, 2005). A més, la utilització de cinturons elàstics al llit, per tal d'evitar que els infant afectats s'aixequin durant la nit però donant-los certa mobilitat, també és una bona tècnica per millorar les alteracions del son (Cleary, 1993). L'epilèpsia és un altre problema neurològic, el qual es pot gestionar correctament administrant la medicació adequada per a aquest símptoma (Valstar, 2010a). Finalment, la resta d'aspectes clínics de la malaltia s'han de tractar de forma pal·liativa segons les necessitats de cada pacient, com les intervencions quirúrgiques pels problemes ossis, l'adenectomia per les infeccions recurrents del tracte respiratori, la loperamida pel tractament de la diarrea, etc.

2.8.2. Teràpia de reducció de substrat

La teràpia de reducció de substrat consisteix en la inhibició de la síntesis de GAGs per part de petites molècules que siguin capaces de creuar la BHE i evitar l'excessiva acumulació de GAGs als lisosomes de les cèl·lules. A més, també s'han estudiat d'altres

molècules per utilitzar-les en la teràpia de reducció de substrat, com les isoflavones. La *genisteïna* és una isoflavona que redueix l'acumulació de GAGs a fibroblasts de pacients de la MPSI, MPSII, MPSIIIA i MPSIIIB (Piotrowska, 2006). Aquesta isoflavona actua inhibint l'activitat quinasa del receptor del factor de creixement de l'epidermis, el qual inicia la cascada de senyalització que resulta en la regulació dels factors de transcripció que activen l'expressió dels gens codificants pels enzims involucrats en la producció de GAGs (Piotrowska, 2006). A partir d'aquí, es van dissenyar diversos assaigs clínics pel tractament amb genisteïna de pacients amb la Síndrome de Sanfilippo. A una dosi de 5 mg/Kg/dia, es va observar una petita millora de les funcions cognitives, els problemes de comportament i el deteriorament general durant els 3 anys de seguiment dels pacients (Piotrowska, 2011), tot i que seguiments més curts (1 any) no van evidenciar cap millora significativa (Delgadillo, 2011). L'augment de la dosi fins a 10 mg/Kg/dia durant 12 mesos de seguiment dels pacients només va revelar una lleugera reducció de l'excreció de GAGs en orina i la concentració d'HS en plasma sense cap més eficàcia clínica (de Ruijter, 2012b). Però augmentant fins a 15 mg/Kg/dia va semblar que tenia efectes positius d'eficàcia terapèutica detectat amb els següents biomarcadors: nivells de GAGs en orina, morfologia del cabell i avaluació dels símptomes clínics als pacients tractats (Malinová, 2012). Recentment, altres isoflavones similars a la genisteïna van demostrar la capacitat de reducció dels dipòsits de GAGs a fibroblasts, demostrant un efecte sinèrgic gràcies a la combinació entre elles (Arfi, 2010; Kloska, 2011). Així doncs, la teràpia de reducció de substrat presenta certa eficàcia terapèutica amb algunes molècules, però són necessaris nous assaigs clínics per optimitzar els procediments terapèutics.

També s'han estudiat altres molècules per utilitzar-les en la teràpia de reducció de substrat. La *Rodamina B* és un inhibidor inespecífic de la síntesis de GAGs que provoca la reducció de la seva acumulació i la millora de les funcions del SNC a ratolins MPSIIIA tractats a una dosi baixa d'1mg/Kg (Roberts, 2006; Roberts, 2007). Una dosi alta de rodamina B pot provocar toxicitat a fetge, però l'administració continuada amb una dosi baixa a ratolins MPSIIIA no va evidenciar cap toxicitat ni efectes adversos durant l'embaràs o en les subsegüents ventrades de ratolins (Roberts, 2010). Per altra banda, el *miglustat* és un petit iminosucre que inhibeix de forma reversible l'activitat glucosilceramida sintasa, que catalitza el primer pas de la síntesis dels esfingolípids (Platt, 1994). A més, és capaç de creuar la BHE (Treiber, 2007) i reduir els nivells de

gangliòsids a models animals de gangliosidosis (Platt, 1994). Actualment, el miglustat s'utilitza pel tractament dels pacients de la Síndrome de Gaucher tipus I, que l'ERT no és eficaç, i la Niemann-Pick tipus C (Pineda, 2010; Elstein, 2004). Però el tractament de pacients amb la Síndrome de Sanfilippo no va demostrar cap reducció de l'acumulació de gangliòsids ni cap millora o estabilització dels problemes de comportament (Guffon, 2011).

2.8.3. Teràpia de millora de l'activitat enzimàtica

La majoria dels pacients amb la Síndrome de Sanfilippo tipus A tenen mutacions sense sentit que, en alguns casos, poden donar lloc a un mal plegament de la proteïna. Com a conseqüència directa, l'enzim és eliminat ràpidament pel propi mecanisme de degradació, tot i que la proteïna pot presentar certa activitat enzimàtica residual. Per tant, la teràpia de millora enzimàtica consisteix en l'ús de petites molècules que permeten el plegament correcte de les proteïnes mutades, per tal de mantenir un cert nivell d'activitat capaç de degradar els GAGs acumulats. Aquest tipus de tractament ha estat àmpliament estudiat per algunes LSDs com la malaltia de Fabry, Pompe i Gaucher (Aymami, 2013), però no tant a les MPSs (Valstar, 2008). A la MPSIIIC, la qual presenta diverses mutacions sense sentit que provoquen un mal plegament proteic, es va aconseguir rescatar parcialment l'activitat de cultius de fibroblasts de pacients humans gràcies a l'actuació de la glucosamina (Feldhammer, 2009). Aquesta molècula és un inhibidor competitiu de l'heparan- α -glucosaminida N-acetiltransferasa que, en aquest cas concret, actua com a xaperona farmacològica unint-se al seu centre catalític per modificar la seva conformació, permetre el correcte plegament i incrementar els nivells d'activitat enzimàtica residual per tal de revertir el fenotip (Feldhammer, 2009). La teràpia de millora de l'enzim no és una de les aproximacions terapèutiques estudiades per a la MPSIIIA, però pot ser útil pel tractament de determinades mutacions que donen lloc a un mal plegament proteic.

2.8.4. Teràpia de substitució enzimàtica

L'ERT consisteix en l'administració de la versió correcta de l'enzim deficient causant de la malaltia que, posteriorment, és recaptat per les cèl·lules via el receptor manosa-6-fosfat present a la membrana plasmàtica. L'ERT és un dels tractaments més efectius per a algunes MPSs (Noh, 2014). A data d'avui, l'Agència Europea del Medicament (o *European Medicines Agency*, EMA) i la *Food and Drug Administration* (FDA) tenen aprovats tres enzims humans recombinants com a productes terapèutics per a les MPSs mitjançant la seva administració per via intravenosa: laronidasa (*Aldurazyme*[®]) pel tractament de la MPS I, idursulfasa (*Elaprase*[®]) per la MPS II, i galsulfasa (*Naglazyme*[®]) per la MPS VI. El benefici terapèutic aportat per aquestes teràpies és una millora general de la patologia somàtica en els següents aspectes: la mobilitat de les articulacions, la capacitat motriu, la funció pulmonar i respiratòria, l'hepatosplenomegàlia, com també l'excreció de GAGs en orina (Muenzer, 2011a; Muenzer, 2011b; Muenzer, 2007; Wraith, 2004; Clarke, 2009; Harmatz, 2006; Harmatz, 2010). Tot i això, l'ERT presenta limitacions importants com l'elevat cost del producte farmacèutic, la necessitat de repetides administracions de l'enzim recombinant, i el fracàs de la correcció de les malformacions òssies i les afectacions neurològiques d'algunes LSDs (Noh, 2014).

Durant l'última dècada s'han realitzat diversos estudis pel tractament de la MPSIIIA mitjançant l'ús de l'ERT. L'administració intravenosa de la sulfamidasa humana recombinant a ratolins MPSIIIA recent nascuts va resultar en una reducció de les vacuoles a les cèl·lules del SNC juntament amb una correcció del comportament; mentre que ja no es va observar cap millora significativa als ratolins afectats tractats a 6 setmanes d'edat (Gliddon, 2004). Aquesta diferència de l'eficàcia terapèutica obtinguda als ratolins MPSIIIA tractats amb ERT es va atribuir a la BHE, que es tancava a les 10-14 setmanes d'edat impedit l'entrada de la sulfamidasa recombinant al SNC dels ratolins administrats més tard (Gliddon, 2004). Per tal de creuar la barrera hematoencefàlica i obtenir una millora de les afectacions neurològiques de la MPSIIIA, és necessari l'administració de la sulfamidasa directament al SNC. Els ratolins MPSIIIA tractats amb una injecció directa al parènquima cerebral van evidenciar una reducció en l'evolució de la neuropatologia (Savas, 2004). Tot i això, l'administració de l'enzim recombinant directa al LCR va aconseguir una àmplia distribució de la sulfamidasa a tot

el SNC que provocava una millora de l'acumulació de GAGs i una reducció de la neuroinflamació (Hemsley, 2008). De manera similar, el tractament amb ERT administrada directament al LCR del gos Huntaway afectat per la MPSIIIA va permetre la detecció de la sulfamidasa a àrees molt disperses del SNC que resultaven en una disminució de les vacuoles d'HS com també de la neuroinflamació (Hemsley, 2009b, Crawley, 2011). A més, la combinació de repetides administracions intravenoses de la sulfamidasa recombinant a ratolins recent nascuts, seguides d'infusions directes al LCR a partir de les 6 setmanes d'edat, va demostrar la mateixa eficàcia terapèutica en comparació amb ratolins tractats amb infusions directes de l'enzim deficient a la cisterna magna (Hemsley, 2009a). La combinació de les dues vies d'administració testada en gossos MPSIIIA també va revelar el mateix benefici terapèutic observat en ratolins afectats (Hemsley, 2009b; Crawley, 2011). Per tant, l'administració de la sulfamidasa recombinant directament al LCR és la ruta més eficaç pel tractament de la simptomatologia neurològica de la MPSIIIA. Aquestes dades són la base preclínica per a la translació cap a un assaig clínic en humans de l'aproximació terapèutica basada en l'administració directa al LCR de l'enzim recombinant. Actualment, l'administració directa i periòdica (mensualment) de la sulfamidasa humana recombinant al SNC es va testar a pacients afectats per la MPSIIIA de com a mínim 3 anys d'edat i una edat mental d'un any (NCT01155778 i NCT01299727, clinicaltrials.gov). Tot i això, l'avaluació preliminar va evidenciar que l'eficàcia terapèutica de l'estudi clínic anterior no era molt exitosa (Wijburg, 2013). En base a aquests resultats, es va iniciar un nou assaig clínic de la mateixa companyia farmacèutica (Shire Development, LLC) a pacients MPSIIIA en estadis més precoços de la malaltia (entre 1-4 anys d'edat) amb l'administració de la sulfamidasa recombinant quinzenalment (NCT02060526, clinicaltrials.gov). Per altra banda, un estudi recent en ratolins ha demostrat en ratolins una millora de la patologia central i la recuperació del comportament normal, després de la modificació de la sulfamidasa afegint el pèptid senyal de la iduronat-2-sulfatasa, sulfatasa altament secretada, i el domini d'unió a la BHE de l'Apolipoproteïna B, per tal que per transcitosi a través de la BHE, la sulfamidasa entri al SNC després d'una administració intravenosa (Sorrentino, 2013). Per tant, és possible una nova estratègia terapèutica mínimament invasiva pel tractament de la patologia central de la MPSIIIA.

En general, els principals inconvenients de la teràpia basada en ERT són: (i) els elevats costos derivats de la producció de la proteïna recombinant; (ii) les repetitives

administracions de l'enzim, com a conseqüència de la curta vida de la sulfamidasa, en infants amb problemes de comportament i (iii) la limitació de l'enzim no modificat genèticament per creuar la BHE pel tractament de l'afectació neurològica (Enns, 2008),.

2.8.5. Teràpia amb cèl·lules mare hematopoètiques

La teràpia amb cèl·lules mare hematopoètiques es va aplicar amb èxit en el tractament d'alguns tipus de MPSs com la MPSI, MPSVI i la MPSVII (Peters, 2003; Peters, 1996; Yamada, 1998). Aquest tractament consisteix en el transplantament de cèl·lules mare hematopoètiques (o *Hematopoietic Stem Cell Transplantation*, HSCT), les quals poden provenir de la medul·la òssia o la sang del cordó umbilical, al pacient afectat per tal d'administrar una font productora de l'enzim deficitari. Les cèl·lules mieloides del donador van ser capaces de creuar la barrera hematoencefàlica i diferenciar-se en cèl·lules de la micròglia que secretaven l'enzim deficient provocant la correcció creuada de les altres cèl·lules del SNC (Krivit, 1995). En alguns casos, la HSCT pot donar lloc a problemes d'empeltament, o fins i tot, la malaltia empelt vs. hoste, on el material recentment trasplantat ataca el cos receptor del transplantament.

El tractament de 19 pacients de la MPSIIIA utilitzant cèl·lules hematopoètiques de la sang del cordó umbilical no va ser massa exitós a causa de l'alta morbidesa i mortalitat (Prasad, 2008). Van sobreviure 12 pacients, dels quals 9 van aconseguir una estabilització de la malaltia sense cap impacte en la millora de la funció cognitiva (Prasad, 2008). Per altra banda, el tractament d'un pacient de 10 mesos amb cèl·lules hematopoètiques de la medul·la òssia no va evidenciar cap millora neurològica, tot i la presència una activitat enzimàtica a leucòcits similar a la del pacient donador sa després de 8 anys de tractament (Sivakumur, 1999). Així doncs, l'única eficàcia terapèutica demostrada en la Síndrome de Sanfilippo A va ser en ratolins afectats tractats amb HSCT sanes modificades genèticament *ex vivo* amb un vector lentiviral que expressa el gen de la sulfamidasa (Langford-Smith, 2012). D'aquesta manera, es va aconseguir al voltant d'un 10% d'activitat sulfamidasa al SNC que permetia la millora del comportament, la reducció de la neuroinflamació i la reducció de l'acumulació d'HS i GM2 (Langford-Smith, 2012).

3. TERÀPIA GÈNICA

3.1. Introducció a la teràpia gènica

La teràpia gènica és una estratègia terapèutica prometedora que consisteix en la introducció de material genètic exogen a dins d'una cèl·lula o teixit per tal de prevenir, aturar o revertir la patologia d'una malaltia (Mulligan, 1993). Hi ha dos tipus d'aproximacions en teràpia gènica: *ex vivo* o *in vivo*. La primera es basa en l'extracció de cèl·lules del pacient per modificar-les genèticament *in vitro* mitjançant un vector i, seguidament, es reimplanten de nou a l'individu (Parenti, 2013). Per altra banda, la teràpia *in vivo* consisteix en la modificació genètica *in situ* de les cèl·lules d'un teixit mitjançant l'ús d'un vector administrat directament al pacient (Parenti, 2013).

La transferència genètica es pot dur a terme mitjançant dos tipus de vectors: no virals i virals. Els vectors no virals usen les característiques físico-químiques del propi DNA per transferir-lo directament nu, per electrotransferència o bé encapsulats dins de amb liposomes o polímers catiónics. Mentre que els vectors virals usen les pròpies vies d'infecció natural dels virus per entrar el DNA d'interès a la cèl·lula, per tal de transferir-lo al nucli i aconseguir la seva expressió. El mètode escollit per a la transferència del material genètic ha d'aconseguir modificar un nombre suficient de cèl·lules o teixits per obtenir el benefici terapèutic desitjat durant un determinat període de temps. Per tant, l'elecció del vector per modificar genèticament un tipus cel·lular o un teixit depèn directament del tipus de malaltia i els òrgans afectats. La gran avantatge que presenta la teràpia gènica pel tractament de les LSDs és la possibilitat d'assolir l'expressió a llarg termini del transgèn, segons el vector viral escollit, evitant les repetides administracions de l'enzim recombinant necessàries en l'ERT.

La transferència gènica realitzada pot consistir en l'addició, l'edició i *knockdown* (o genoinvat) del gen d'interès. L'addició del gen consisteix en la introducció del material genètic per tal d'augmentar l'expressió d'un gen endogen o introduir un gen no-mutat (Kay, 2011). L'edició gènica es basa en l'ús de les tecnologies de DNA recombinant, zinc-fingers, TALENS, meganucleases, etc. per tal d'alterar les seqüències gèniques per corregir o crear mutacions (Kay, 2011; Urnov, 2010). En últim terme, el *knockdown* del gen consisteix en la disminució de l'expressió de gens endògens per tal d'obtenir l'efecte terapèutic desitjat utilitzant diverses tecnologies, com per exemple el

RNA d'interferència (Davidson, 2011). A més, la modulació de l'expressió gènica als teixits cel·lulars també es pot modificar segons el tipus de promotor utilitzat o bé amb l'ús d'elements reguladors, com per exemple, l'element regulador post-transcripcional del virus de l'hepatitis de marmota (o *Woodchuck Posttranscriptional Regulator Element*, WPRE), el qual augmenta l'estabilitat del mRNA incrementant l'expressió del gen transferit (Zufferey, 1999).

Actualment, la teràpia gènica ha esdevingut una eina molt prometedora pel tractament d'un ampli ventall de malalties. Els avantatges que presenten les LSDs són: (i) malalties monogèniques on cal subministrar l'únic gen mutat; i (ii) un petit augment de l'activitat enzimàtica per sobre el 10% pot donar lloc a l'efecte terapèutic desitjat (Parenti, 2013). Tot i que normalment seria imprescindible el tractament de totes les cèl·lules de l'organisme per revertir els efectes de la malaltia, en aquest cas concret no és necessari gràcies al fenomen de la correcció creuada. Per tant, si s'aconsegueix la transferència del material genètic a un mínim de cèl·lules que actuïn com a font subministradora de l'enzim deficient, les cèl·lules veïnes no modificades genèticament són capaces de recaptar l'enzim lisosòmic alliberat al medi extracel·lular, i d'aquesta manera, corregir la seva patologia. Encara que la correcció creuada permet un benefici terapèutic mitjançant la modificació genètica d'un petit nombre de cèl·lules, és imprescindible el tractament efectiu de les afectacions del SNC, que es complica per: (i) la presència de la BHE i (ii) la incapacitat de la majoria dels vectors virals de creuar la BHE quan s'administren sistèmicament (Sands, 2006; Parenti, 2013).

3.2. Vectors virals

Els vector virals són virus modificats utilitzats freqüentment com a vehicle per a la introducció de material genètic exogen a dins d'una cèl·lula. Els virus han evolucionat al llarg de la història per infectar eficientment les cèl·lules i enviar el seu genoma viral al nucli. Els vectors virals, a diferència del virus, encapsiden un material genètic que conté el gen terapèutic enlloc del genoma viral. D'aquesta manera, els vectors virals tenen la mateixa capacitat infectiva que els virus naturals, però han perdut la seva capacitat de replicació a dins la cèl·lula hoste per la manca del propi genoma viral.

Tot i que la teràpia gènica amb vectors virals és molt prometedora, també presenta alguns inconvenients. La seguretat i la possibilitat de carcinogènesis d'alguns vectors, com els retrovirals o lentivirals, és un dels principals problemes associats a la teràpia gènica (Nienhuis, 2013). En canvi, l'ús dels vectors adenoassociats (o *adeno-associated vector*, AAV) no patogènics, el qual s'integra al genoma hoste a freqüències extremadament baixes, poden superar aquest tipus de problemes (Parenti, 2013). Una altra dificultat és la sobreexpressió del gen terapèutic a nivells suprafisiològics que poden provocar problemes en humans (Parenti, 2013). Com que els enzims lisosòmics només són actius a pH àcids, situació limitada als lisosomes, alts nivells de proteïna al torrent circulatori o dins el citoplasma cel·lular no genera cap problema extra amb aquest tipus de teràpia. Finalment, una de les preocupacions més importants és la seguretat del vector viral segons la dosi administrada que pot generar una resposta immunitària envers les proteïnes de la càpsida del vector viral o, fins i tot, el gen terapèutic (Parenti, 2013; Mingozi, 2013).

Al llarg de la història de la teràpia gènica s'han utilitzat diversos vectors virals com els herpes virus símplex, lentivirus, retrovirus, adenovirus, AAVs, baculovirus, sendai virus, entre d'altres. Ara bé, els tipus de vectors virals més estudiats pel tractament de les LSDs són els següents: lentivirus, retrovirus, adenovirus i AAVs (Sands, 2006). La Taula 3 resumeix les propietats més importants dels vectors virals més usats.

Taula 3. Característiques generals dels vectors virals més estudiats en teràpia gènica.

	Retrovirus	Lentivirus	Adenovirus	AAV
Família	<i>Retroviridae</i>	<i>Retroviridae</i>	<i>Adenoviridae</i>	<i>Parvoviridae</i>
Tipus àcid nucleic	ssRNA lineal	ssRNA lineal	dsDNA lineal	ssDNA lineal
Tropisme	Cèl·lules en divisió	Cèl·lules en divisió i quiescents	Cèl·lules en divisió i quiescents	Cèl·lules en divisió i quiescents
Genoma hoste	Integració propera a elements reguladors	Integració en gens	No integració	Integració a freqüències extremadament baixes
Expressió del transgèn	Estable a llarg termini	Estable a llarg termini	Transitòria	Estable a llarg termini en cèl·lules quiescents
Capacitat d'encapsidació	8 Kb	8 Kb	36 Kb	4,7 Kb
Producció	Títols alts	Títols baixos	Títols alts (primera generació), dificultat en produir les següents generacions	Títols alts
Immunogenicitat	Baixa	Baixa	Elevada (1a i 2a generació)	Baixa
Avantatges	Alta capacitat d'encapsidació	Alta capacitat d'encapsidació	Molt alta capacitat d'encapsidació	No patògens Molts serotips amb tropisme diferent
Inconvenients	Elevat risc de mutagènesis insercional	Risc de mutagènesis insercional	Elevada toxicitat i immunogenicitat	Baixa capacitat d'encapsidació

Adaptat de Nienhuis, 2013.

3.3. Vectors virals adenoassociats

Els AAVs provenen de virus adenoassociats que pertanyen a la família de les *Parvoviridae*, de 1 gènere de les *Dependovirus*. Inicialment, aquests virus es van identificar com a una contaminació de les preparacions virals dels adenovirus, però més endavant es van identificar com a un nou tipus de virus que la seva replicació depenia

de la coinfecció amb d'altres virus com els adenoassociats o els herpes virus. Actualment, no es coneix cap patologia humana associada als AAVs, fet que els fa el candidat ideal pel seu ús en teràpia gènica.

3.3.1. Biologia dels virus AAVs

Els AAVs són partícules víriques sense envolta de 20 nm de diàmetre amb una simetria icosaèdrica. Contenen un DNA monocatenari lineal d'unes 4,7 Kb que es divideixen en tres regions funcionals: 2 ORFs (rep i cap) i els terminals invertits repetits (o *Inverted Terminal Repeats*, ITR) (Carter, 2000). El genoma viral conté dos gens essencials: Rep, que codifica les proteïnes amb les funcions de replicació del genoma viral, control de la transcripció i empaquetament del DNA en les noves càpsides; i Cap, que codifica les proteïnes de la càpsida del virus (King, 2001; Pereira, 1997). Gràcies a al tall i unió (*splicing*) alternatiu, es generen 4 proteïnes Rep (Rep 78, Rep 68, Rep 52 i Rep 48) i tres proteïnes Cap (VP1, VP2 i VP3) dels promotors del genoma viral de l'AAV (Figura 8). Aquests dos ORFs estan flanquejats per les ITRs formades per 145 nucleòtids amb seqüències palindròmiques que provoquen el seu plegament en forma de T (Figura 8). Les ITRs contenen les funcions en cis necessàries per a la replicació, empaquetament i integració del genoma viral. En absència d'un virus necessari per dur a terme la seva replicació, els virus adenoassociats tendeixen a integrar-se a 4 Kb de la regió q13.4-ter del cromosoma 19 humà (Samulski, 1991; Kotin, 1990). Aproximadament, un 90% de la població és seropositiva per algun dels serotips d'AAVs naturals, tot i que no en tenen consciència a causa de la infecció asimptomàtica que pateixen (Skubis-Zegadlo, 2013).

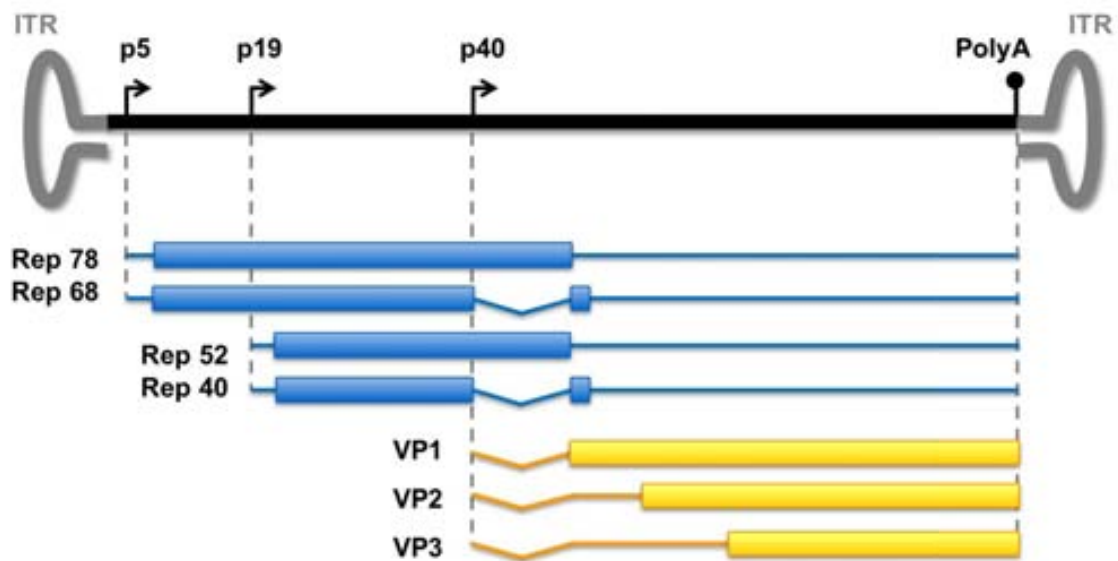


Figura 8. Estructura genètica del genoma de l'AAV *wild-type*. El genoma viral es troba flanquejat per dues seqüències ITR. Les fletxes indiquen la posició dels tres promotors p5, p19 i p40 codificant pels 3 ORFs. Tots els transcrits comparteixen la mateixa senyal de poliadenilació (PolyA). A adaptat de Daya, 2008.

3.3.2. Característiques dels vectors AAVs

Els gens *rep* i *cap* substituïts per el *cassette* d'expressió d'interès permet la generació de ls vectors adenoassociats, però se n'impedeix la capacitat de replicació eliminant el genoma viral *wild-type* (Figura 9). Les ITRs dels extrems es mantenen per tal que el vector viral tingui la capacitat d'empaquetar-se durant el procés de producció.

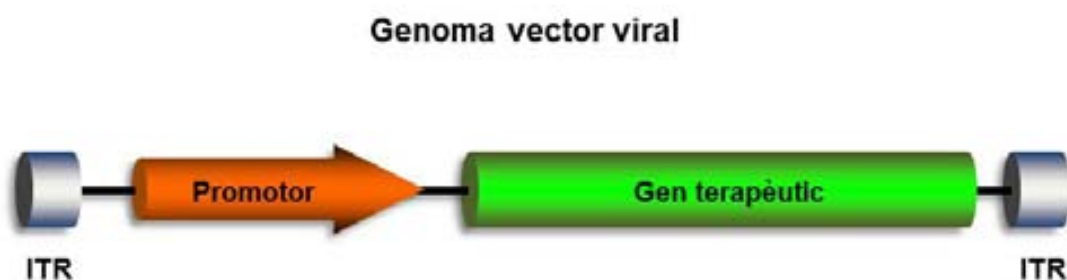


Figura 9. Estructura genètica del genoma del vector AAV.

Antigament, la producció del vector viral AAV es duia a terme mitjançant la utilització d'un virus *helper*, que donava lloc a unes preparacions virals amb contaminacions per part d'aquest altre virus. La tecnologia de producció dels AAVs es va millorar gràcies al protocol de triple transfecció de plasmidi en cultius cel·lulars. Un plasmidi conté el gen d'interès amb el promotor corresponent flanquejat per les ITRs que permet la seva encapsidació. Un altre conté els gens adenovirals necessaris per la replicació de l'AAV (AdE1, E2A, E4 i VA). Finalment, el tercer plasmidi conté els gens Rep i Cap del virus AAV *wild-type* per tal d'obtenir les funcions de replicació com també les proteïnes de la càpsida necessàries per a l'encapsidació del gen d'interès flanquejat per les ITRs (Matsushita 1998; Xiao 1998). En conseqüència, es produeixen les partícules virals que posteriorment se separaran de les restes cel·lulars després de diversos passos de centrifugació. Recentment, el nostre laboratori va desenvolupar un mètode per la purificació de les partícules virals basat en la precipitació dels virus mitjançant polietilè glicol (PEG) seguida de la ultracentrifugació amb gradients de CsCl. Aquest procediment redueix dràsticament el número de càpsides buides (vectors virals encapsidats sense el gen d'interès) i impureses proteiques presents a la preparació viral purificada. Els vectors produïts per aquest mètode presenten una millor eficiència en la transducció *in vivo* per part dels AAVs (Ayuso, 2010a).

Actualment, els vectors AAVs són una eina molt útil per la transferència eficient del gen d'interès, tant a cèl·lules quiescents com en divisió, i permetre una expressió a llarg termini amb una baixa toxicitat i immunogenicitat. No obstant això, un dels principals problemes d'aquests vectors recombinants és la baixa capacitat d'encapsidació del gen terapèutic a causa d'un genoma viral de només 4,7 Kb. A més, és essencial conèixer el tropisme dels vectors AAVs, el qual varia en funció del serotip d'AAV natural de procedència, per tal de poder escollir el millor serotip en funció de la patologia que cal tractar. La Taula 4 descriu els serotips d'AAVs més utilitzats en teràpia gènica juntament amb el receptor que permet l'entrada del vector a dins la cèl·lula, en cas que sigui conegut, i dona lloc a un tropisme determinat per cada serotip. D'entre tots els vectors presentats a la Taula 4, l'AAV9 és el vector que presenta una expressió més ràpida, ubiqua i robusta a la majoria de teixits després d'una administració sistèmica (Zincarelli, 2008). El terminal galactosa s'ha identificat com el receptor d'unió de l'AAV9 (Bell, 2011; Shen, 2011), i la seva capacitat d'unió al receptor glicà en determina el seu tropisme (Shen, 2012). A més, l'AAV9 té una

característica que el fa especial: la capacitat de travessar la barrera hematoencefàlica i transduir eficientment el cervell després d'una administració intravenosa en ratolins i primats no humans (Foust, 2009; Bevan, 2011; Gray, 2011). A més, el vector viral AAV9 administrat sistèmicament també és capaç de transduir eficientment altres teixits com el fetge i el cor (Inagaki, 2006; Duque, 2009).

Actualment, hi ha més de 60 protocols de teràpia gènica que utilitzen els vectors AAVs, i algun d'ells han demostrat expressió del transgèn en humans durant llargs períodes de temps (~8-10 anys) (Niemeyer, 2009; Buchlis, 2012).

Taula 4. Principals vectors AAVs amb el receptor d'entrada a la cèl·lula i el seu tropisme.

Serotip	Receptor	Tropisme
AAV1	α 2,3-/ α 2,6-àcid siàlic N-unit (Wu, 2006)	Múscul esquelètic, SNC, pàncrees
AAV2	Proteoglicà d'heparan sulfat (Summerford, 1998)	Múscul esquelètic, SNC (principalment retina), fetge, ronyó
AAV3	Proteoglicà d'heparan sulfat (Rabinowitz, 2002)	Múscul esquelètic, hepatocarcinoma
AAV4	α 2,3-àcid siàlic O-unit (Kaludov, 2001)	SNC (ependimòcits)
AAV5	α 2,3-àcid siàlic N-unit (Walters, 2001)	Múscul esquelètic, SNC (principalment retina), pulmó, ependimòcits
AAV6	α 2,3-/ α 2,6-àcid siàlic N-unit i Heparina N-sulfatada (Wu, 2006)	Múscul esquelètic, cor, pulmó
AAV7	<i>Desconegut</i> (Mietzsch, 2014)	Múscul esquelètic, SNC
AAV8	<i>Desconegut</i> (Mietzsch, 2014)	Fetge, múscul esquelètic, SNC, pàncrees, cor
AAV9	β 1,4-Galactosa (Bell, 2011; Shen, 2011)	Fetge, cor, pulmó, SNC, Múscul esquelètic, pàncrees, ronyó.

3.4. Teràpia gènica pel tractament de la MPSIIIA

Durant els últims anys, s'han realitzat grans avenços en el camp de la teràpia gènica com a estratègia terapèutica pel tractament de diverses malalties metabòliques hereditàries, incloent les LSDs neuropàtiques (Cheng, 2014). Aquestes malalties presenten l'avantatge que amb la modificació d'un petit grup de cèl·lules poden generar un benefici terapèutic global gràcies a la correcció creuada.

A dia d'avui, la teràpia gènica en la Síndrome de Sanfilippo només s'ha desenvolupat pel subtipus A i B. El primer estudi que va es va dur a terme consistia en el tractament de fibroblasts de pacients amb un vector retroviral codificant per a la sulfamidasa (Bielicki, 1996). Els resultats observats van permetre concloure que la teràpia gènica és possible, ja que es van aconseguir nivells d'activitat sulfamidasa iguals o superiors als dels fibroblasts control, fet que provocava la normalització dels nivells d'acumulació de GAGs (Bielicki, 1996). A partir d'aquí, s'han anat testant diverses aproximacions terapèutiques per a la MPSIIIA basades en l'administració dels vectors virals mitjançant diferents rutes als models animals de la malaltia.

3.4.1. Administració de vectors virals per la ruta intravenosa

Una de les rutes més accessibles i senzilles és l'administració dels vector virals per via sistèmica. En general, és una via d'administració gens invasiva, fàcilment reproduïble a qualsevol centre sanitari. Es va testar el tractament basat en la teràpia gènica usant l'administració intravenosa de vectors lentivirals a ratolins MPSIIIA adults joves (6 mesos d'edat) (Anson, 2007; McIntyre, 2008; McIntyre, 2010). Aquesta administració dels lentivirus va permetre la detecció del vector viral a fetge i melsa, provocant l'expressió de la sulfamidasa a aquests òrgans transduïts que van secretar l'enzim a sèrum (McIntyre, 2010), tot i que en un estudi anterior no es va detectar activitat enzimàtica a sèrum (McIntyre, 2008). A partir d'aquí, la sulfamidasa activa procedent de diversos teixits perifèrics va permetre la correcció de la majoria de característiques de la patologia somàtica (Anson, 2007; McIntyre, 2008; McIntyre, 2010). Ara bé, els vectors lentivirals no eren capaços de transduir eficientment el SNC, a causa de la limitació de la BHE, impeding la millora de la patologia neurològica (McIntyre, 2008; McIntyre, 2010). En la MPSIIIB, també es van testar els vectors

retrovirals que, principalment, van permetre la detecció de Naglu a fetge i melsa corregint l'afectació somàtica (Di Natale, 2005). A partir d'aquí, també es van desenvolupar nous estudis de teràpia gènica basats en l'administració intravenosa dels vectors AAVs. En primer lloc, la limitada entrada del vector viral AAV2 al SNC després de l'administració sistèmica va millorar gràcies a la infusió de mannitol prèvia al tractament (McCarty, 2009). Aquesta aproximació va permetre una màxima distribució del vector que va liderar una millora de la patologia lisosòmica del SNC i una correcció parcial de la patologia somàtica, juntament amb una millora funcional i un increment de la supervivència (McCarty, 2009). D'altra banda, el vector viral AAV8 administrat per la vena de la cua va provocar l'expressió de la sulfamidasa a fetge, i la detecció de nivells suprafisiològics de sulfamidasa activa a sèrum, els quals van provocar la reversió de la patologia perifèrica de la MPSIIIA (Ruzo, 2012a). Els nivells d'activitat sulfamidasa al cervell propers al 10% van permetre la correcció parcial de l'acumulació de GAGs al SNC, com també la millora de la neuropatologia observada al còrtex cerebral i el cerebel (Ruzo, 2012a). La transferència gènica al fetge del vector AAV8 per via sistèmica també va evidenciar una major supervivència (Ruzo, 2012a). Com que no s'aconseguia una reversió completa de l'afectació neurològica, es va testar un nou serotip de vector viral, l'AAV9, el qual és capaç de creuar la barrera hematoencefàlica després de l'administració sistèmica (Foust, 2009; Duque, 2009). Aleshores, es va aconseguir la transducció dels teixits perifèrics, com també el SNC, provocant l'expressió de la sulfamidasa tant a cervell com a fetge, font secretora de sulfamidasa activa circulant (Ruzo, 2012b). L'increment de l'activitat sulfamidasa va comportar la correcció dels dipòsits de GAGs del SNC i els teixits perifèrics, i la reversió de la neuroinflamació, que donava lloc a una prolongació de la supervivència dels ratolins MPSIIIA tractats (Ruzo, 2012b). Aquests resultats també es van observar en un estudi pel tractament de la MPSIIIB, després de l'administració intravenosa del vector viral AAV9 (Fu, 2011). Així doncs, l'administració d'una dosi elevada del vector AAV9 per via sistèmica va permetre la correcció de la patologia neurològica i somàtica de la MPSIIIA, com també de la MPSIIIB que presenta una simptomatologia molt similar.

3.4.2. Administració de vectors per la ruta intraparenquimàtica

Una altra ruta és l'administració en el parènquima cerebral per maximitzar la difusió del vector viral als òrgans més afectats per la patologia, tot i que actualment no s'ha estudiat específicament en els models animals de la MPSIIIA. En general, l'administració directa al SNC consisteix en diverses injeccions locals al parènquima cerebral per tal d'aconseguir la màxima distribució del vector viral. Els estudis en els models murí i caní de la MPSIIIB, malaltia que presenta una simptomatologia molt similar a la MPSIIIA, han revelat certs nivells d'eficàcia terapèutica i millora funcional de la patologia central (Ellinwood, 2011; Cressant, 2004; Di Domenico, 2009; Heldermon, 2010). A més, d'altres LSDs amb afectació neurològica, com la lipofuscinosi neuronal ceroide infantil tardana (o *Late Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis*, LINCL), s'han tractat mitjançant l'administració intraparenquimàtica del vector AAVrh.10 assolint una millora de l'acumulació patològica i a nivell funcional (Sondhi, 2007). Fins i tot, algunes d'aquestes teràpies basades en l'administració intraparenquimàtica de vectors AAVs van arribar a la clínica, com és el cas de la malaltia de Canavan, la malaltia de Batten o LINC (Worgall, 2008; Leone, 2012; Souweidane, 2010). L'inconvenient principal d'aquestes aproximacions terapèutiques és la poca distribució del vector viral per tot el SNC des del punt d'injecció, i la dificultat de transduir eficientment zones més profundes o distals als diversos punts d'injecció, com el cerebel o el tronc encefàlic (Souweidane, 2010; Leone, 2012). Aleshores, aquest conjunt de resultats ha estat la base pel desenvolupament clínic de l'aproximació terapèutica mitjançant l'administració intraparenquimàtica de l'AAVrh.10 pel tractament de la MPSIIIA (Tardieu, 2014). Tot i que l'estudi va ser ben tolerat pels pacients tractats tot demostrant la seguretat del procediment realitzat, l'eficàcia terapèutica va ser molt limitada (Tardieu, 2014).

3.4.3. Administració de vectors per la ruta intra-LCR

Una altra de les rutes escollides per a la recerca del tractament de la MPSIIIA consisteix en l'administració del vector viral directa al LCR, ja que pot permetre una àmplia distribució a tot el SNC. El LCR és un líquid de color transparent que banya tot el SNC, i s'encarrega de protegir-lo contra els traumatismes, proporcionar-li estabilitat mecànica i sosteniment, nutrició, regulació dels metabòlits presents al SNC, etc. El LCR es produeix als plexes coroides i circula des dels ventricles laterals cap al tercer i quart ventricle, on es distribueix cap al canal central de la medulla espinal i surt cap a la cisterna magna distribuint-se per l'espai subaracnoïdal del SNC (Figura 10). Els humans tenen un volum d'entre 100 i 150 ml de LCR, en condicions fisiològiques, el qual es produeix diàriament a una velocitat de 500 ml/dia provocant-ne la renovació 3-4 vegades al dia. Aleshores, una teràpia directa al LCR permetria la màxima difusió del vector viral a tot el SNC aconseguint una millor correcció de la patologia. Diversos estudis han provat l'administració intra-LCR de determinats vector virals. Per exemple, el vector viral AAV2 administrat per via intracisternal (IC) es va testar en ratolins de la MPSIIIB, i va donar lloc a una àmplia correcció del SNC amb un efecte més limitat als teixits perifèrics analitzats (Fu, 2010). Ara bé, en ratolins de la MPSIIIA també es va desenvolupar una teràpia gènica directa al LCR que consistia en l'administració intracerebroventricular (ICV) del vector AAV5 codificant per la sulfamidasa i SUMF1, activador de les activitats sulfatases (Cosma, 2003; Fraldi, 2007a). El tractament de ratolins recent nascuts va permetre una visible reducció de l'acumulació lisosòmica, dels marcadors inflamatoris i la millora de les funcions motores i cognitives (Fraldi, 2007b). Tots aquests estudis van revelar que l'administració d'aquests serotips d'AAVs al LCR permetia una correcció de la patologia neurològica de la MPSIIIA. Així doncs, l'estudi de nous vectors virals AAVs pel tractament de la MPSIIIA mitjançant la ruta intra-LCR és prometedora per tractar, principalment, l'òrgan més afectat per la malaltia, el SNC.

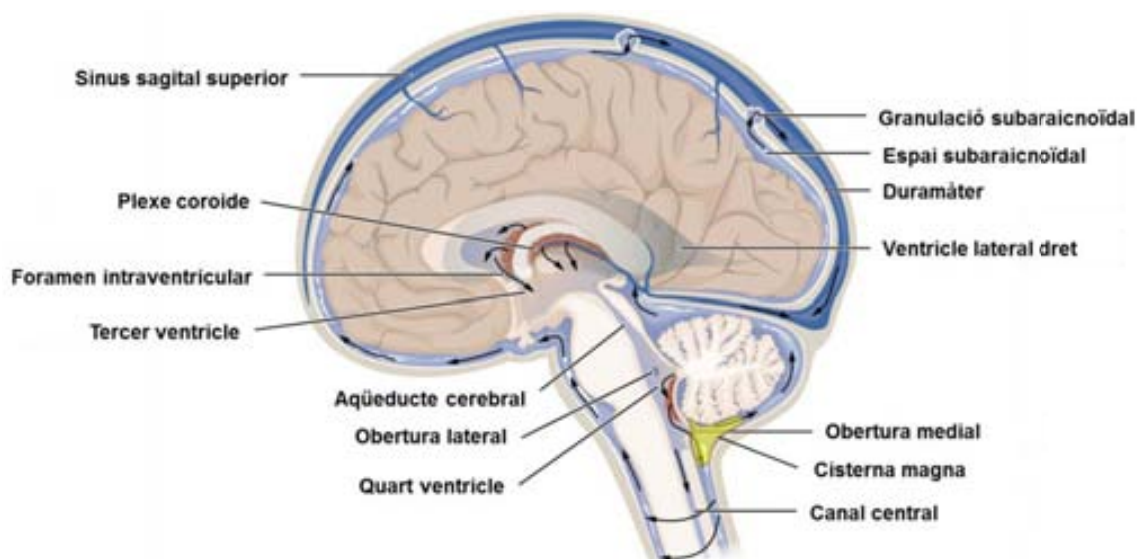


Figura 10. Circulació del LCR al SNC. El LCR es produeix als plexes coroides dels ventricles laterals i es dirigeix cap al tercer ventricle i finalment al quart ventricle. Una part del LCR es dirigeix cap al canal central de la medul·la espinal, mentre que una altra part surt per l'obertura lateral o medial per circular per tot l'espai subaracnoidal i banyar el SNC. Adaptat de "Anatomy & Physiology, Connexions Web site. <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>".

3.4.4. Combinació de rutes d'administració

Per tal d'aconseguir la correcció total de la patologia neurològica i somàtica de la MPSIIIA, s'han realitzat diversos estudis provant l'eficàcia després de la combinació de dos tractaments simultàniament. L'administració intraparenquimàtica de l'AAV5 juntament amb el transplantament de medul·la òssia pel tractament de la MPSIIIB va resultar en un efecte sinèrgic tot reduint les inclusions lisosòmiques del SNC i millorant l'audició, però va demostrar un efecte negatiu en la supervivència i la millora funcional en comparació a la teràpia AAV sola (Heldermon, 2010). Aquest estudi va evidenciar que la teràpia gènica amb l'AAV5 per si sola era més eficient en la millora de la patologia de la MPSIIIA respecte a la teràpia combinada (Heldermon, 2010). Per altra banda, l'estudi dels ratolins MPSIIIB tractats a 2-4 dies d'edat mitjançant l'administració intravenosa de vectors lentivirals combinat amb l'administració intraparenquimàtica de l'AAV5 va demostrar una eficàcia terapèutica major que cada tractament per separat (Heldermon, 2013). Finalment, també s'ha estudiat la combinació de l'administració intravenosa i intracisternal de l'AAV2 després de la infusió de manitol (Fu, 2007). A aquest tractament va resultar en una millora dels déficits de comportament i una supervivència més prolongada, com també una correcció parcial de

la patologia d'acumulació lisosòmica al SNC i els teixits perifèrics analitzats (Fu, 2007).

3.5. Efecte de la immunitat humoral anti-AAV a la teràpia gènica

Diversos estudis han revelat que una elevada proporció d'humans sans desenvolupen immunitat humoral contra la càpsida dels virus AAVs *wild-type*. En recent nascuts s'ha observat la presència d'anticossos anti-AAV procedents de la mare, tot i que disminueixen ràpidament entre els 7 i 11 mesos (Calcedo, 2011). Seguidament i com a conseqüència de l'exposició natural a l'AAV *wild-type* durant els primers anys de vida, els anticossos neutralitzants (o *Neutralizing Antibodies*, NAbs) anti-AAV van augmentant progressivament durant la infància i l'adolescència tot perdurant al llarg del temps (Calcedo, 2011; Li, 2012). En general, l'AAV2, hoste natural dels humans, és el serotip d'AAV més prevalent en mostres de sèrum humanes procedents de diverses regions del món com Àfrica, Austràlia, Estats Units o Europa (Calcedo, 2009). De fet, l'AAV2 no només presenta una alta prevalença (59%), sinó que els títols de NAbs presents a la majoria de la població seropositiva són molt elevats (>1:400) (Boutin, 2010). Per altra banda, el serotip AAV9 presenta una menor prevalença de NAbs en la població humana (33,5%) a uns títols baixos de 1:20 (Boutin, 2010).

La immunitat humoral als AAVs *wild-type* ha estat una de les barreres més importants que ha dificultat l'èxit de la teràpia gènica (Mingozzi, 2013). En el primer assaig clínic per l'hemofília B administrant el vector viral AAV1 per via sistèmica es va observar el bloqueig total de l'expressió del transgèn del Factor IX a un pacient amb un títol de NAbs anti-AAV2 d'1:17 (Manno, 2006). Mentre que un altre pacient, amb un títol 1:2, va aconseguir uns nivells circulants de Factor IX propers al 10% d'un individu normal (Manno, 2006). Els estudis en ratolins, gats i primats no humans amb immunitat humoral preexistent van demostrar que un títol de NAbs anti-AAV superior a 1:5-1:10 van ser capaços de bloquejar l'expressió del gen després d'una administració sistèmica (Scallan, 2006; Murphy, 2008; Jiang, 2006; Ferla, 2013). Ara bé, l'administració directa del vector AAV9 a la cisterna magna va permetre l'eficient transducció del SNC en primats no humans amb la presència de NAbs anti-AAV9 a sèrum (Gray, 2013). Així doncs, en funció del teixit on es realitza la transferència gènica, els NAbs anti-AAV

poden limitar/bloquejar l'expressió del transgèn (Mingozzi, 2013). A més, el ventall d'edat en el qual l'absència d'anticossos neutralitzants va permetre el tractament amb teràpia gènica sense respostes humorals no desitjades és molt petit. Per tant, la prevalença i magnitud de la seropositivitat dels individus inclosos en un assaig clínic cal tenir-la molt en compte pel possible impacte negatiu en l'eficiència de la transferència gènica.

III. OBJECTIUS

La Mucopolisacaridosi tipus IIIA o Síndrome de Sanfilippo A és una malaltia metabòlica hereditària rara que es caracteritza per una afectació greu del SNC, amb una alteració somàtica més lleugera. Els pacients afectats per la MPSIIIA presenten una severa neurodegeneració que evoluciona progressivament fins a provocar la mort entre la primera i segona dècada de vida. Actualment, no hi ha cap teràpia aprovada pel tractament de la MPSIIIA. Així doncs, és necessari desenvolupar noves estratègies terapèutiques eficaces per a la correcció, sobretot, de la patologia neurològica, com també la patologia somàtica. La teràpia gènica *in vivo* basada en l'administració de vectors virals adenoassociats és una bona alternativa terapèutica a causa de la no patogenicitat del vector viral i la capacitat d'expressió de la proteïna lisosòmica deficient a llarg termini.

L'objectiu general d'aquest estudi va ser **desenvolupar una nova aproximació de teràpia gènica basada en l'administració del vector viral AAV9 directament al LCR pel tractament de la patologia neurològica i somàtica de la MPSIIIA**. Aquest objectiu general es va subdividir en 3 *objectius específics*:

- 1. Determinar l'eficàcia terapèutica de l'administració intra-LCR del vector viral AAV9 codificant pel gen de la sulfamidasa en ratolins models de la malaltia MPSIIIA.**
- 2. Avaluar la translació de l'aproximació de teràpia gènica basada en l'administració intra-LCR del vector viral AAV9 en gossos Beagle adults.**
- 3. Estudiar l'impacte de la immunitat humoral preexistent contra l'AAV9 en l'eficiència de la transducció del SNC.**

III. RESULTATS

1. ADMINISTRACIÓ INTRA-LCR DE L'AAV9 SULFAMIDASA EN RATOLINS

El nostre laboratori havia desenvolupat diverses aproximacions de teràpia gènica mitjançant l'ús de vectors AAV pel tractament de la MPSIIIA en ratolins models animals de la malaltia. Una de les aproximacions que permetia la correcció de la patologia neurològica i somàtica característica de la MPSIIIA va ser l'administració intravenosa dels vectors AAV9 codificant per a la sulfamidasa murina (Ruzo, 2012b). Ara bé, la dosi mínima necessària per aconseguir la reversió de la patologia era molt elevada (1×10^{12} genomes virals/ratolí (o *vector genomes*, vg)), el que suposa un repte tant en la producció com en la seguretat de la teràpia. Així doncs, per tal de minimitzar la dosi de vector administrat mantenint l'eficàcia terapèutica del tractament, es va realitzar una primera prova de concepte de nova aproximació de teràpia gènica per a la MPSIIIA. Aquesta consistia en l'administració directa al LCR dels vectors AAVs codificant per a la proteïna verda fluorescent (o *Green Fluorescent Protein*, GFP) sota el control del promotor ubicu CAG (promotor híbrid format pel potenciador de la transcripció citomegalovirus, el promotor de la β -actina i el primer intró del gen de la β -globina humana). Els resultats del nostre laboratori van demostrar que el vector viral AAV9 administrat a la cisterna magna de ratolins de 2 mesos d'edat a una dosi de 5×10^{10} vg/ratolí resultava en una àmplia i elevada transducció del cervell, fins i tot a regions distals al punt d'injecció, comparat amb els nivells de transducció d'altres serotips d'AAV (Tesi doctoral A. Ruzo, 2010). A més, el serotip AAV9 present al LCR va passar des del SNC cap a la sang perifèrica, transduint eficientment el fetge (Tesi doctoral A. Ruzo, 2010). Per tant, l'administració dels vectors AAVs a la cisterna magna, una cavitat a l'espai subaracnoïdal entre el cerebel i la superfície dorsal de la medulla oblonga, és una bona ruta per a l'administració directa de productes terapèutics al LCR, el qual pot distribuir els AAVs per tot el SNC i, fins i tot, drenar-los cap als teixits perifèrics.

En aquest treball ens hem centrat en la utilització d'aquesta via d'administració local, directa al LCR, per a la transferència de l'enzim sulfamidasa mitjançant vectors AAV9 a dosis molt més baixes que les utilitzades per via intravenosa.

1.1. Disseny experimental de l'administració intra-LCR de l'AAV9-Sgsh

L'avaluació de l'eficàcia terapèutica de l'aproximació de teràpia gènica desenvolupada en aquesta tesi es va dur a terme mitjançant l'administració intra-LCR de del vector AAV9 codificant pel gen de la sulfamidasa murina (mSgsh) (Figura 1). Els ratolins MPSIIIA es van tractar a dos mesos d'edat, quan la patologia del SNC ja estava establerta i l'acumulació de GAGs a teixits perifèrics ja era evident (Crawley, 2006; Ruzo, 2012a). Les dosis administrades als ratolins MPSIIIA van ser: 5×10^{10} vg/ratolí, en un volum final de 5 μ l per a l'administració intra-LCR sense realitzar una sobrepressió al SNC, i 5×10^9 vg/ratolí, dosi amb un log de diferència per avaluar el rang d'eficàcia terapèutica. Durant els 4 mesos post-injecció, es va dur a terme un seguiment mensual dels animals mitjançant la presa de mostra de sang. Finalment, els animals es van sacrificar després de 4 i 10-12 mesos de tractament per tal d'avaluar el grau de correcció de la patologia mitjançant paràmetres bioquímics i histopatològics, com també l'anàlisi del comportament i la supervivència. Com a grup control de l'estudi, es va utilitzar els ratolins afectats per la MPSIIIA injectats per via intracisternal amb l'AAV9-Nul, vector que no codifica per cap transgèn i a la vegada serveix com a control de la tècnica d'administració (Figura 1).

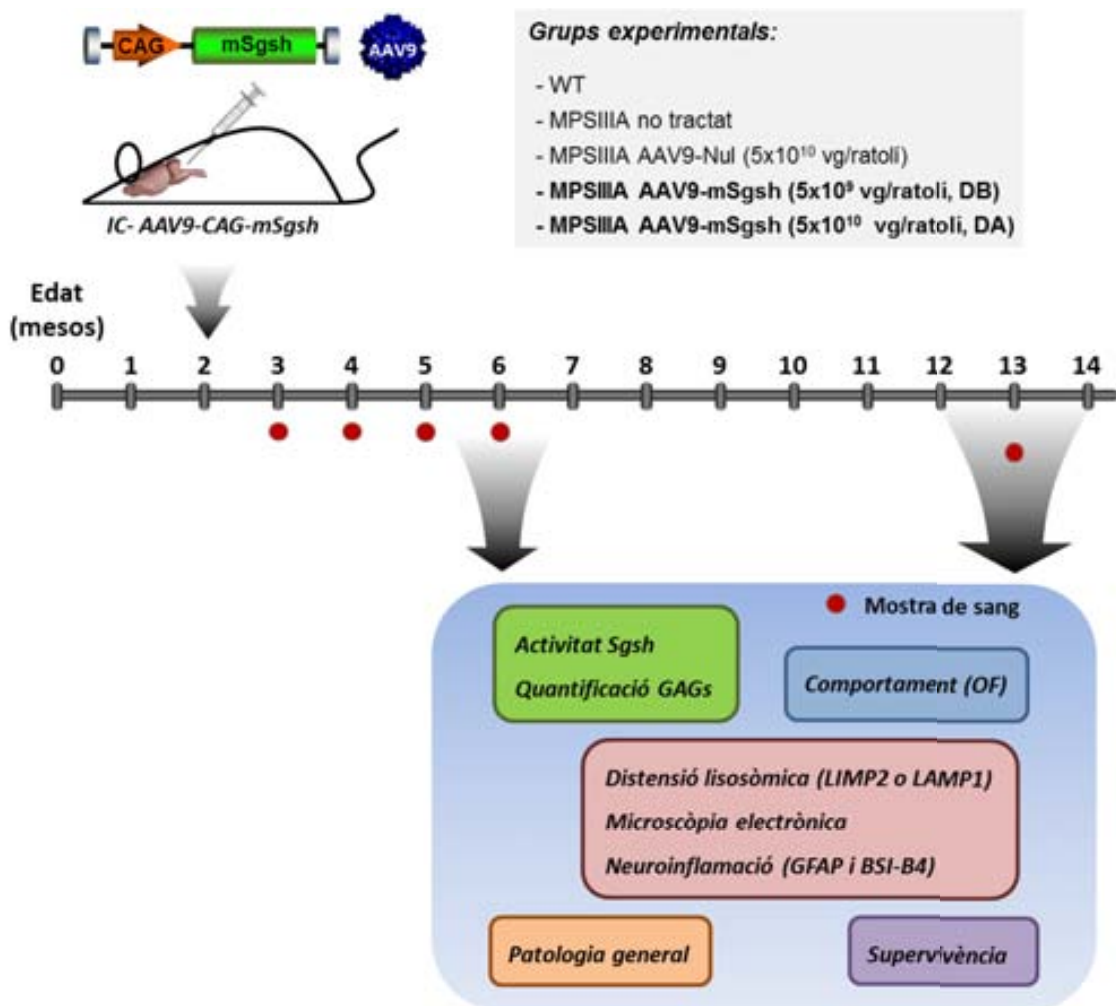


Figura 1. Disseny experimental del tractament de ratolins afectats per la MPSIIIA. El tractament consisteix en l'administració intra-OCR del vector AAV9-mSgsh. OF, Prova de camp obert o *Open-Field*; IC, in tracisternal; WT, sans o *wild-type*; DA, dosi alta; DB, dosi baixa; LIMP2, proteïna lisosòmica integral de membrana tipus 2 o *Lysosomal Integral-Membrane Protein 2*; LAMP1, proteïna lisosòmica associada a la membrana tipus 1 o *Lysosomal Associated-Membrane Protein*; GFAP, Proteïna àcida fibril·lar glial o *Glial Fibrillar Acidic Protein*; BSI-B4, isolectina B4.

1.2. Eficàcia al SNC de l'administració intra-LCR del vector AAV9-mSgsh

1.2.1. Activitat sulfamidasa al cervell

Després de 4 mesos de l'administració intra-LCR del vector AAV9-mSgsh, es va quantificar l'activitat sulfamidasa en diferents regions del cervell. A la dosi més alta (5×10^{10} vg/ratolí), es va observar un augment estadísticament significatiu de l'activitat sulfamidasa a totes les regions del cervell. Els valors de l'activitat enzimàtica es van detectar entre l'11 i el 36 % dels valors normals d'activitat en mascles sans (o *wild-type*, WT) i entre el 7 i el 29% en femelles (Figura 2A). A més, els nivells més elevats d'activitat sulfamidasa es van detectar a les parts més rostrals de l'encèfal (seccions I-III, Figura 2A), regions allunyades del punt d'injecció. Per altra banda, a la dosi més baixa no es va detectar cap augment significatiu de l'activitat sulfamidasa en comparació amb els ratolins MPSIIIA injectats amb el vector AAV9-Nul (vector AAV9 que no codifica per cap transgèn i s'utilitza com a control). Aquests van presentar els mateixos nivells d'activitat sulfamidasa que els ratolins MPSIIIA no tractats. Per tant, la tècnica per se no va afectar a l'activitat enzimàtica, sinó que els nivells assolits a la dosi més alta van estar relacionats amb la pròpia expressió del transgèn.

En observar un increment de l'activitat sulfamidasa al SNC de ratolins MPSIIIA tractats amb la dosi alta, també es va realitzar un seguiment fins a 10-12 mesos post-tractament. Després de l'administració intracisternal (IC), es va detectar uns nivells d'activitat sulfamidasa del 13 al 40% dels valors normals en mascles i del 16 al 34% en femelles en diverses regions del cervell dels ratolins MPSIIIA tractats (Figura 2B). Per tant, després d'una administració intra-LCR de 5×10^{10} vg/ratolí del vector AAV9-mSgsh es va observar els mateixos nivells d'activitat sulfamidasa tant a curt com a llarg termini.

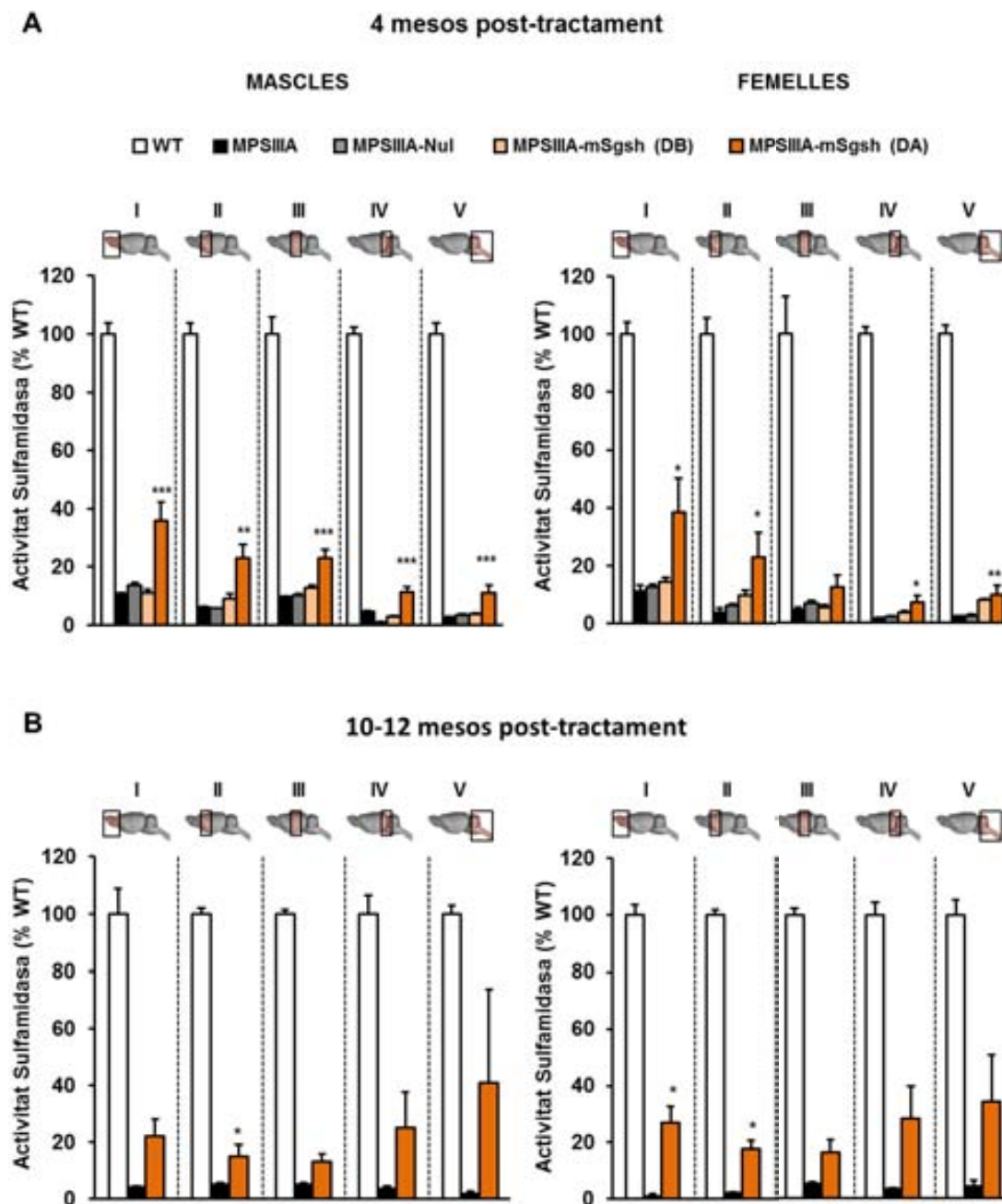


Figura 2. Activitat sulfamidasa al SNC després de l'administració intracisternal de l'AAV9-mSgsh a ratolins MPSIIIA. (A, B) Percentatge d'activitat sulfamidasa WT a cinc regions del cervell (seccions I-V indicades en les imatges ubicades sobre les gràfiques) en ratolins MPSIIIA mascles i femelles tractats a 2 mesos d'edat amb 5×10^9 (DB) o 5×10^{10} (DA) vg/ratolí de l'AAV9-mSgsh o 5×10^{10} vg/ratolí de l'AAV9-Nul, utilitzat com a control. Els animals es van sacrificar després de 4 mesos (A) i als 10-12 mesos (B) del tractament juntament amb animals WT i MPSIIIA no tractats. Els resultats es mostren com a mitjana \pm S.E.M.; $n = 4-6$ animals per grup (4 mesos post-tractament) i $n = 2-5$ animals per grup (10-12 mesos post-tractament). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ i ***, $p < 0,001$ vs. MPSIIIA-Nul. DA, dosi alta; DB, dosi baixa.

1.2.2. Acumulació de GAGs al cervell

L'increment de l'activitat sulfamidasa observada en diferents àrees del cervell de ratolins MPSIIIA mascles i femelles tractats a la dosi alta va donar lloc a una eficient correcció de l'acumulació de GAGs a la majoria de les regions del cervell analitzades en ambdós sexes al cap de 4 mesos post-tractament (Figura 3A). A les seccions més rostrals del cervell (seccions I-III, Figura 3A) es va normalitzar el contingut de GAGs, mentre que a les regions més caudals de l'encèfal només es va aconseguir una reducció parcial (seccions IV i V, Figura 3A). Per altra banda, en els ratolins MPSIIIA tractats amb la dosi més baixa només es va observar una reducció parcial, però estadísticament significativa, de l'acumulació de GAGs en algunes regions del cervell (secció I en mascles i seccions I-II en femelles, Figura 3A). Els ratolins MPSIIIA injectats amb el vector AAV9-Nul no van presentar cap disminució estadísticament significativa del contingut de GAGs comparat amb els animals MPSIIIA no tractats.

A més, es va observar que després d'aproximadament un any amb un increment de l'activitat sulfamidasa al SNC, el contingut de GAGs es va normalitzar a totes les regions del cervell analitzades d'ambdós sexes. Fins i tot, la correcció es va observar a les seccions IV i V que, a 4 mesos post-injecció, únicament havien evidenciat una correcció parcial de l'acumulació de GAGs, suggerint que la producció continuada de sulfamidasa a llarg termini és necessària per a la correcció total del contingut de GAGs (Figura 3B). Així doncs, una única administració intra-LCR del vector AAV9-mSgsh a la dosi alta a ratolins MPSIIIA va permetre una completa correcció de la patologia del SNC gràcies a la producció sostinguda de la sulfamidasa.

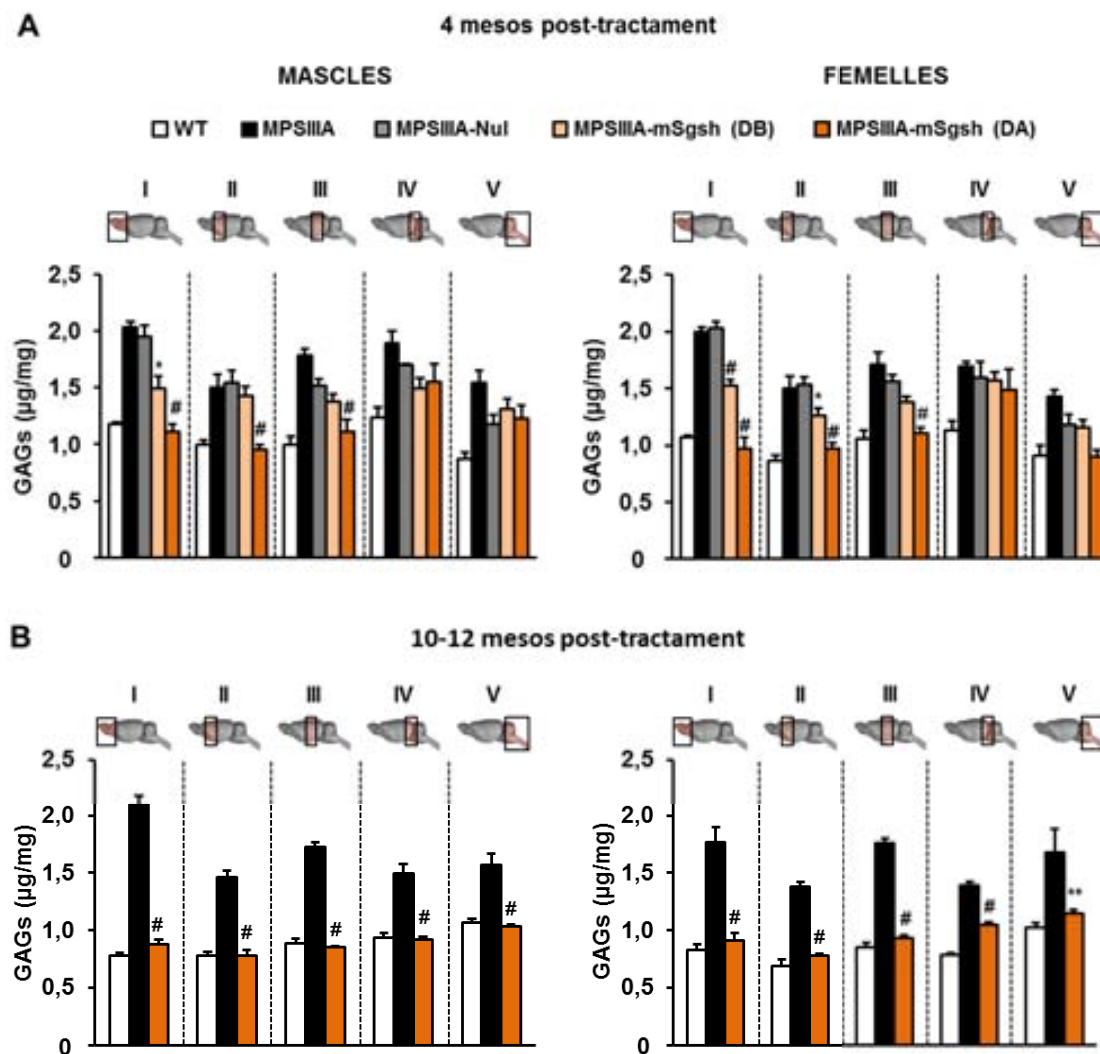


Figura 3. Correcció del contingut de GAGs al SNC després de l'administració intra-LCR del vector AAV9-mSgsh. (A, B) Quantificació del dipòsit de GAGs a les cinc regions del cervell anàlitzades (seccions I-V indicades a les imatges ubicades sobre les gràfiques) de ratolins MPSIIIA mascles i femelles tractats a 2 mesos d'edat amb 5×10^9 o 5×10^{10} vg/ratolí de l'AAV9-mSgsh o 5×10^{10} vg/ratolí del vector AAV9-Nul com a control. Els ratolins es van sacrificar a 4 mesos (A) i 10-12 mesos (B) després del tractament juntament amb WT i MPSIIIA no tractats. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM; $n=4-6$ animals per grup. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ i #, $p < 0,001$ vs. MPSIIIA-Nul. DA, dosi alta; DB, dosi baixa.

1.2.3. Patologia lisosòmica al SNC

Després de 4 mesos de tractament, es va avaluar la mida del compartiment lisosòmic per mitjà de l'anàlisi immunohistoquímica contra LIMP2 de seccions del cervell. A 6 mesos d'edat, els ratolins MPSIIIA-Nul van evidenciar una marcada distensió lisosòmica, on les cèl·lules LIMP2 positives presentaven una possible morfologia neuronal (fletxes blanques Figura 4A). Ara bé, els ratolins MPSIIIA tractats amb l'AAV9-mSgsh a la dosi alta van presentar una normalització estadísticament significativa de la intensitat de la senyal de la immunohistoquímica contra LIMP2 en totes les regions del cervell analitzades (Figura 4). Aquestes dades indiquen una completa correcció de la patologia lisosòmica al SNC de ratolins MPSIIIA tractats a la dosi alta de l'AAV9-mSgsh.

També es va detectar una millora de la distensió lisosòmica a diverses regions del SNC dels ratolins MPSIIIA tractats amb AAV9-hSgsh i es van analitzar després de 10-12 mesos post-administració mitjançant la immunohistoquímica contra la Proteïna lisosòmica integral de membrana (o *Lysosomal Integral Membrane Protein*, LIMP2) (Figura 5). A totes les regions del cervell analitzades es va observar una disminució de la intensitat de senyal de LIMP2, amb una reducció completa al còrtex frontal, parietal i occipital i a l'hipocamp (Figura 5B).

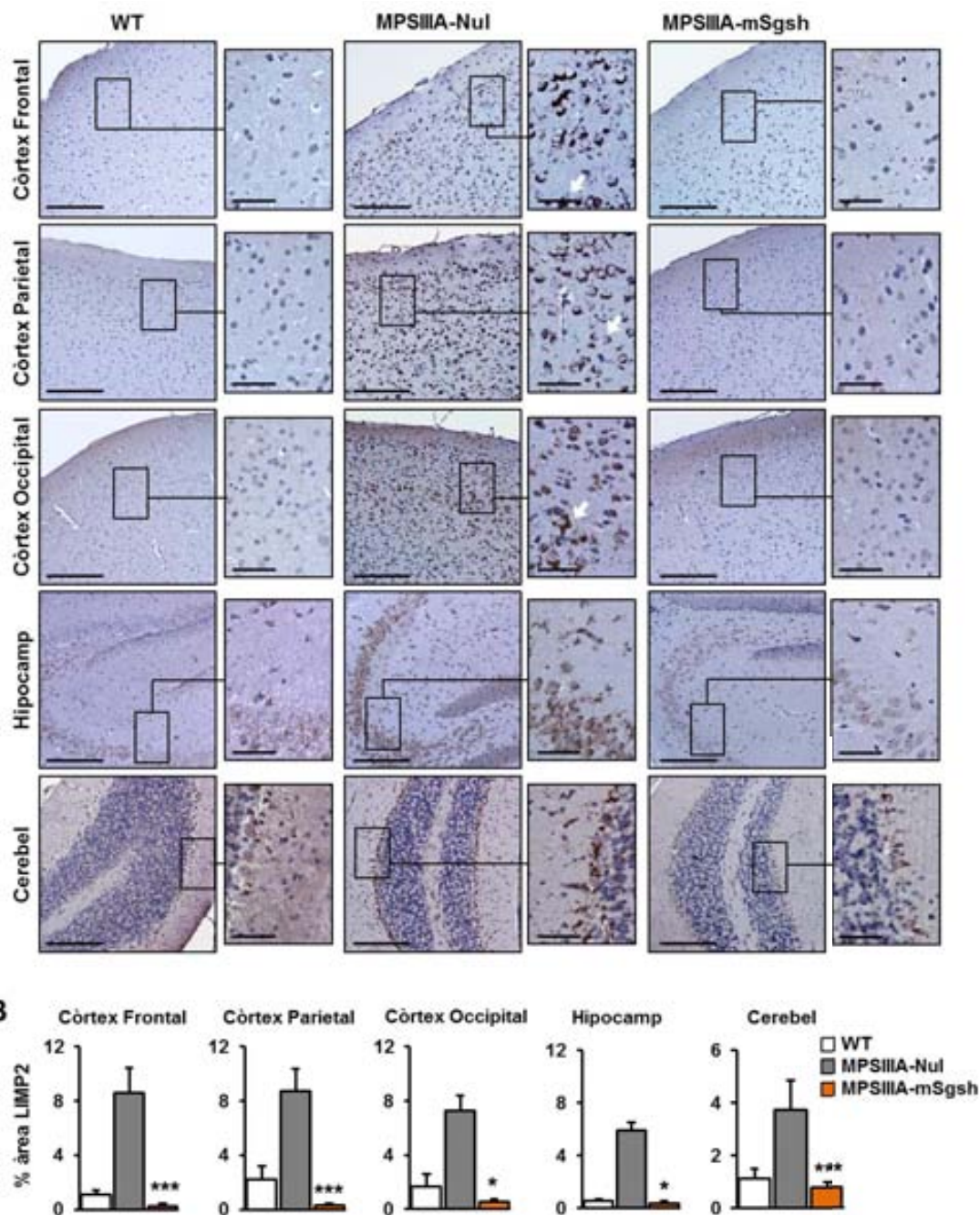


Figura 4. Normalització de la mida del compartiment lisosòmic del SNC després de l'administració intracisternal de l'AAV9-mSgsh. (A) Anàlisi immunohistoquímica utilitzant el marcador LIMP2 a diferents regions del cervell de ratlins mascles WT i tractats amb el vector AAV9-Nul o a la dosi alta de l'AAV9-mSgsh després de 4 mesos post-injecció. Les fletxes blanques indiquen les cèl·lules amb morfologia neuronal. Escala: 200 μ m (50 μ m per l'ampliació). **(B)** Els histogrames mostren la quantificació de la intensitat de senyal de LIMP2 en els diferents grups de tractament. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM. $n=4-5$ animals per grup. *, $p<0,05$ i ***, $p<0,001$ vs. MPSIII A-Nul.

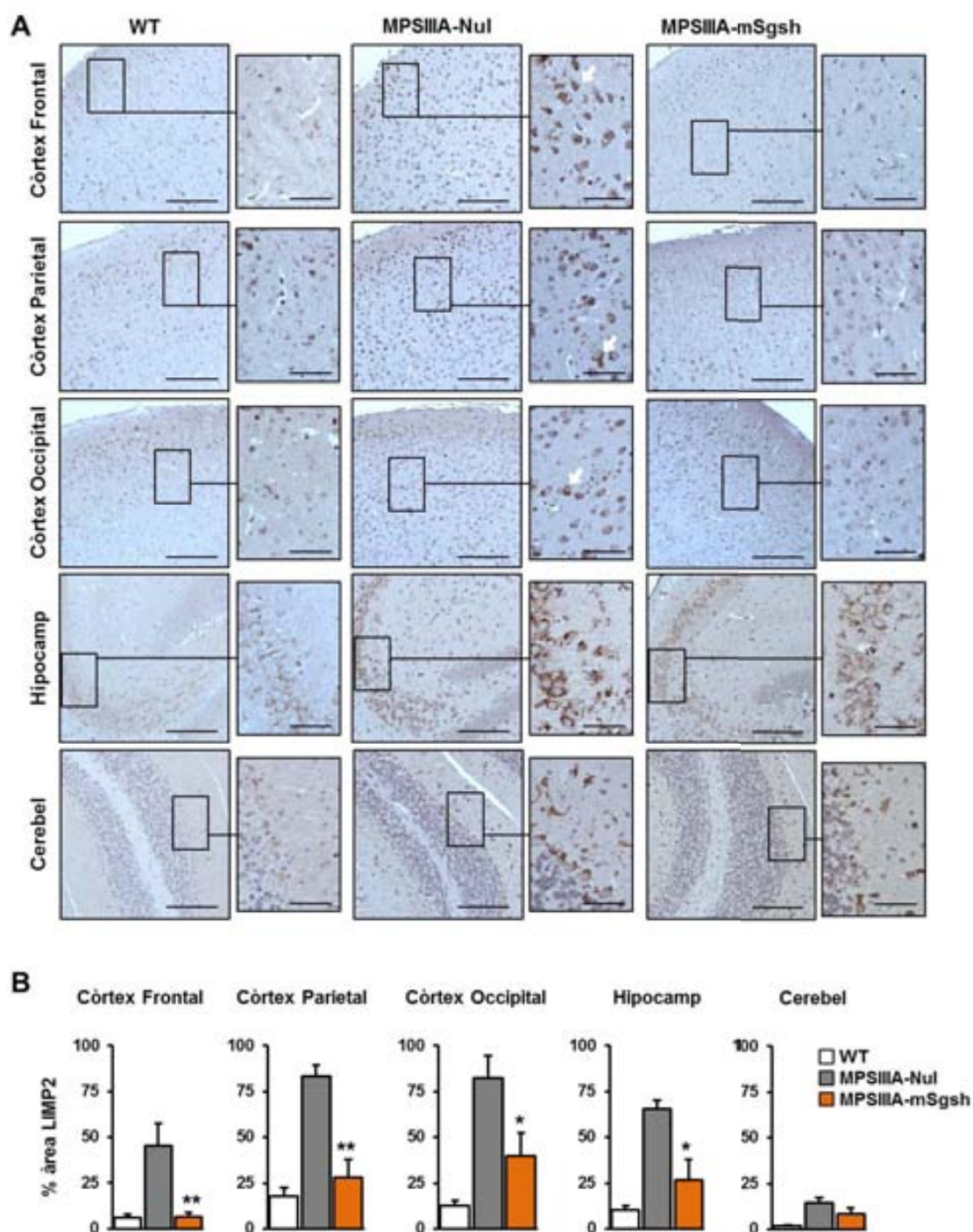


Figura 5. Millora a llarg termini de la dis tensió lisosòmica a l SNC després del tractament amb l'AAV9-mSgsh. (A) Anàlisi immunohistoquímica amb el marcador LIMP2 a diferents regions del cervell de ratolins mascles WT i MPSIII A tractats amb el vector AAV9-Nul o bé el AAV9-mSgsh a la dosi alta (5×10^{10} vg/ratolí) analitzats després de 10-12 mesos post-injecció del vector. Les fletxes blanques indiquen les cèl·lules amb morfologia neuronal. Escala: $200 \mu\text{m}$ ($50 \mu\text{m}$ per l'ampliació). **(B)** Els histogrames mostren la quantificació de la intensitat de la senyal de LIMP2 de cada grup d'estudi. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM. $n = 4-5$ animals per grup. *, $p < 0,05$ i **, $p < 0,01$ vs. MPSIII A-Nul.

1.2.4. Tipus cel·lular amb distensió lisosòmica

L'anàlisi immunohistoquímica amb el marcador LIMP2 en ratolins MPSIIIA tractats amb el vector AAV9-Nul, tant a 4 mesos com a 10-12 mesos post-tractament, va suggerir que les cèl·lules amb una marcada distensió lisosòmica presentaven una possible morfologia neuronal (Figura 4 i 5). Així doncs, es van realitzar una sèrie d'estudis de colocalització per confirmar els tipus cel·lular més afectats per la patologia lisosòmica al SNC de ratolins MPSIIIA mitjançant les immunotincions dobles per LIMP2 (marcador de lisosomes) i els marcadors específics de les cèl·lules del SNC com neurones (nucli neuronal o *Neuronal Nuclei*, NeuN), astròcits (proteïna àcida fibril·lar glial o *Glial Fibrillar Acidic Protein*, GFAP) i micròglia (Antigen de Mac2). Es va observar que la majoria de cèl·lules LIMP2+ dels ratolins MPSIIIA no tractats eren neurones, essent aproximadament el 73% del total de les cèl·lules LIMP2 positives (Figura 6).

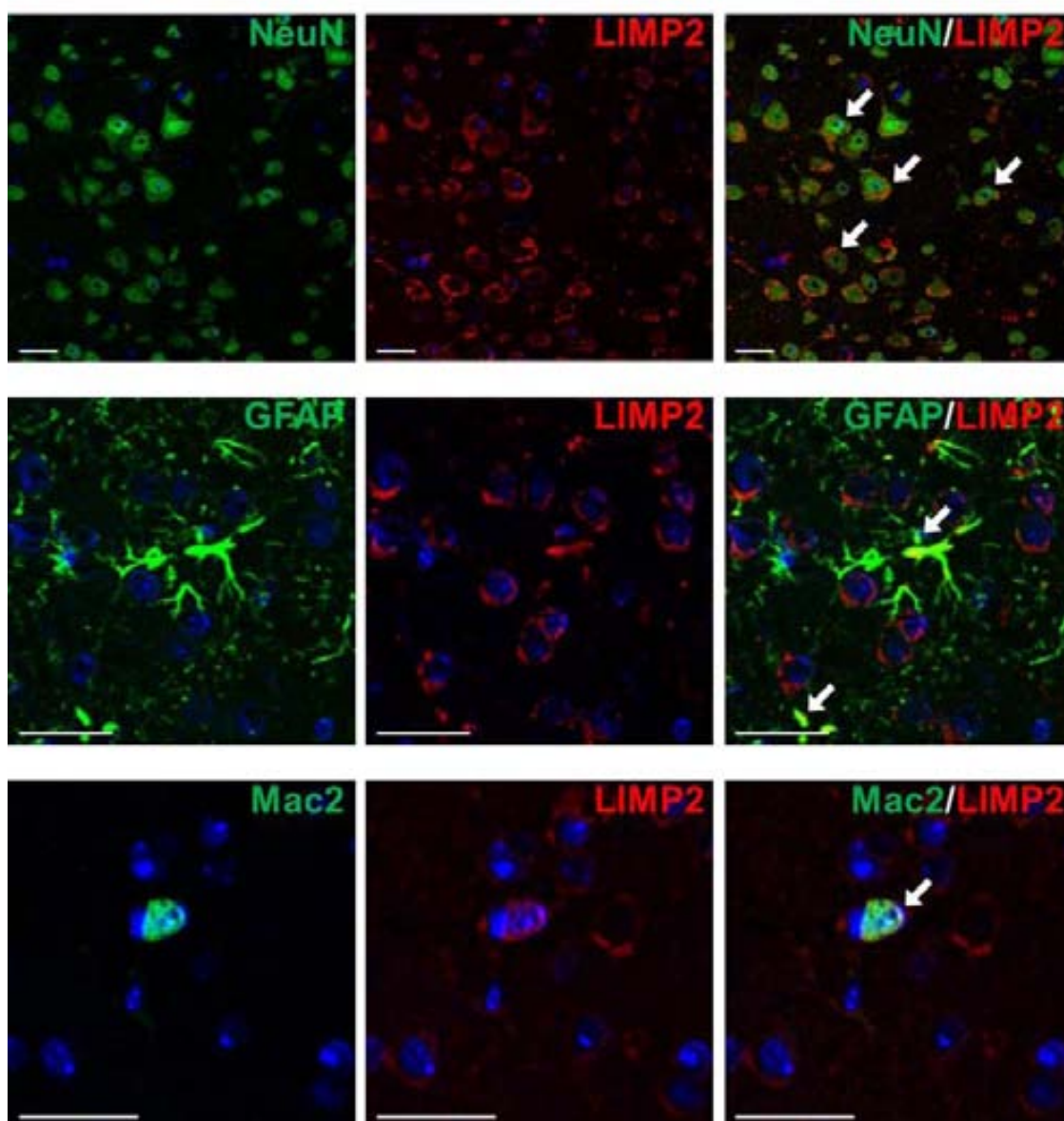


Figura 6. Patologia lisosòmica a les cèl·lules del SNC dels ratolins MPSIIIA. Estudis de colocalització mitjançant l'ús de la microscòpia confocal a seccions de cervell de ratolins MPSIIIA no tractats amb la immunotinció doble de LIMP2 (vermell) i els marcadors específics de cèl·lules del SNC (verd): neurones (NeuN, panells superiors), astròcits (GFAP, panells centrals) i micròglia (antigen Mac2, panells inferiors). Les fletxes blanques indiquen les cèl·lules doble positives. Escala: 25 μ m.

1.2.5. Ultraestructura del còrtex cerebral

L'anàlisi de la ultraestructura del còrtex frontal per microscòpia electrònica de transmissió (MET) va confirmar la reducció de la patologia lisosòmica, prèviament detectada i quantificada mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica contra LIMP2. En els ratolins MPSIIIA injectats amb el vector Nul i analitzats tant a curt com a llarg termini, es va observar una alteració de l'aparença normal de les neurones i, principalment, de les cèl·lules glials perineuronals que apareixien molt disteses i plenes de grans vesícules (Figura 7A). Als ratolins MPSIIIA tractats amb el vector AAV9-mSgsh es va analitzar la ultraestructura del còrtex cerebral després de 4 mesos de l'administració. Aquests ratolins es van observar una total absència de vesícules d'acumulació en les neurones i cèl·lules glials perineuronals del còrtex cerebral (Figura 7A). A més, la correcció de la patologia d'acumulació lisosòmica es va mantenir a llarg termini als ratolins MPSIIIA tractats (> 10 mesos) amb l'AAV9-mSgsh (Figura 7B). Per tant, aquest estudi va demostrar una completa restauració de l'aparença i morfologia de les neurones i les cèl·lules glials perineuronals després del tractament tant a curt com a llarg termini.

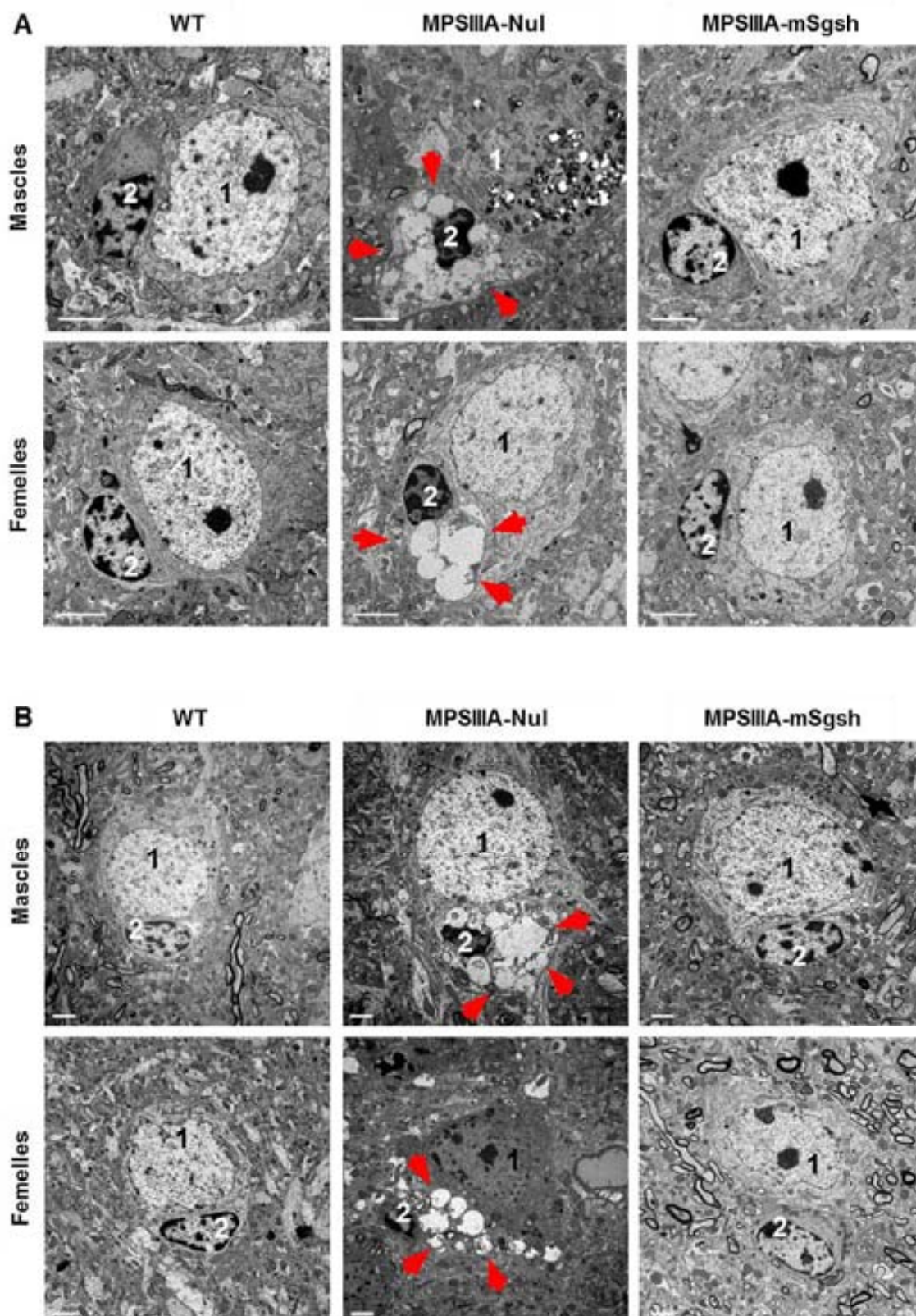


Figura 7. Ultraestructura del còrtex frontal. (A, B) MET il·lustrant la reducció de la patologia lisosòmica a les cèl·lules del còrtex frontal després de 4 mesos (A) o 10 mesos (B) de tractament amb l'AAV9-mSgsh a la dosi alta (5×10^{10} vg/ratolí). Els animals es van analitzar juntament amb els ratolins WT i MPSIIIA in jectats amb el vector AAV9-Nul. Les fletxes vermelles indiquen els vacúols electroluminescents de les cèl·lules glials perineuronals. (1) neurona, (2) cèl·lula glial perineuronal. Barres d'escala: 2 μm.

1.2.6. Anàlisi de la neuroinflamació

A part de la patologia lisosòmica present a les neurones i les cèl·lules de la glia dels ratolins MPSIIIA, el SNC de pacients de la MPSIIIA, com també del model murí de la malaltia, presenten neuroinflamació (Fraldi, 2007; Wilkinson 2012; Kurihara, 1996; Tamagawa, 1985). Per tal d'avaluar l'efecte terapèutic del tractament, es va realitzar l'anàlisi immunohistoquímica de les seccions del cervell utilitzant un marcador específic per a astròcits, GFAP, i un altre per a la micròglia activada, BSI-B4 (Isolectina B4). Així doncs, després de 4 mesos de tractament amb la dosi alta en ratolins MPSIIIA, es va observar una dràstica reducció estadísticament significativa de l'astrocitosi a les diferents regions del cervell analitzades mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica contra GFAP (Figura 8A). A més, l'anàlisi immunohistoquímica amb el marcador de la lectina BSI-B4 va mostrar l'absència d'infiltració per part de la micròglia en les diferents àrees del cervell analitzades tant en ratolins sans (WT) com també en ratolins MPSIIIA tractats amb la dosi alta d'AAV9-mSgsh (Figura 8B).

L'estat de la neuroinflamació en ratolins MPSIIIA després de 10 mesos de tractament amb 5×10^{10} vg/ratolí del vector AAV9-mSgsh també es va avaluar mitjançant la immunohistoquímica contra GFAP i BSI-B4. L'anàlisi immunohistoquímica utilitzant el marcador d'astròcits (GFAP) va mostrar una reducció estadísticament significativa de la intensitat de senyal de GFAP a diferents àrees del cervell dels ratolins MPSIIIA tractats (Figura 9A). A més a més, la immunohistoquímica contra BSI-B4 a cervell no va mostrar cap evidència d'infiltració de la micròglia després de 10 mesos de tractament (Figura 9B). Per tant, la correcció de la neuroinflamació en ratolins MPSIIIA observada a curt termini també es mantenia a llarg termini després de l'administració intra-PCR del vector AAV9-mSgsh.

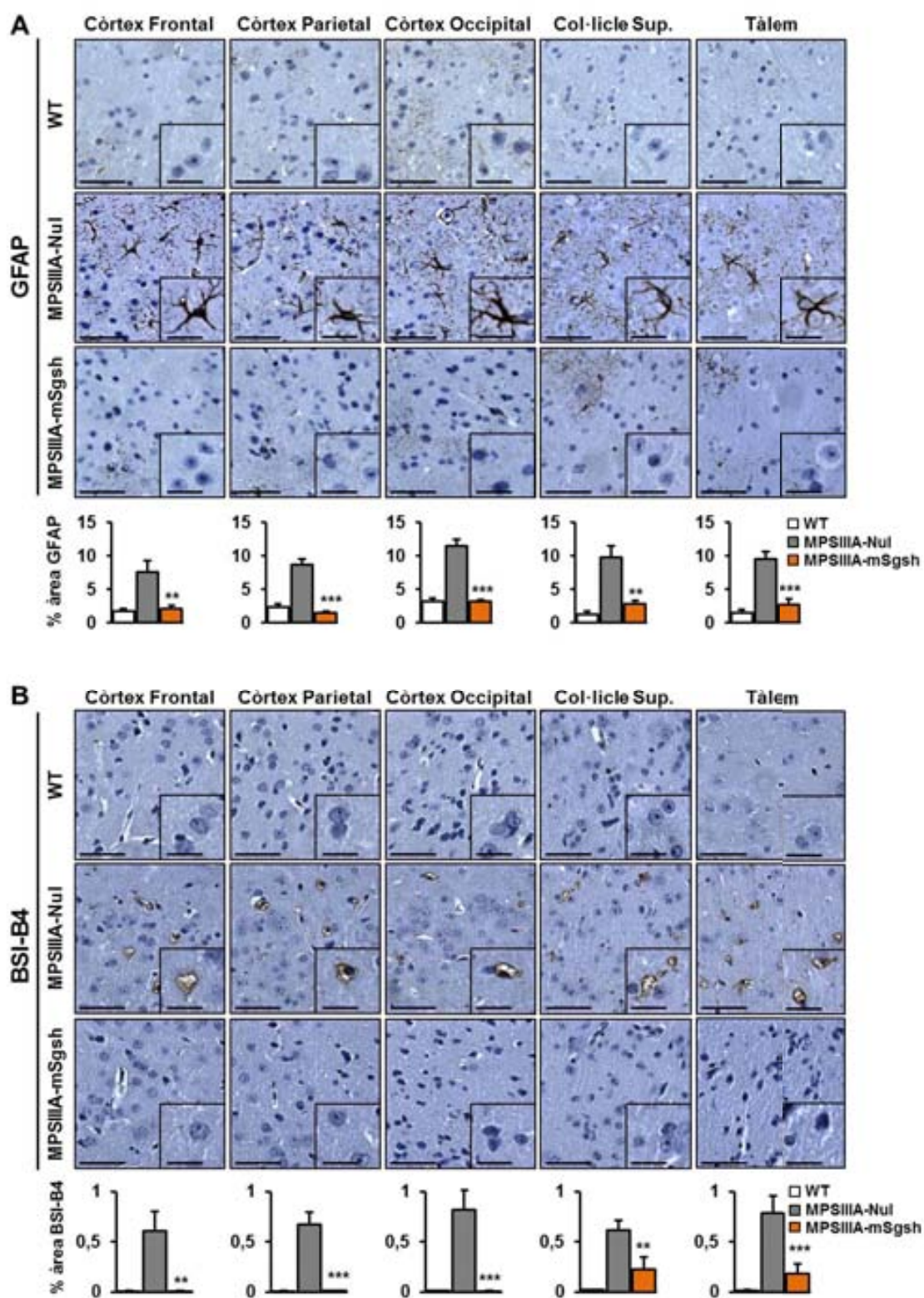


Figura 8. Correcció de la neuro inflamació després del tractament amb l'AAV9-mSgsh. (A, B) Anàlisi immunohistoquímica amb el marcador d'astròcits, GFAP, (A) i el marcador de la micròglia activada, BSI-B4 (B) a les seccions del còrtex frontal, parietal i occipital, col·licle superior i tàlem de ratolins mascles WT, i MPSIII A tractats amb 5×10^{10} vg de vectors AAV9-Nul o bé AAV9-mSgsh analitzats després de 4 mesos de tractament. Escala: 50 μ m (20 μ m per l'ampliació). Els histogrames representen la intensitat de senyal a cada àrea per cada grup de tractament. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM. n=4-5 animals per grup. **, $p < 0,01$ i ***, $p < 0,001$ vs. MPSIII A-Nul. Sup., superior.

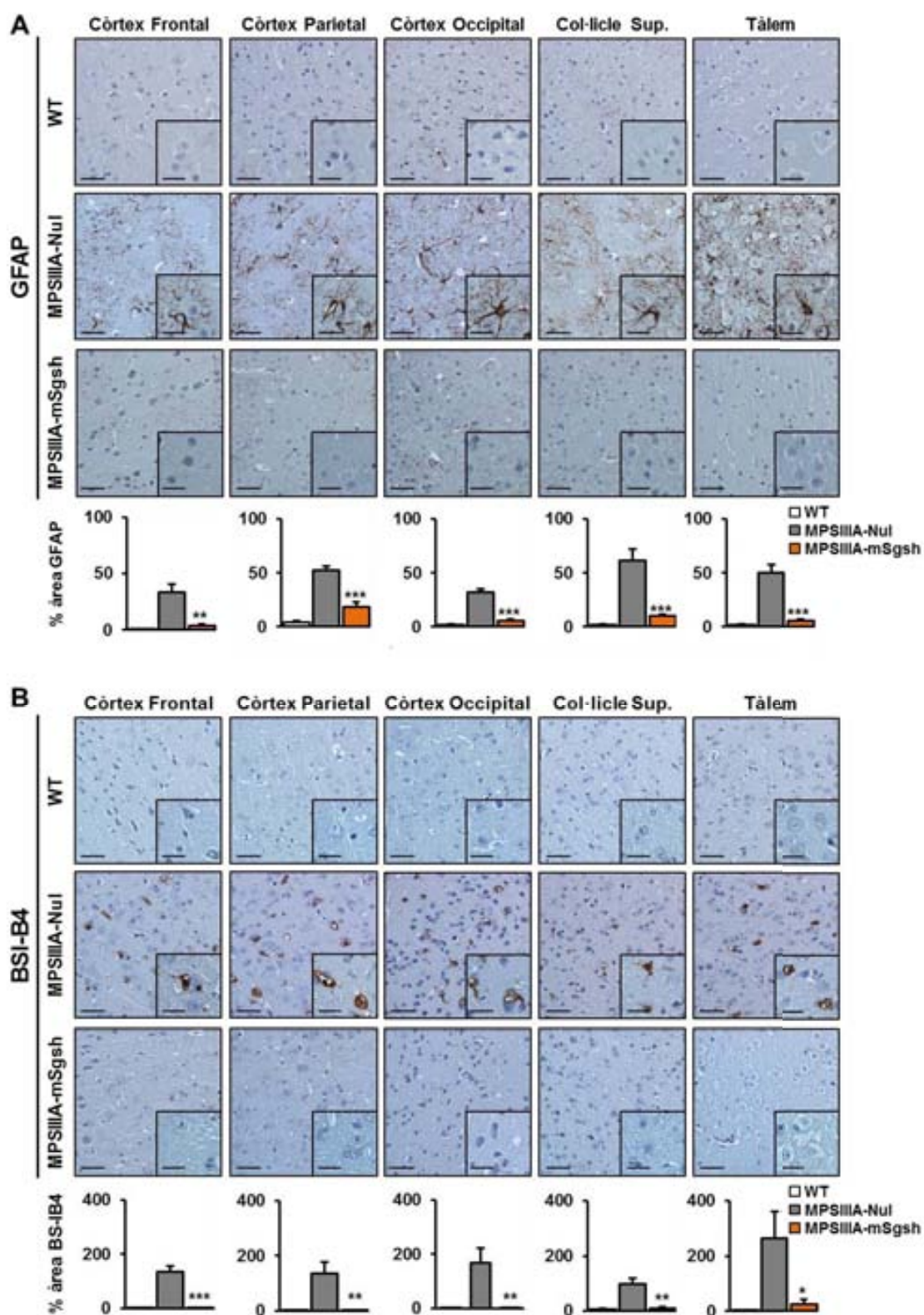


Figura 9. Correcció a llarg termini de la neuroinflamació després de la transferència intra-LCR de l'AAV9-mSgsh. (A, B) Anàlisi immunohistoquímica utilitzant el marcador d'astròcits GFAP (A) i el marcador de microglia activada BSI-B4 (B) a diferents regions del cervell de ratolins WT i MPSIII A tractats amb el vector AAV9-Nul o AAV9-mSgsh a la dosi de 5×10^{10} vg/ratolí analitzats 10 mesos després del tractament. Escala: 50 μ m (20 μ m per les ampliacions). Els histogrames mostren la intensitat de senyal de cada grup experimental. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM. n=4-5 animals per grup. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ i ***, $p < 0,001$ vs. MPSIII A-Nul. Sup., superior.

1.3. Efecte en la patologia somàtica de l'administració intra-LCR de l'AAV9-mSgsh

1.3.1. Activitat sulfamidasa a fetge i sèrum

Els estudis de biodistribució de l'AAV9 administrat intra-LCR realitzats prèviament al nostre laboratori van demostrar que una part del vector viral drenava des del LCR cap a la circulació perifèrica transduint eficientment el fetge (Tesi doctoral A. Ruzo, 2010). En els ratolins MPSIIIA tractats amb la dosi alta de l'AAV9-mSgsh per via intracisternal es va analitzar l'activitat sulfamidasa de fetge i es va detectar uns nivells propers al 190% de l'activitat WT en mascles (Figura 10A) i al 20% de l'activitat WT en femelles (Figura 10B). Durant el període de tractament dels ratolins MPSIIIA, l'activitat sulfamidasa es va monitoritzar a sèrum periòdicament i es va evidenciar la correlació entre els valors del sèrum i els valors detectats a fetge tant en mascles com en femelles (Figura 10). Els animals mascles i femelles tractats a la dosi baixa van presentar valors pràcticament indetectables a fetge i sèrum, similars als observats en ratolins MPSIIIA no tractats o injectats amb el vector AAV9-Nul (Figura 10). Aquestes dades suggerien que el fetge era la principal font productora de l'enzim circulant. Les diferències de gènere observades a l'activitat sulfamidasa de fetge i sèrum van estar d'acord amb la diferència de l'eficiència de transducció dels vectors AAVs a fetge de ratolins, demostrada per altres estudis anteriors (Ruzo, 2012; Ruzo, 2012b; Davidoff, 2003).

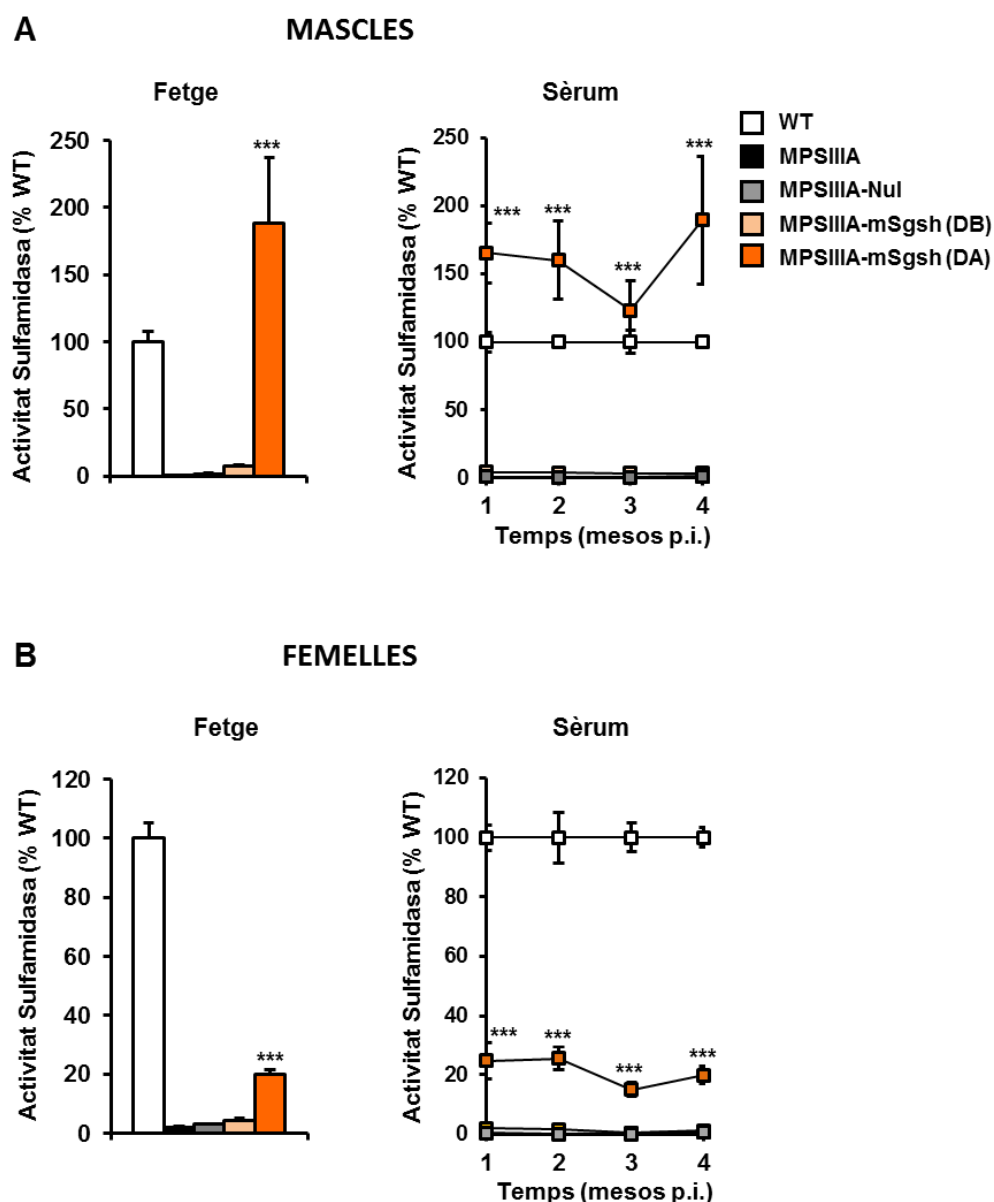


Figura 10. Producció de sulfamidasa a fetge i secreció a sèrum després de l'administració intracisternal amb l'AAV9-mSgsh. (A, B) Percentatge d'activitat sulfamidasa a fetge i sèrum de ratolins MPSIIIA mascles (A) i femelles (B) després de 4 mesos de l'administració intra-PCR del vector AAV9-mSgsh a una dosi de 5×10^9 (DB) o 5×10^{10} (DA) vg/ratolí o 5×10^{10} (DA) vg/ratolí del vector AAV9-Nul, utilitzat com a control. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM; $n=5-8$ animals per grup. ***, $p < 0,001$ vs. MPSIIIA-Nul. p.i., post-injecció; DA, dosi alta; DB, dosi baixa.

Després d'aproximadament un any d'una única administració intracisternal de 5×10^{10} vg/ratolí de l'AAV9-mSgsh, es va observar que l'activitat sulfamidasa encara era detectable a fetge i sèrum de ratolins MPSIIIA mascles i femelles tractats, en comparació a ls valors pràcticament indetectables dels animals MPSIIIA no tractats (Figura 11). Per tant, la transferència gènica directa al SNC del vector AAV9-mSgsh aconseguia mantenir uns bons nivells d'enzim circulant durant un llarg període de temps.

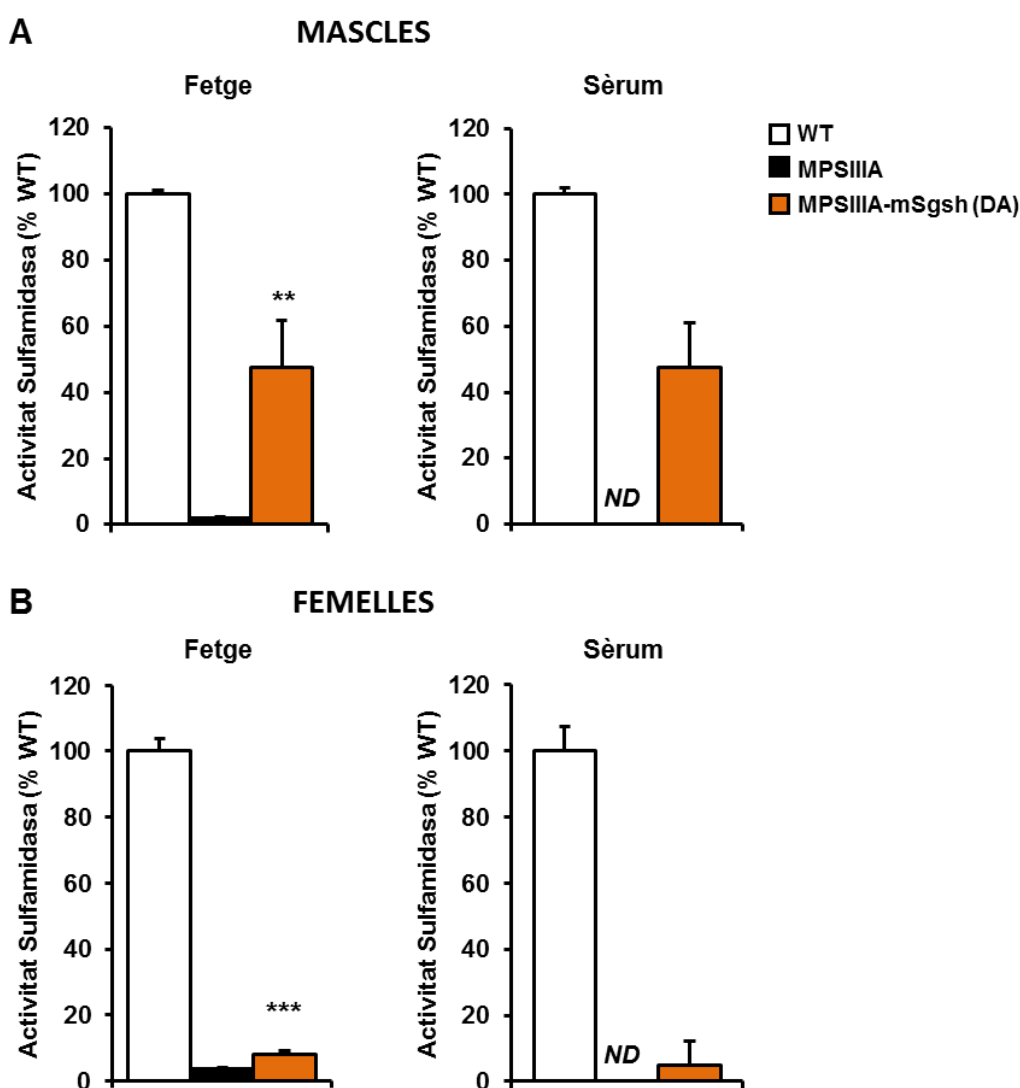


Figura 11. Producció i secreció hepàtica de sulfamidasa a llarg termini. (A, B) Percentatge d'activitat sulfamidasa a fetge i sèrum de ratolins MPSIIIA mascles (A) i femelles (B) després d'una única administració del vector AAV9-mSgsh (5×10^{10} vg/ratolí). Els animals es van analitzar després de 10-12 mesos de tractament juntament amb WT i MPSIIIA no tractats, utilitzats com a control. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM; n=4-5 animals per grup. **, $p < 0,01$ i ***, $p < 0,001$ vs. MPSIIIA no tractats. ND: no detectable. DA, dosi alta.

1.3.2. *Acumulació de GAGs a teixits perifèrics*

L'eficàcia del tractament en la patologia somàtica es va avaluar després de 4 mesos de tractament mitjançant la quantificació de l'acumulació de GAGs. A la dosi alta testada, es va observar una reducció estadísticament significativa del contingut de GAGs a la majoria de teixits perifèrics analitzats d'ambdós sexes (Figura 12). De fet, els ratolins mascles MPSIIIA tractats amb la dosi alta de l'AAV9-mSgsh van mostrar una completa correcció (96-100% de reducció) del contingut de GAGs a la majoria de teixits somàtics, a excepció de la melsa i el ronyó que van presentar una correcció del 85% (Figura 12A). D'altra banda, els ratolins MPSIIIA femelles tractats a la dosi alta van presentar una reducció de l'acumulació de GAGs >70% en tots els teixits analitzats exceptuant el ronyó (Figura 12B), òrgan altament refractari al tractament. A la dosi baixa testada en ratolins mascles MPSIIIA, es va assolir una correcció total del contingut de GAGs a fetge juntament amb una reducció parcial, però estadísticament significativa, a d'altres teixits perifèrics (Figura 12A), tot i els nivells no detectables d'activitat sulfamidasa a fetge i sèrum (Figura 10A). Ara bé, els nivells de correcció assolits en femelles MPSIIIA tractades a la dosi baixa era més limitat permetent únicament la reducció parcial de l'acumulació de GAGs en alguns òrgans somàtics, com el fetge, el pulmó i la melsa (Figura 12B). Per tant, la correcció de la patologia somàtica a ratolins MPSIIIA amb la dosi alta avaluat a curt termini va mostrar una clara eficàcia terapèutica, mentre que a la dosi baixa només es va aconseguir una correcció parcial en alguns teixits perifèrics a causa dels nivells d'activitat sulfamidasa pràcticament indetectables a fetge i sèrum.

També es va avaluar l'acumulació de GAGs a ratolins MPSIIIA després de 10-12 mesos de tractament amb la dosi alta de l'AAV9-mSgsh. El grup de ratolins mascles tractats van presentar una reducció estadísticament significativa del contingut de GAGs de tots els òrgans somàtics analitzats (Figura 13A); mentre que les femelles MPSIIIA tractades van mostrar una disminució a tots els teixits perifèrics amb la correcció total a fetge, melsa i cor (Figura 13B). Aquestes diferències de correcció de l'acumulació de GAGs entre ambdós sexes van ser provocades pels diferents nivells de transducció del fetge per part dels AAVs. Tot i això, els nivells de producció de sulfamidasa assolits eren capaços de mantenir la correcció de la patologia somàtica de la MPSIIIA a llarg termini.

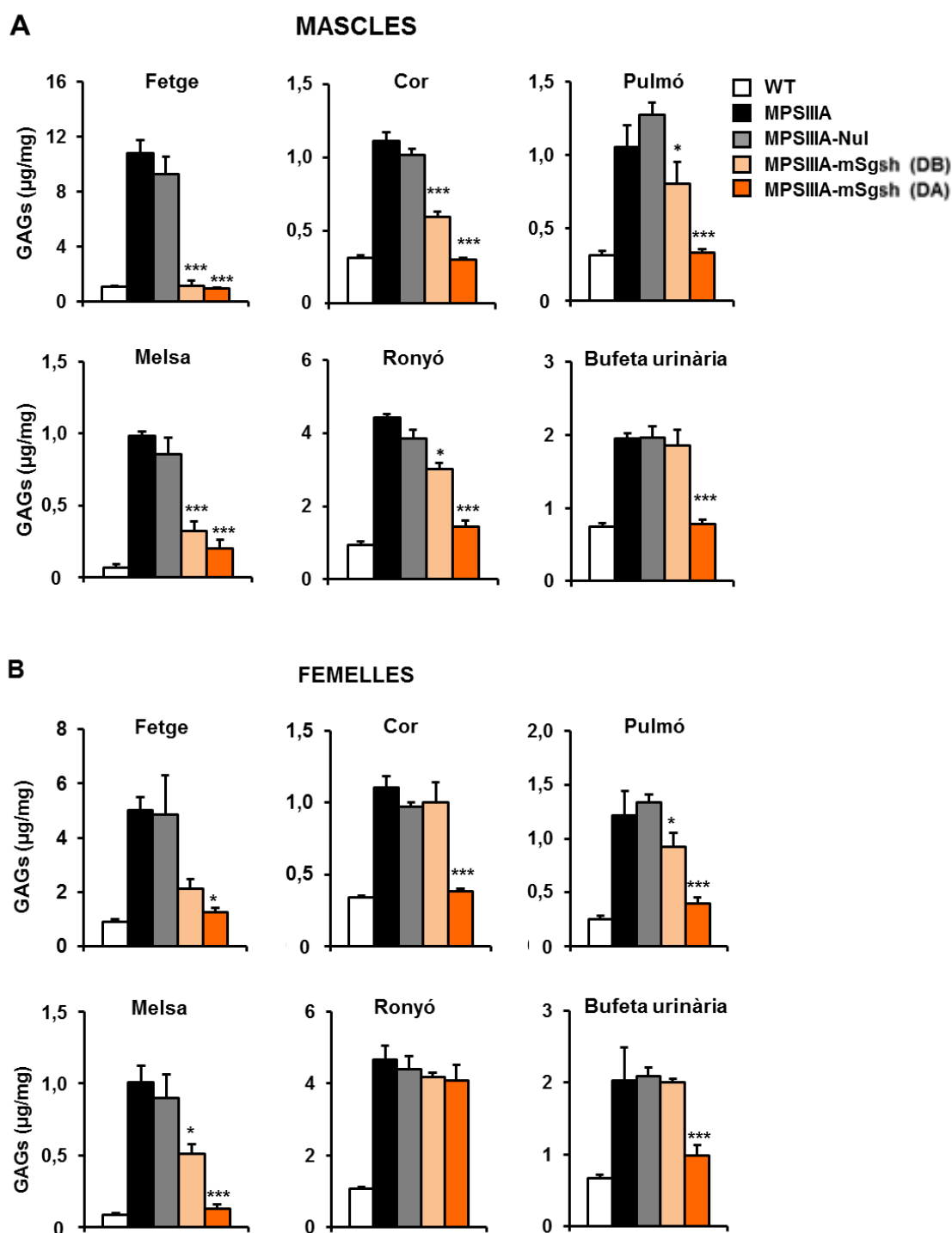


Figura 12. Correcció del contingut de GAGs després de l'administració intracisternal de l'AAV9-mSgsh. (A, B) Quantificació del contingut de GAGs a fetge, cor, pulmó, melsa, ronyó i bufeta urinària de tots els grups experimentals tant mascles (A) com femelles (B) després de 4 mesos de tractament. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM; $n=5-8$ a animals per grup. *, $p<0,05$ i ***, $p<0,001$ vs. MPSIIIA-Nul. DA, dosi alta; DB, dosi baixa.

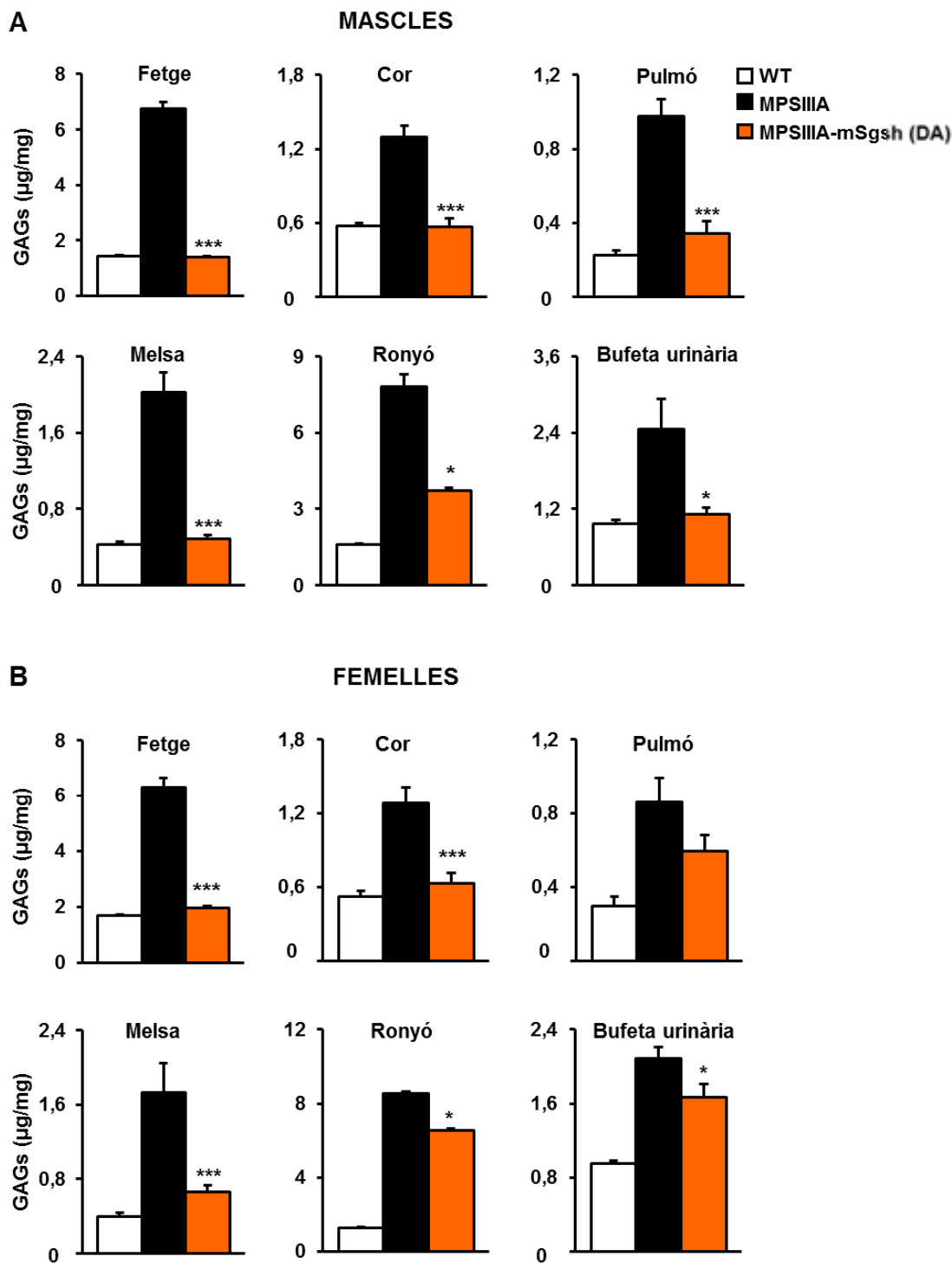


Figura 13. Correcció a llarg termini de l'acumulació de GAGs després de l'administració intra- LCR del vector AAV9-mSgsh a la dosi alta. (A, B) Quantificació del contingut de GAGs a fetge, cor, pulmó, melsa, ronyó i bufeta urinària a ratolins mascles (A) i femelles (B) WT, MPSIIIA no tractats i MPSIIIA tractats a la dosi alta (5×10^{10} vg/ratolí) del vector AAV9-mSgsh. Els animals es van analitzar després de 10-12 mesos de tractament. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM; $n=4-5$ animals per grup. *, $p < 0,05$ i *, $p < 0,001$ vs. MPSIIIA no tractats. DA, dosi alta.**

1.3.3. Distensió lisosòmica dels teixits perifèrics

D'acord amb la correcció de l'acumulació de GAGs als teixits perifèrics de ratolins MPSIIIA tractats a la dosi alta de l'AAV9-mSgsh, l'anàlisi immunohistoquímica en camp clar contra la proteïna lisosòmica associada a la membrana (o *Lysosomal Associated Membrane Protein*, LAMP1) va revelar una reducció de la mida dels compartiments lisosòmics a diversos òrgans somàtics d'ambdós sexes després de 4 mesos de tractament (Figura 14). A més, la correcció de la distensió lisosòmica es va mantenir després d'aproximadament un any de l'administració de l'AAV9-mSgsh directament al LCR (Figura 15). Aquests resultats van demostrar que els nivells de sulfamidasa produïda pel fetge de mascles i femelles eren suficients per corregir la mida del compartiment lisosòmic en els ratolins MPSIIIA.

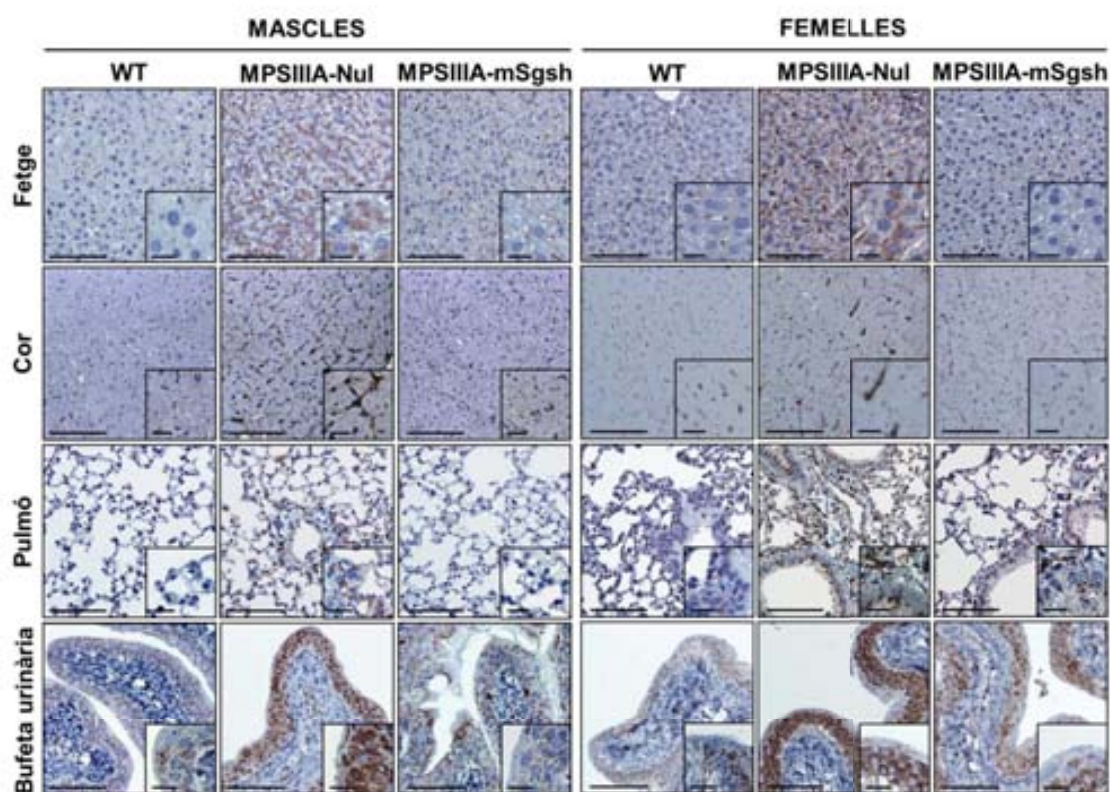


Figura 14. Disminució de la mida del compartiment lisosòmic després de la teràpia gènica intra-LCR. Anàlisi immunohistoquímica utilitzant el marcador de lisosomes LAMP1 a fetge, cor, pulmó i bufeta urinària de ratolins mascles i femelles sans (WT), afectats (MPSIIIA AAV9-Nul) i tractats (AAV9-mSgsh a una dosi de 5×10^{10} vg/ratolí) analitzats 4 mesos post-injecció. n = 4-5 animals per grup. Escala: 100 μ m (20 μ m per les ampliacions).

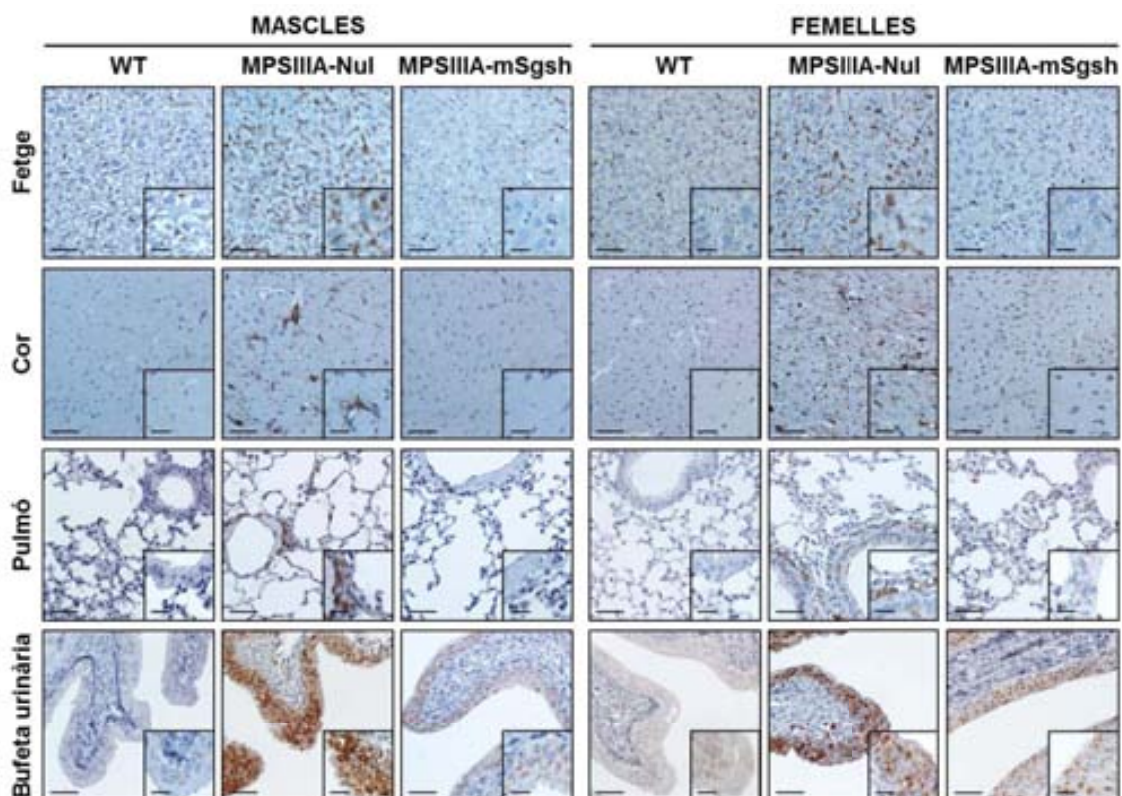


Figura 15. Correcció a llarg termini de la mida del compartiment lisosòmic després del tractament amb l'AAV9-mSgsh directa al SNC. Anàlisi immunohistoquímica utilitzant el marcador lisosòmic LAMP1 a fetge, cor, pulmó i bufeta urinària de ratolins mascles WT, MPSIIIA injectats amb el vector AAV9-Nul i MPSIIIA tractats amb l'AAV9-mSgsh (5×10^{10} vg/ratolí). Els animals es van analitzar després de 10 mesos de tractament. $n = 3$ animals per grup. Escala: 100 μm (20 μm per les ampliacions).

1.3.4. Ultraestructura del fetge

L'anàlisi de la ultraestructura del fetge per MET va confirmar els resultats observats per immunohistoquímica contra LAMP1. Els ratolins MPSIIIA-Nul van presentar múltiples petites vesícules electroluminescents tant als hepatòcits com a les cèl·lules de Kupffer (Figura 16). Per contra, els ratolins tractats amb l'AAV9-mSgsh van mostrar una total absència de vacúols d'acumulació en ambdós tipus cel·lulars del fetge assolint la mateixa aparença que presentaven els ratolins WT (Figura 16). Per tant, es va demostrar que el tractament amb l'AAV9-mSgsh permetia una completa eliminació de les vesícules d'acumulació dels hepatòcits i les cèl·lules de Kupffer després de 10 mesos de tractament.

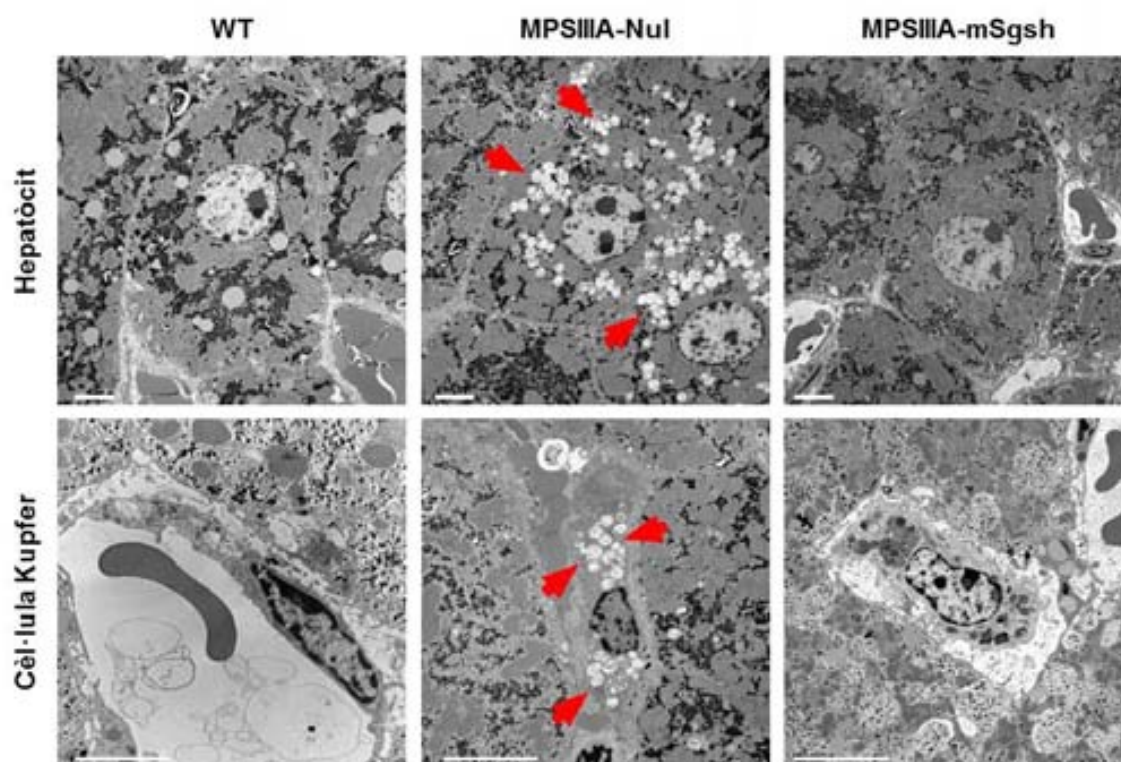


Figura 16. Ultraestructura del fetge. MET il·lustrant la reducció de la patologia lisosòmica a les cèl·lules del còrtex frontal després de 10 mesos de tractament amb l'AAV9-mSgsh a la dosi alta (5×10^{10} vg/ratolí). Els animals es van analitzar juntament amb els ratolins WT i MPSIII A injectats amb el vector AAV9-Nul. Les fletxes vermelles indiquen els vacúols electroluminescents dels hepatòcits i les cèl·lules de Kupffer. Barres d'escala: 4 μ m.

1.3.5. Correcció funcional de la MPSIIIA després de l'administració directa al LCR de l'AAV9-mSgsh

L'impacte funcional de l'administració intra-LCR de l'AAV9-mSgsh es va avaluar mitjançant el test de comportament anomenat Prova de camp obert (*Open-Field*, OF) que consisteix en l'anàlisi de l'activitat exploratòria i locomotora general dels ratolins en un ambient desconegut. L'arena quadrada a on es va dur a terme la prova es va delimitar en tres àrees concèntriques per tal d'avaluar el paràmetre de número total de línies creuades com també la distància total recorreguda, el número total de *rearings* (aixecar-se sobre les potes del darrere) i el temps en repòs. Després de quatre mesos de tractament amb l'AAV9-mSgsh, es van avaluar els ratolins al test de l'OF juntament amb WT, MPSIIIA no tractats i injectats amb el vector AAV9-Nul. Els ratolins MPSIIIA-Nul van mostrar una activitat exploratòria reduïda comparada amb els animals sans (WT) en els següents paràmetres analitzats: distància total recorreguda, número total de *rearings* i número total de línies creuades a les diferents zones delimitades a l'arena (Figura 17A). Aleshores, l'administració intracisternal de 5×10^{10} vg de l'AAV9-mSgsh a ratolins MPSIIIA va permetre la correcció total dels dèficits de comportament, tot i que no es va observar cap efecte terapèutic al grup tractat amb la dosi baixa (5×10^9 vg/ratolí) (Figura 17A). La millora funcional observada amb la dosi alta a quatre mesos post-tractament també es va mantenir després de 10 mesos de l'administració del vector AAV9-mSgsh directament al LCR (Figura 17B). Per tant, la correcció funcional dels ratolins MPSIIIA tractats es va mantenir a llarg termini, però va requerir una correcció considerable de la patologia d'acumulació lisosòmica assolida únicament amb la dosi de 5×10^{10} vg/ratolí de l'AAV9-mSgsh.

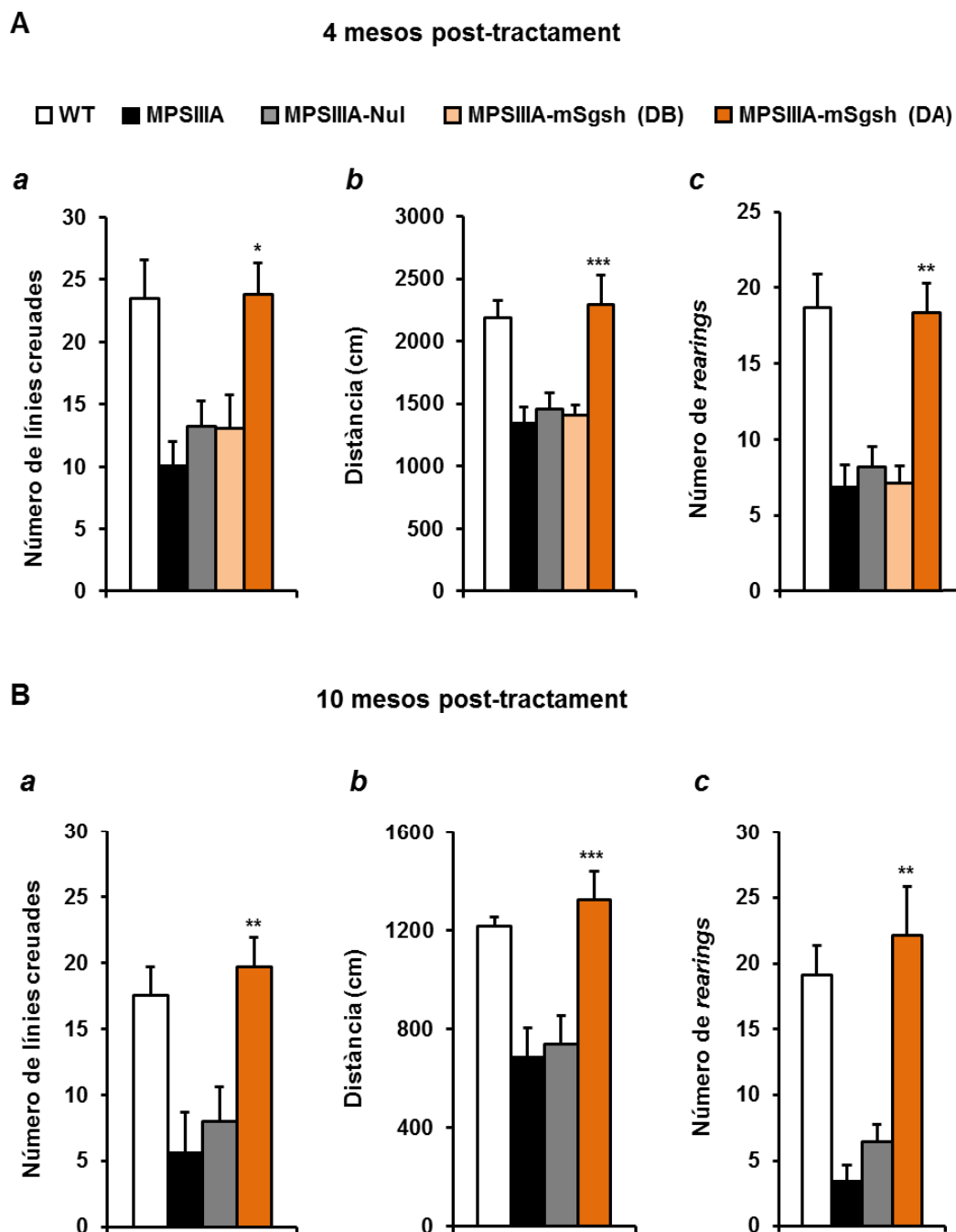


Figura 17. Correcció dels dèficits de comportament després de l'administració intra-ICR de l'AAV9-mSgsh. (A, B) Els ratolins mascles WT, MPSIIIA no tractats i tractats, naïf pel test de l'OF, es van avaluar després de 4 mesos (A) o 10 mesos (B) post-tractament amb una dosi de 5×10^9 (DB) o 5×10^{10} (DA) vg/ratolí de l'AAV9-mSgsh o 5×10^{10} (DA) vg/ratolí del vector AAV9-Nul, utilitzat com a control. Les dades corresponen a l'activitat exploratòria i locomotora enregistrada durant els 3 primers minuts del test i es representen com a mitjana \pm SEM de 10-15 animals per grup a 4 mesos post-tractament i 5-17 animals per grup a 10 mesos post-tractament. (a) Número total de línies creuades, (b) Distància total recorreguda, i (c) Número total de rearings. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ i ***, $p < 0,001$ vs. MPSIIIA-Nul. DA, dosi alta; DB, dosi baixa.

1.3.6. Supervivència dels ratolins MPSIIIA després de la transferència gènica

Un altre paràmetre per demostrar l'eficàcia terapèutica de la dosi alta del tractament va ser l'anàlisi de la supervivència dels ratolins després de l'administració. Tots els ratolins MPSIIIA que van rebre una dosi de 5×10^{10} vg/ratolí de l'AAV9-mSgsh van viure significativament més que els ratolins MPSIIIA no tractats. Els mascles tractats van mostrar una mediana de supervivència de 24 mesos, comparat amb els 16,2 mesos dels ratolins MPSIIIA no tractats ($p = 0,0132$) (Figura 18). Les femelles no tractades van tenir una mediana de supervivència de 12,3 mesos vs. els 20 mesos de les tractades amb el vector AAV9-mSgsh ($p = 0,0085$) (Figura 18). La supervivència mitjana de mascles i femelles sans va ser de 26,4 i 27 mesos, respectivament. L'increment del temps de supervivència en els ratolins tractats amb la dosi alta va demostrar l'eficàcia terapèutica de l'administració intra-LCR de l'AAV9-mSgsh recolzant la seva futura translació cap a un estudi clínic en humans malalts per a la MPSIIIA.

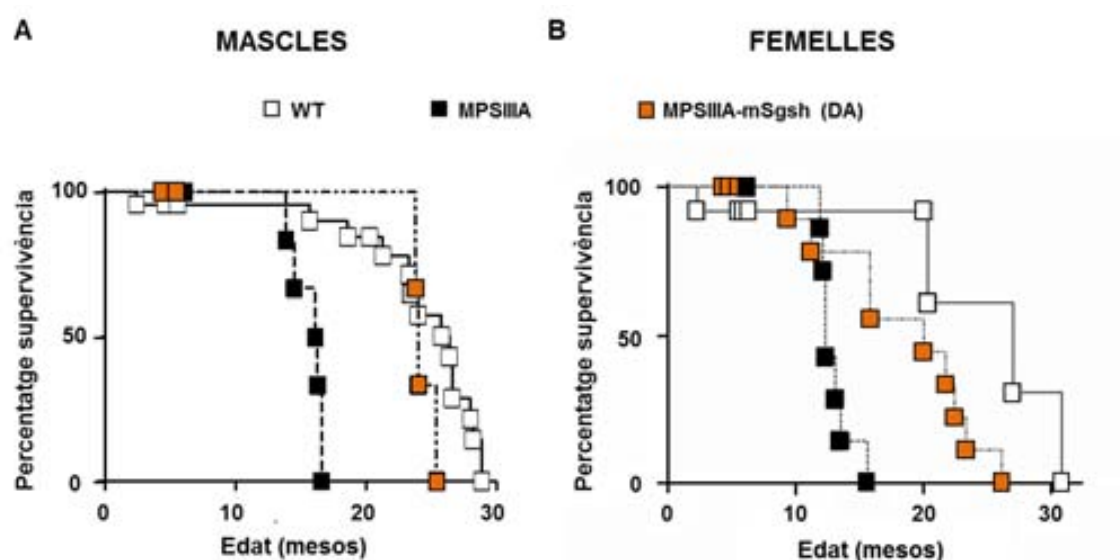


Figura 18. Supervivència dels ratolins MPSIIIA després del tractament amb el vector AAV9-mSgsh per via intracisternal. (A) Anàlisi de supervivència mitjançant l'anàlisi de Kaplan-Meier dels ratolins mascles WT (n=23), MPSIIIA (n=12) i MPSIIIA tractats amb la dosi alta d'AAV9-mSgsh (n=8), ratolins MPSIIIA no tractats vs. tractats, $p = 0,0132$. (B) Anàlisi de supervivència mitjançant l'anàlisi de Kaplan-Meier de ratolins femelles WT (n=12), MPSIIIA (n=12) i MPSIIIA tractats amb la dosi alta d'AAV9-mSgsh (n=13), ratolins MPSIIIA no tractats vs. tractats, $p = 0,0085$. DA, dosi alta.

1.4. Determinació de la mínima dosi amb eficàcia terapèutica del vector AAV9-mSgsh administrat directament al LCR

Després d'estudiar dues dosis diferents del vector AAV9 que codifica per a la sulfamidasa murina mitjançant l'administració directa al LCR, es va demostrar que la dosi alta (5×10^{10} vg/ratolí) presentava eficàcia terapèutica tant a curt com a llarg termini. El tractament va permetre l'increment de l'enzim deficient tant al SNC com també la seva producció i secreció des del fetge cap a la resta de teixits perifèrics, donant lloc a la correcció de la patologia neurològica i somàtica característica de la MPSIIIA. A més, aquesta millora terapèutica també va produir la normalització dels dèficits de comportament juntament amb un augment de la supervivència. En canvi, la dosi de vector viral baixa (5×10^9 vg/ratolí) només va evidenciar una correcció parcial de l'acumulació de GAGs sense cap signe de millora funcional. Aquest conjunt de dades va portar a l'EMA a suggerir, durant el procés de l'Assessorament Científic (o *Scientific Advice*) del Maig-Juny del 2012, la necessitat d'assajar dues noves dosis intermèdies, entre les analitzades anteriorment, per tal d'identificar una dosi més baixa de 5×10^{10} vg/ratolí amb eficàcia terapèutica.

El disseny experimental del nou estudi de dosis resposta va consistir en l'administració directa al LCR de tres dosis diferents ($1,08 \times 10^{10}$, $2,32 \times 10^{10}$ i 5×10^{10} vg/ratolí) del vector viral AAV9 codificant per a la sulfamidasa murina. Els ratolins MPSIIIA es van tractar a 2 mesos d'edat i se'ls va realitzar un seguiment mensual mitjançant la presa de mostra de sang en paral·lel amb els ratolins sans (WT), MPSIIIA no tractats i MPSIIIA injectats amb el vector AAV9-Nul (5×10^{10} vg/ratolí). Després de 4 mesos de tractament, es van sacrificar els animals per tal d'avaluar el grau de correcció de la patologia de la malaltia mitjançant l'anàlisi dels paràmetres bioquímics, histopatològics i funcionals. (Figura 19)

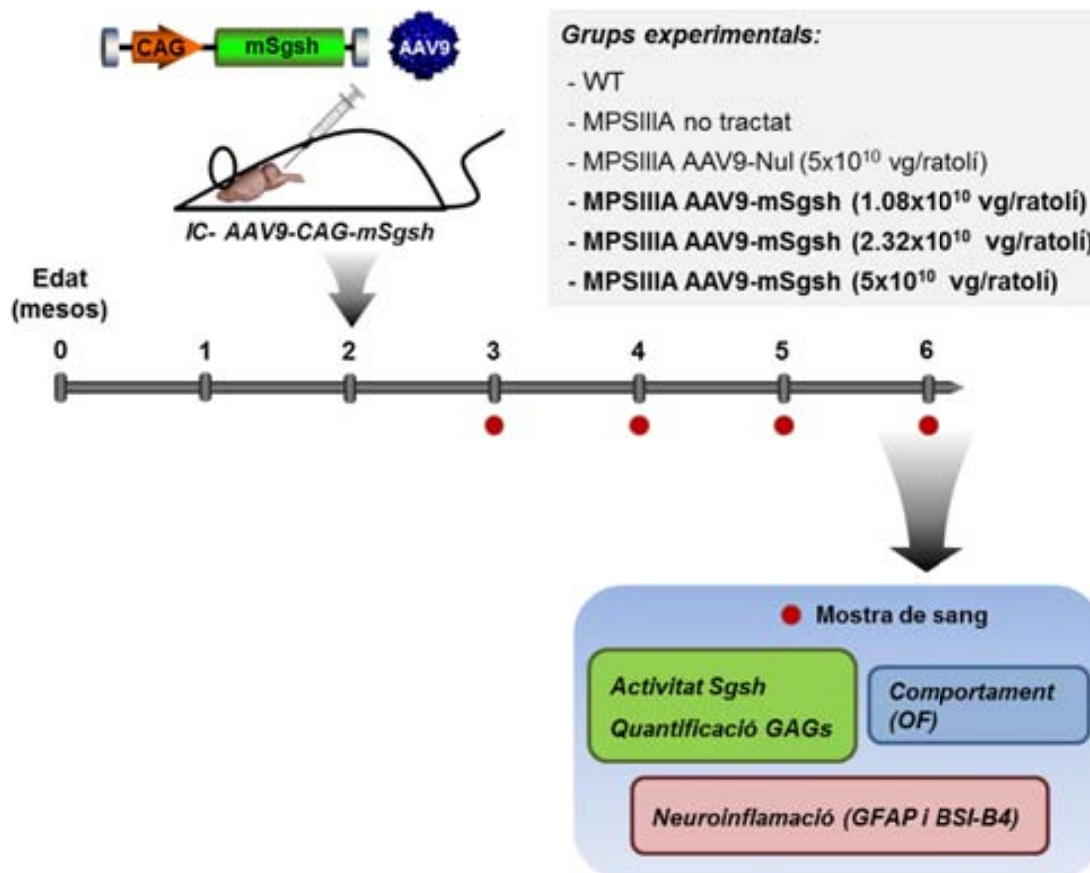


Figura 19. Disseny experimental de l'estudi dosis-resposta pel tractament dels ratolins MPSIIIA mitjançant l'administració intracisternal del vector AAV9-mSgsh. OF, Prova de camp obert o *Open-Field*; IC, intracisternal; WT, sans o *wild-type*. GFAP, Proteïna àcida fibril·lar glial o *Glial Fibrillar Acidic Protein*; BSI-B4, isolectina B4.

1.4.1. Acumulació de GAGs al cervell

Els estudis anteriors van evidenciar que els nivells d'activitat sulfamidasa assolits al SNC amb la dosi de 5×10^{10} vg/ratolí permetien la correcció de l'acumulació de GAGs a la majoria de regions del cervell. El nou estudi dosi-resposta també va revelar una reducció estadísticament significativa del contingut de GAGs a la majoria de seccions del cervell analitzades dels ratolins mascles MPSIIIA tractats a la dosi alta, com també a la nova dosi de $2,32 \times 10^{10}$ vg/ratolí (seccions I-II i IV-V, Figura 20A). A la dosi més baixa ($1,08 \times 10^{10}$ vg/ratolí), únicament es va detectar una disminució estadísticament significativa del dipòsit de GAGs a algunes parts del cervell (seccions I i IV, Figura 20A); mentre que a les altres regions només es va observar una disminució parcial no estadísticament significativa de l'acumulació de GAGs (seccions II, III i V, Figura 20A).

En el cas de les femelles tractades amb l'AAV9-mSgsh, la dosi de 5×10^{10} vg/ratolí va demostrar una correcció estadísticament significativa de l'acumulació de GAGs a la majoria de seccions del cervell (seccions I-IV Figura 20B), tal com es va observar amb anterioritat (Figura 3). Mentre que la dosi de $2,32 \times 10^{10}$ vg/ratolí en femelles va revelar una disminució del contingut de GAGs a totes les regions del SNC, amb una completa correcció estadísticament significativa a la secció II (Figura 20B). A la dosi de $1,08 \times 10^{10}$ vg/ratolí, es va observar una disminució parcial del dipòsit de GAGs a la majoria de regions del cervell analitzades, a excepció de la secció III on no es reduïa l'acumulació de GAGs al cervell (Figura 20B). En ambdós sexes, els ratolins MPSIIIA injectats amb l'AAV9-Nul van presentar els mateixos nivells de dipòsits de GAGs que els animals MPSIIIA no tractats (Figura 20).

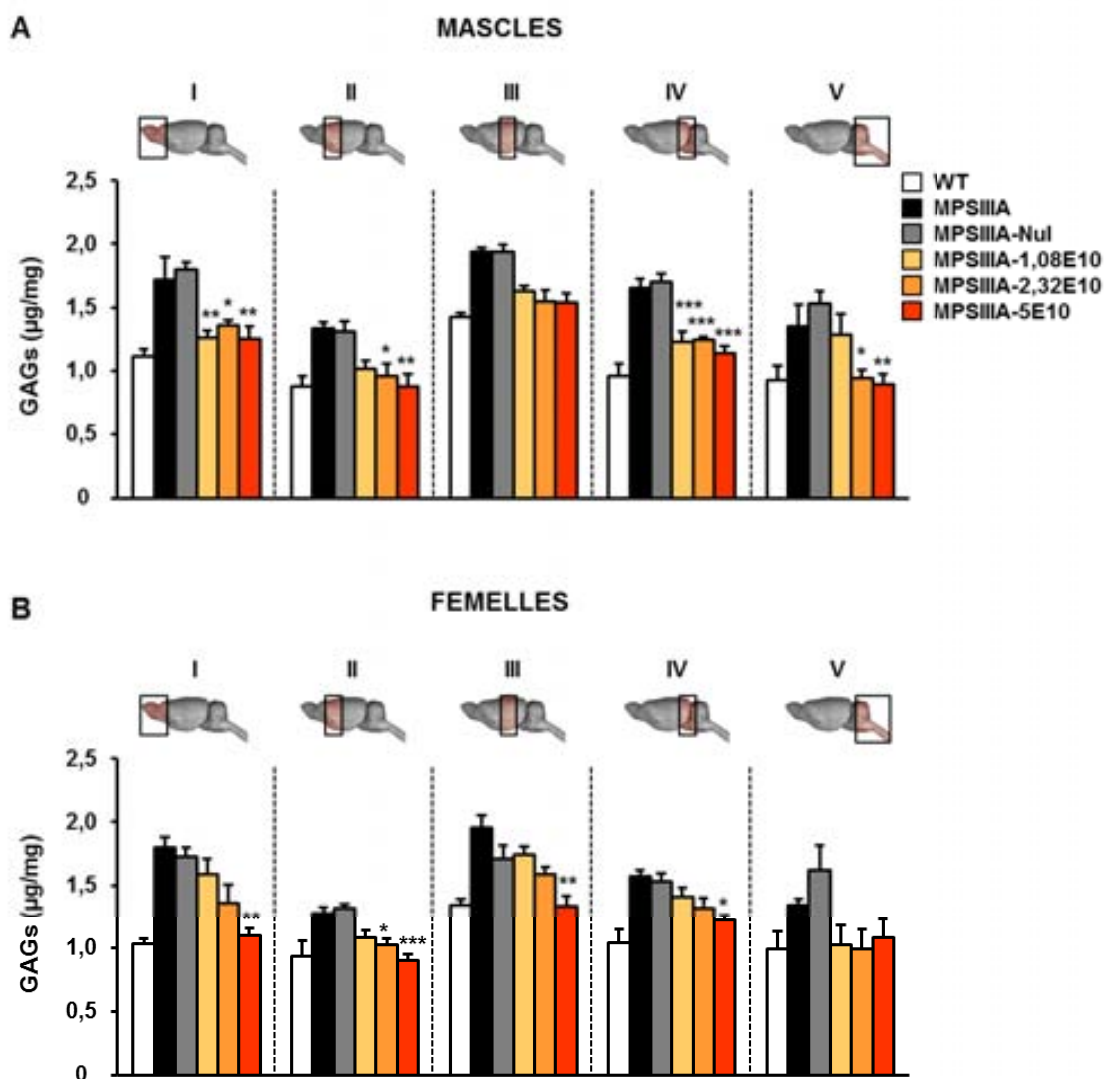


Figura 20. Correcció de l'acumulació de GAGs després de l'administració intracisternal del vector AAV9-mSgsh. (A, B) Quantificació del contingut de GAGs a cinc regions diferents del cervell (seccions I-V indicades en les imatges ubicades sobre les gràfiques) dels ratolins MPSIIIA mascles (A) i femelles (B) tractats a una dosi de $1,08 \times 10^{10}$, $2,32 \times 10^{10}$ o 5×10^{10} vg/ratolí del vector AAV9-mSgsh o amb 5×10^{10} vg/ratolí de l'AAV9-Nul, utilitzat com a control. Els ratolins es van analitzar després de 4 mesos de tractament en comparació amb WT i MPSIIIA no tractats i injectats amb el vector AAV9-Nul. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM. $n=4-5$ animals per grup. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ i ***, $p < 0,001$ vs. MPSIIIA-Nul.

1.4.2. Neuroinflamació al SNC

Un altre paràmetre per avaluar l'eficàcia terapèutica de les diferents dosis analitzades va consistir en l'estudi de la neuroinflamació mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica de seccions del cervell utilitzant un marcador específic per a astròcits, GFAP, i un altre per a la micròglia activada, BSI-B4. D'acord amb la correcció de l'acumulació de GAGs observada al SNC, es va detectar una reducció de la neuroinflamació tant a la dosi de 5×10^{10} vg/ratolí com també a la de $2,32 \times 10^{10}$ vg/ratolí (Figura 21). La disminució de l'astrocitosi amb significança estadística es va observar a tot el còrtex cerebral de les dues dosis més altes testades, $2,32 \times 10^{10}$ i 5×10^{10} vg/ratolí; mentre que només es va detectar una lleugera reducció a les altres regions analitzades: el col·licle superior i el tàlem (Figura 21). Per altra banda, no es va observar cap millora de l'astrocitosi a la dosi de $1,08 \times 10^{10}$ vg/ratolí (Figura 21).

La microgliosi, un altre marcador de neuroinflamació al SNC, es va reduir a totes les regions del còrtex cerebral dels ratolins MPSIIIA tractats amb el vector AAV9-mSgsh a la dosi de 5×10^{10} vg/ratolí (Figura 22). La dosi de $2,32 \times 10^{10}$ vg/ratolí va permetre una reducció estadísticament significativa de la infiltració de la micròglia al còrtex occipital, amb una disminució parcial no estadísticament significativa a la resta de regions analitzades del cervell (Figura 22). Finalment, els ratolins MPSIIIA tractats a la dosi de $1,08 \times 10^{10}$ vg/ratolí només van presentar una reducció parcial amb significança estadística al còrtex occipital (Figura 22).

Tots aquests resultats van suggerir que la dosi de $2,32 \times 10^{10}$ vg/ratolí provada en ratolins MPSIIIA tractats a dos mesos d'edat va presentar un grau de correcció de la neuroinflamació similar a la dosi més alta testada (5×10^{10} vg/ratolí), identificada prèviament com a dosi efectiva.

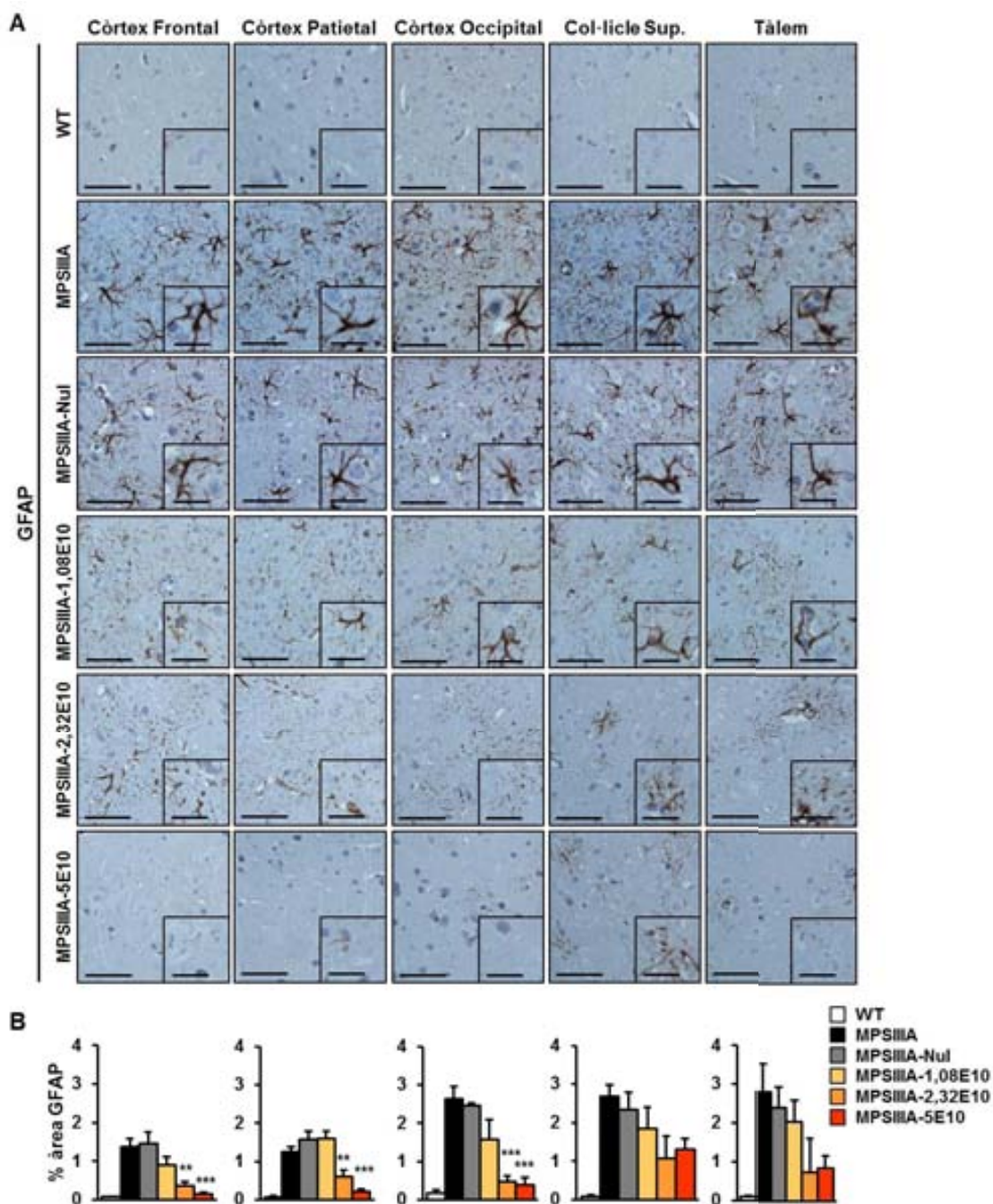


Figura 21. Avaluació de l'astrocitosi després de l'administració intracisternal del vector AAV9 codificant per a la sulfamidasa murina. (A) Anàlisi i immunohistoquímica utilitzant el marcador d'astrocits GFAP en diferents regions del cervell de ratolins WT, MPSIIIA no tractats i MPSIIIA tractats a una dosi de $1,08 \times 10^{10}$, $2,32 \times 10^{10}$ o 5×10^{10} vg/ratolí del vector AAV9-mSgsh o injectats amb el vector AAV9-Nul (5×10^{10} vg/ratolí). Escala: 50 μ m (20 μ m per les ampliacions). **(B)** Els histogrames representen la intensitat de la senyal de GFAP a cada regió del cervell analitzada per cada grup de tractament. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM. n=3-5 animals per grup. **, $p < 0,01$ i ***, $p < 0,001$ vs. MPSIIIA-Nul. Sup., superior.

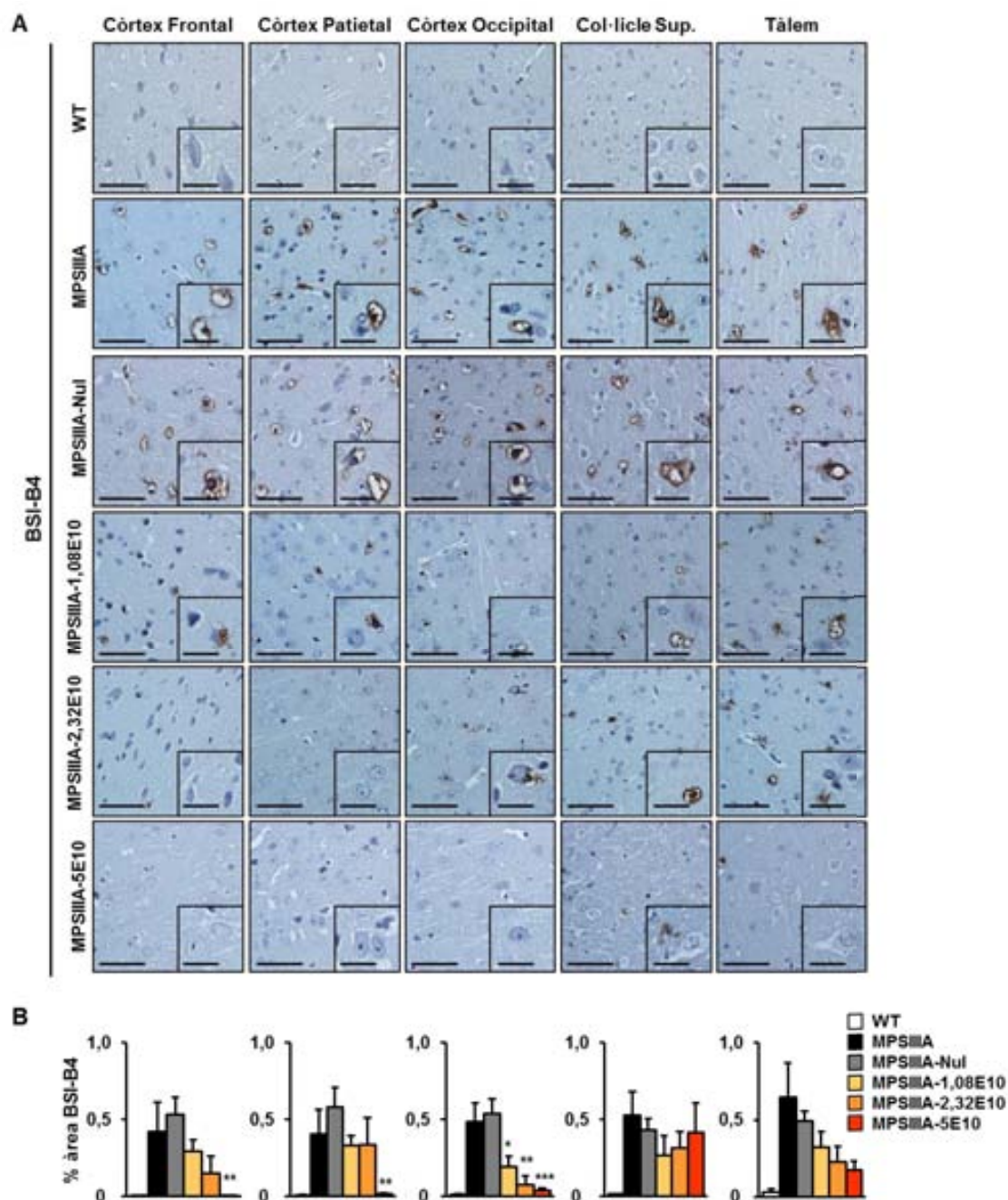


Figura 22. Anàlisi de la microgliosi després de l'administració intra-LCR de l'AAV9-mSgsh. (A) Anàlisi immunohistoquímica utilitzant el marcador de microglia activada BSI-B4 a diferents regions del cervell de mascles WT, MPSIIIA no tractats i MPSIIIA injectats amb l'AAV9-Nul (5×10^{10} vg/ratolí) o tractats a una dosi de $1,08 \times 10^{10}$, $2,32 \times 10^{10}$ o 5×10^{10} vg/ratolí de l'AAV9-mSgsh. Escala: 50 μm (20 μm per les ampliacions). **(B)** Els histogrames representen la intensitat de la senyal de BSI-B4 a cada regió del cervell analitzada per cada grup experimental. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM. $n=4-5$ animals per grup. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ i ***, $p < 0,001$ vs. MPSIIIA-Nul. Sup., superior.

1.4.3. *Acumulació de GAGs als òrgans somàtics*

Posteriorment, es va analitzar el contingut de GAGs dels òrgans somàtics a les dues noves dosis juntament amb la dosi prèviament testada i identificada com a efectiva. Les tres dosis de vector AAV9-mSgsh testades a ratolins MPSIIIA mascles van provocar una completa correcció de l'acumulació de GAGs, amb significança estadística, a teixits perifèrics com el fetge, el cor, la melsa i la bufeta urinària (Figura 23A). Aquest resultat és esperable donat que les dues dosis més baixes testades en aquest estudi eren més altes que la dosi més baixa administrada a l'estudi de dosi-resposta anterior, on també s'havia demostrat reducció de l'acumulació de GAGs a aquests teixits (Figura 12). Ara bé, el pulmó i el ronyó van presentar una disminució del dipòsit de GAGs que va evidenciar un efecte dosi-resposta, a menys dosi menys eficàcia del tractament (Figura 23A). Per altra banda, les femelles MPSIIIA tractades amb diferents dosis del vector viral per mitjà de l'administració intra-LCR van presentar un efecte dosi-resposta a tots els teixits perifèrics analitzats (Figura 23B), molt probablement a causa dels menors nivells d'activitat sulfamidasa circulant de femelles, en comparació amb els mascles, observat en el primer estudi dosi-resposta (Figura 10). Així doncs, aquests resultats van evidenciar que petites diferències de sulfamidasa activa, a vegades no detectables, presentaven una gran repercussió en el contingut de GAGs. La dosi alta va permetre una completa correcció a tots els òrgans somàtics analitzats exceptuant el ronyó en el qual es va observar una reducció parcial, però estadísticament significativa, del contingut de GAGs (Figura 23B). La dosi intermèdia va demostrar una disminució estadísticament significativa de l'acumulació de GAGs a tots els òrgans analitzats, exceptuant el ronyó (Figura 23B). Finalment, la dosi baixa a femelles només va evidenciar la correcció del contingut de GAGs a determinats teixits perifèrics com el fetge, el cor i la melsa (Figura 23B). Tant en mascles com en femelles, no es va observar cap diferència en l'acumulació de GAGs entre els ratolins MPSIIIA no tractats o bé els injectats amb el vector AAV9-Nul i utilitzats com a control de l'experiment. Per tant, l'administració intra-LCR de l'AAV9-mSgsh a les dues dosis més altes testades (5×10^{10} i 2.32×10^{10} vg/ratolí) va permetre una reducció de l'acumulació de GAGs a la majoria del teixits perifèrics.

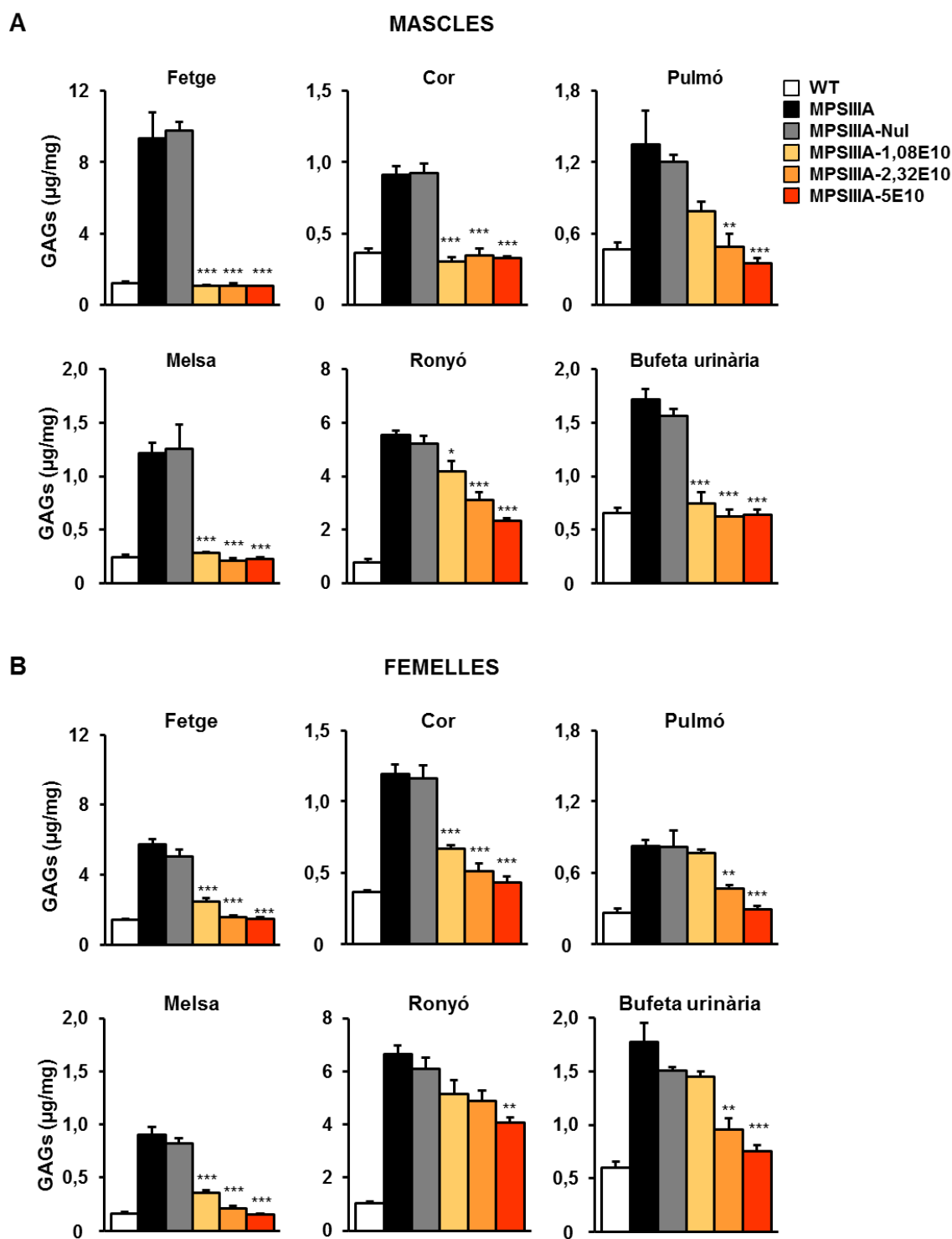


Figura 23. Correcció de l'acumulació de GAGs després de la teràpia gènica directa al LCR. (A, B) Quantificació del contingut de GAGs a fetge, cor, pulmó, melsa, ronyó i bufeta urinària de tots els grups experimentals a ratolins mascles (A) i femelles (B) tractats a diferents dosis ($1,08 \times 10^{10}$, $2,32 \times 10^{10}$ i 5×10^{10} vg/ratolí de l'AAV9-mSgsh) mitjançant l'administració intracisternal. Els animals es van analitzar 4 mesos d'espres del tractament juntament amb WT i MPSIIIA no tractats o injectats amb el vector AAV9-Nul, utilitzat com a control. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM; $n=4-5$ animals per grup. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ i ***, $p < 0,001$ vs. MPSIIIA-Nul.

1.4.4. Correcció funcional després de l'administració intra-LCR de l'AAV9-mSgsh

La correcció funcional després de l'administració intra-LCR de l'AAV9-mSgsh es va avaluar amb el test de l'*Open-Field*. Totes les dades anteriors suggerien que la dosi de $2,32 \times 10^{10}$ vg/ratolí tenia una eficàcia terapèutica similar a la dosi de 5×10^{10} vg/ratolí. Després de realitzar el test de comportament, es va corroborar que els ratolins mascles MPSIIIA tractats amb la dosi intermèdia presentaven una correcció dels dèficits de comportament a uns nivells similars als de la dosi alta de l'AAV9-mSgsh (Figura 24). Els ratolins MPSIIIA no tractats com els injectats amb el vector AAV9-Nul van mostrar una activitat exploratòria reduïda en comparació amb els WT i tractats a la dosi de $2,32 \times 10^{10}$ o 5×10^{10} vg/ratolí a tots els paràmetres analitzats (Figura 24). A la dosi més baixa, només es va observar una correcció amb diferència estadísticament significativa de la distància total recorreguda (Figura 24B), mentre que es va detectar una reducció parcial en el número de línies creuades a l'arena i en el número de *rearings* (Figura 24A i C).

Tots aquests resultats suggereixen que la millora funcional del SNC també es pot aconseguir amb la meitat de la dosi ($2,32 \times 10^{10}$ vg) prèviament identificada com a terapèutica (5×10^{10} vg/ratolí), reduint així el número de partícules virals que caldria administrar als pacients, fet que implicaria una reducció dels possibles riscos associats a la teràpia, i també una disminució dels costos i les dificultats de la producció del vector.

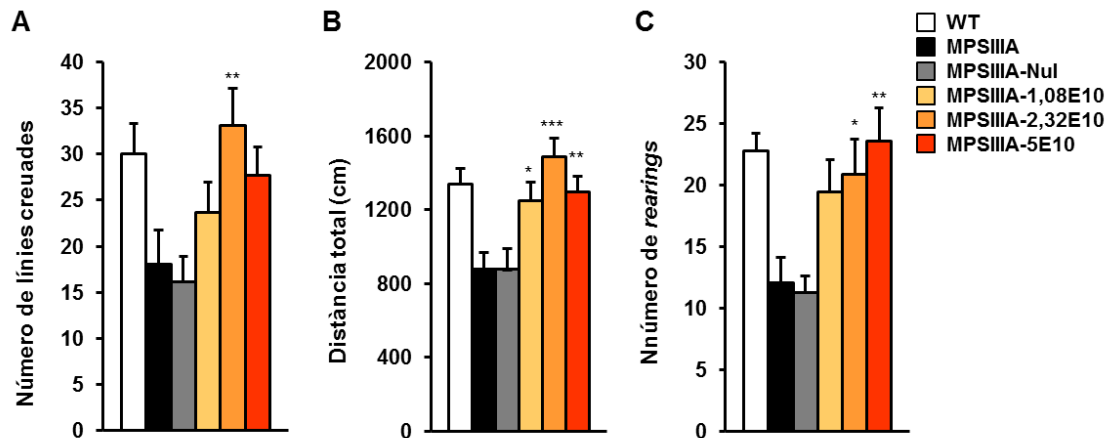


Figura 24. Avaluació dels dèficits de comportament després de l'administració de l'AAV9-mSgsh directa al LCR. (A-C) Ratolins mascles WT, MPSIIIA no tractats i tractats amb l'AAV9-mSgsh a una dosi de $1,08 \times 10^{10}$, $2,32 \times 10^{10}$ o 5×10^{10} vg/ratolí o amb l'AAV9-Nul a 5×10^{10} vg/ratolí es van analitzar en el test de comportament de l'*Open-Field*. Les dades corresponen a l'activitat locomotora i exploratòria enregistrada durant els tres primers minuts i es representa com a la mitjana \pm SEM de 12-18 animals per grup. (A) Número total de línies creuades, (B) Distància total recorreguda, i (C) Número total de rearings. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ i ***, $p < 0,001$ vs. MPSIIIA-Nul.

1.5. Administració intra-LCR de l'AAV9-mSgsh a estadis més avançats de la MPSIIIA

Una única administració intra-LCR del vector AAV9-mSgsh a ratolins MPSIIIA tractats a dos mesos d'edat va demostrar eficàcia terapèutica en els paràmetres bioquímics, histopatològics i funcionals de la malaltia. Així doncs, aquests resultats avalen la possible translació d'aquesta aproximació terapèutica cap un estudi clínic en humans. Els pacients de la MPSIIIA es diagnostiquen al voltant dels 3-5 anys, tot i que els primers símptomes poden aparèixer a partir de l'any d'edat (Delgadillo, 2013; Héron, 2011; Valstar, 2010a; Malm, 2010; Meyer, 2007). La regressió progressiva en les funcions motores i cognitives dels pacients els condueix cap a un estat vegetatiu fins a arribar a la mort cap a mitjans-finals de la segona dècada de vida (Meyer, 2007; Delgadillo, 2013; Malm, 2010; Héron 2011; Valstar 2010a; Cleary, 1993). Actualment, no hi ha cap teràpia aprovada per a la cura de la MPSIIIA. Si l'administració intra-LCR del vector viral AAV9-mSgsh fos la teràpia d'elecció per a tots aquests pacients, cal demostrar que aquest tractament també presenta eficàcia terapèutica en estadis més avançats de la malaltia.

Es van seleccionar ratolins MPSIIIA de 6 mesos d'edat, ja que havien mostrat una gran quantitat de vesícules molt disteses (Figura 4, 7 i 14) on es van acumular GAGs (Figura 3 i 12) que van provocar una marcada neuroinflamació a diferents regions del SNC (Figura 8). A més, aquests ratolins afectats també van presentar la patologia somàtica característica de la MPSIIIA que, conjuntament amb la patologia neurològica, va donar lloc a una activitat exploratòria i locomotora reduïda (Figura 17A). Així doncs, es va decidir tractar ratolins MPSIIIA a 6 mesos d'edat amb el vector viral AAV9 codificant pel gen de la sulfamidasa administrat directament al LCR per via intracisternal (Figura 25). Es va avaluar l'eficàcia terapèutica després de 4 mesos de l'administració de 5×10^{10} vg/ratolí de l'AAV9-mSgsh (Figura 25). Durant el període de tractament, es van monitoritzar els animals mensualment mitjançant la presa de mostra de sang juntament amb ratolins WT i MPSIIIA injectats amb el vector AAV9-Nul. Finalment, també es va avaluar la supervivència de ratolins MPSIIIA després de ser tractats a una fase més tardana de la malaltia (Figura 25).

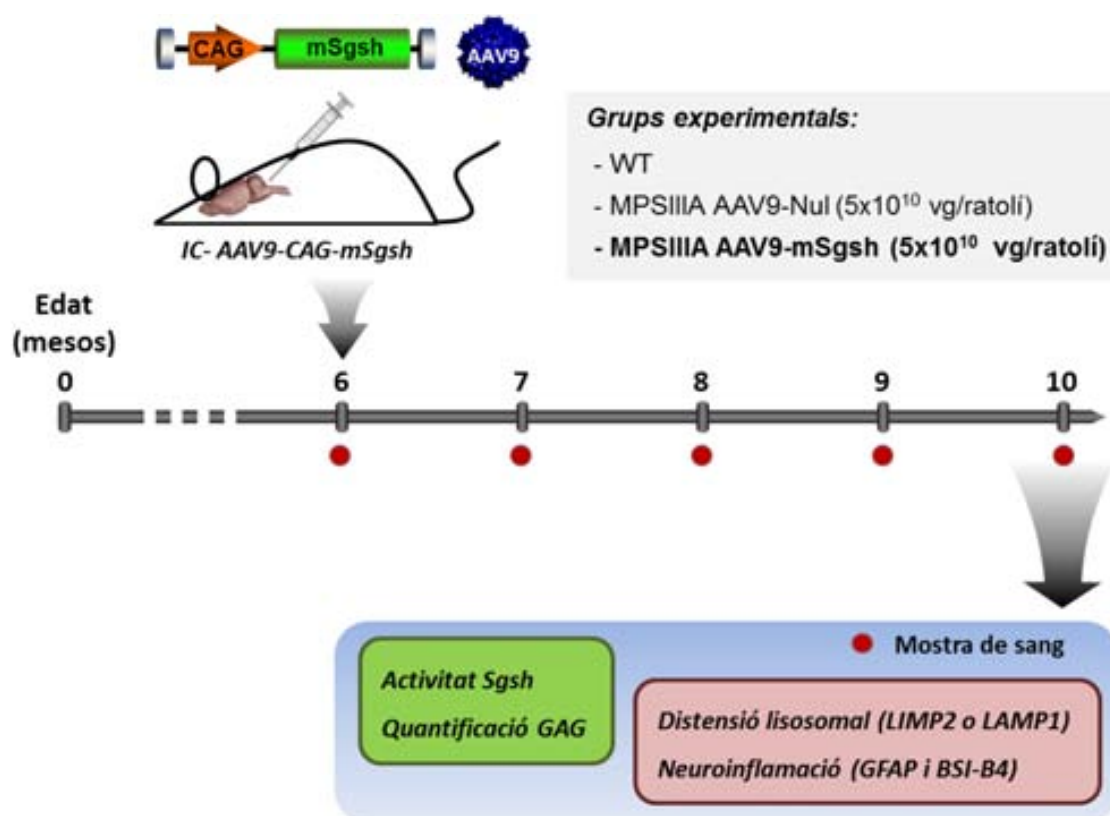


Figura 25. Disseny experimental pel tractament d'estadis més avançats de la MPSIIIA amb una administració intra-PCR de l'AAV9-mSgsh. WT, sans o *wild-type*; IC, intracisternal; LIMP2, proteïna lisosòmica integral de membrana tipus 2 o *Lysosomal Integral-Membrane Protein 2*; LAMP1, proteïna lisosòmica associada a la membrana tipus 1 o *Lysosomal Associated-Membrane Protein*; GFAP, Proteïna àcida fibril·lar glial o *Glial Fibrillar Acidic Protein*; BSI-B4, isolectina B4

1.5.1. Eficàcia terapèutica de l'administració intra-PCR de l'AAV9-mSgsh al SNC a ratolins amb la malaltia avançada

1.5.1.1. Activitat sulfamidasa a cervell

Els ratolins MPSIIIA a un estadi més avançat de la malaltia (6 mesos d'edat) es van tractar amb l'AAV9-mSgsh a la dosi terapèutica de 5×10^{10} vg/ratolí. En mascles, es va detectar un increment de l'activitat sulfamidasa a totes les regions de l cervell analitzades amb una diferència estadísticament significativa a les seccions I, III i V (Figura 26A). En femelles, es va observar uns nivells d'activitat sulfamidasa similar als que s'havien detectat en mascles (Figura 26B). Aquests resultats suggereixen que l'administració intra-PCR de l'AAV9-mSgsh a fases més avançades de la malaltia també

va permetre assolir nivells d'activitat sulfamidasa elevats, amb uns valors similars als observats en ratolins MPSIIIA tractats a una edat més jove (2 mesos d'edat) (Figura 2).

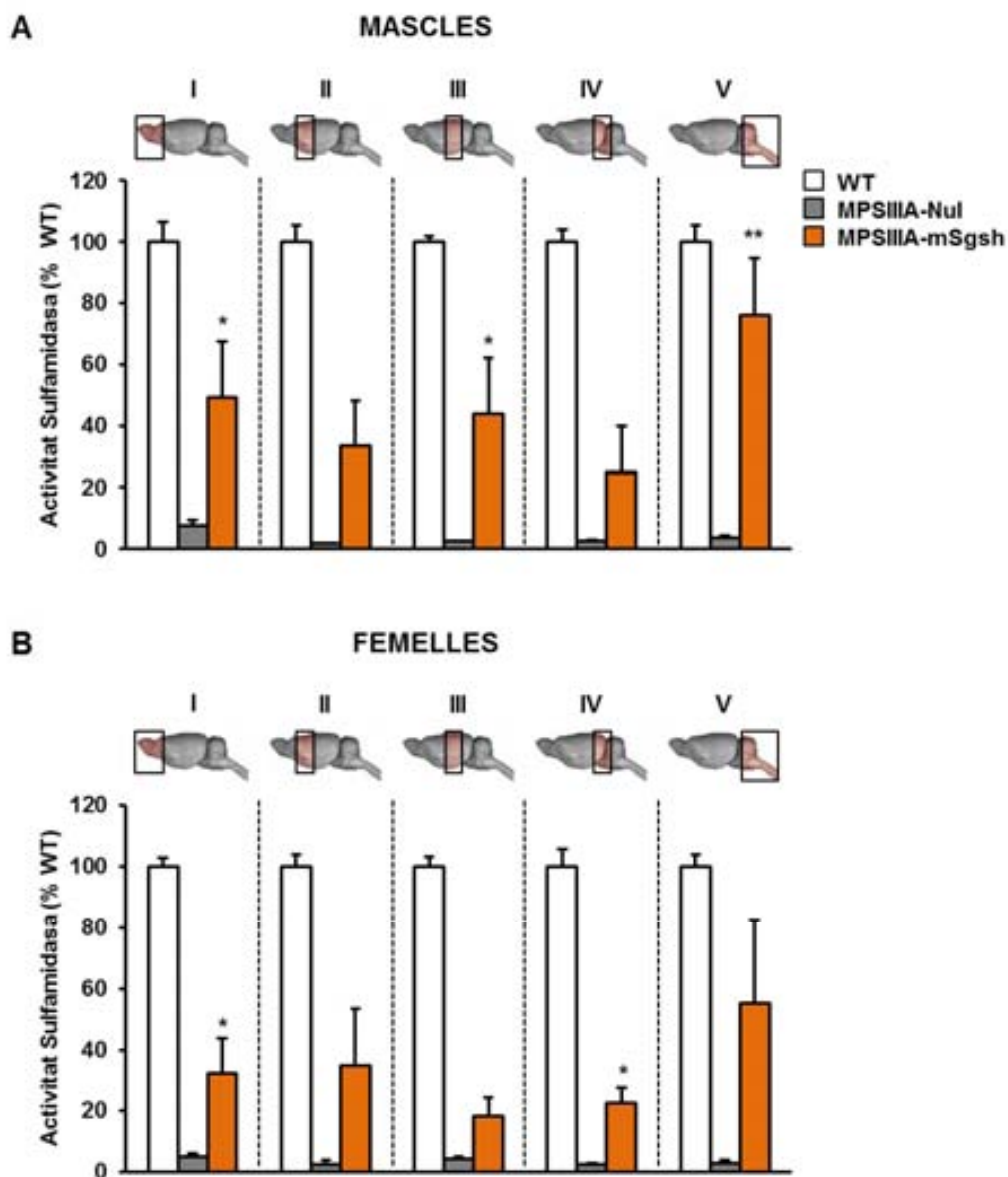


Figura 26. Activitat sulfamidasa al cervell de ratolins tractats amb l'AAV9-mSgsh en una fase més avançada de la malaltia. (A, B) Percentatge d'activitat sulfamidasa a cinc regions del cervell (seccions I-V indicades en les imatges ubicades sobre les gràfiques) de ratolins MPSIIIA mascles (A) i femelles (B) tractats a 6 mesos d'edat amb una dosi de 5×10^{10} vg/ratolí de l'AAV9-mSgsh o amb el vector AAV9-Nul, utilitzat com a control. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM; n=4-5 animals per grup. *, $p < 0,05$ i **, $p < 0,01$ vs. MPSIIIA-Nul.

1.5.1.2. Acumulació de GAGs al cervell

La sulfamidasa activa present al SNC dels ratolins MPSIIIA tractats a 6 mesos d'edat va permetre una àmplia correcció de l'acumulació de GAGs a la majoria de regions del cervell analitzades. Després de 4 mesos de l'administració intra-PCR de 5×10^{10} vg/ratolí de l'AAV9-mSgsh, el contingut de GAGs es va reduir de forma estadísticament significativa a les seccions I-IV dels ratolins mascles MPSIIIA (Figura 27A) i a les seccions I-V de les femelles MPSIIIA (Figura 27B). D'aquesta manera, aquests resultats van suggerir que en ratolins MPSIIIA tractats amb l'AAV9-mSgsh a un estadi més tardà de la malaltia encara es podia normalitzar el contingut de GAGs al SNC.

1.5.1.3. Correcció de la distensió lisosòmica

Els ratolins MPSIIIA de 6 mesos d'edat que havien rebut el vector viral AAV9-mSgsh van presentar una dràstica reducció de la mida del compartiment lisosòmic després de l'anàlisi immunohistoquímica i la posterior quantificació de la intensitat de la senyal de LIMP2 (Figura 28). Així doncs, també es va corregir la mida del compartiment lisosòmic al SNC dels ratolins tractats en una fase més avançada de la malaltia.

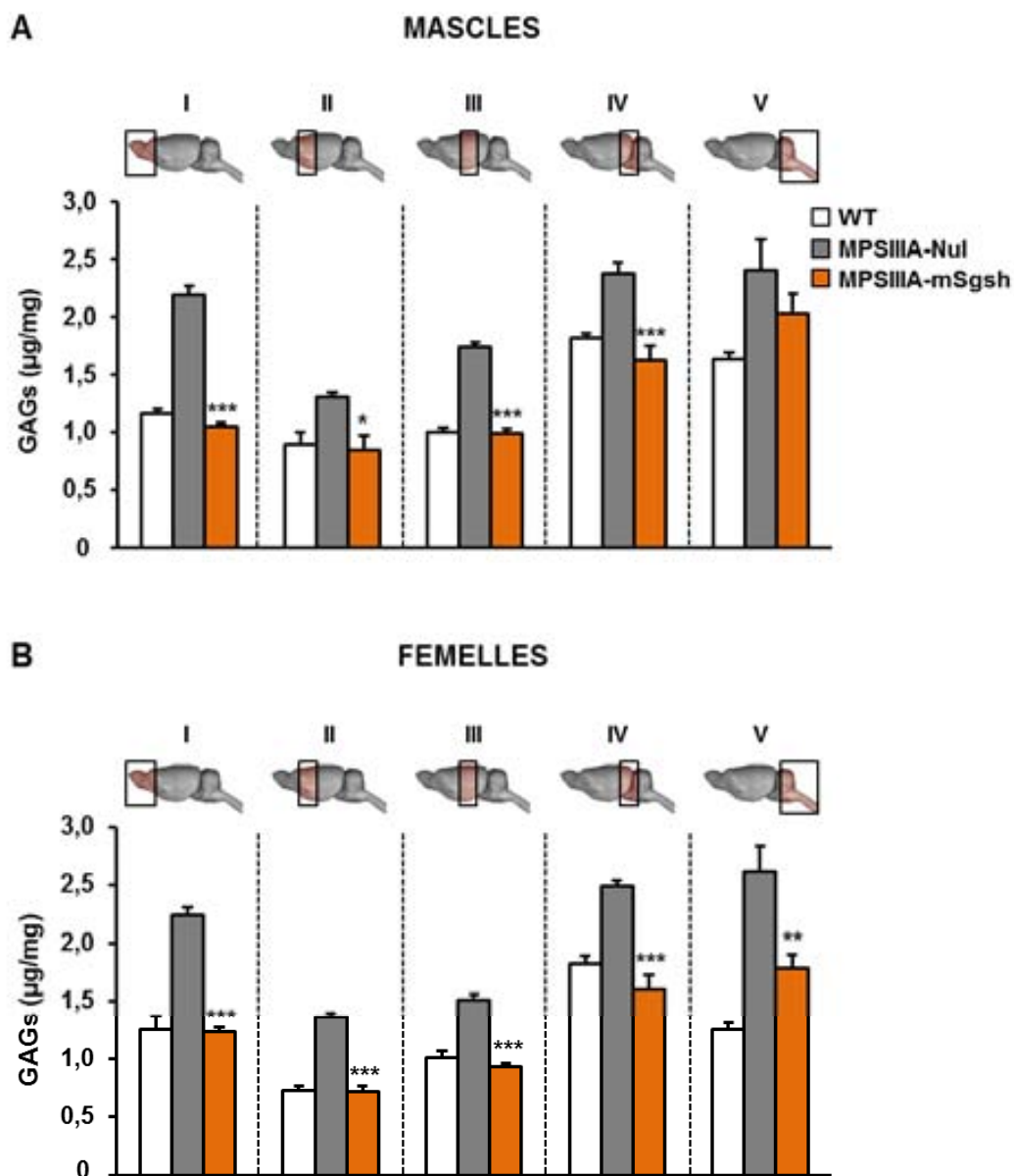


Figura 27. Normalització de l'acumulació de GAGs al cervell després de l'administració intracisternal de l'AAV9-mSgsh als ratolins MPSIIIA de 6 mesos d'edat. (A, B) Contingut de GAGs a cinc regions del cervell (Seccions I-V indicades en les imatges ubicades sobre les gràfiques) de ratolins MPSIIIA mascles (A) i femelles (B) tractats a 6 mesos d'edat amb una dosi de 5×10^{10} vg/ratolí de l'AAV9-mSgsh o el vector AAV9-Nul com a control. Els ratolins es van analitzar a 4 mesos post-tractament juntament amb WT. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM; $n=4-5$ animals per grup. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ i ***, $p < 0,001$ vs. MPSIIIA-Nul.

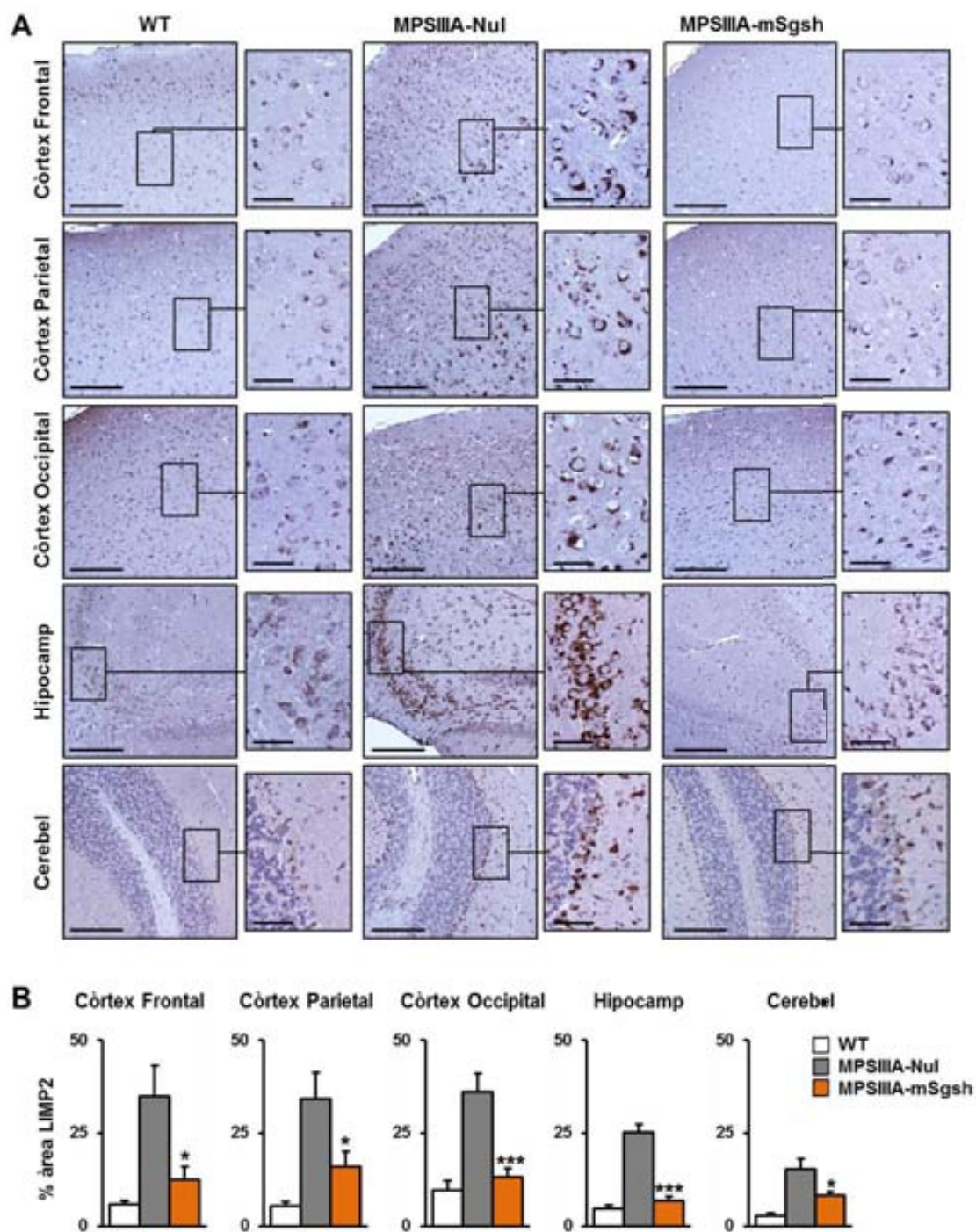


Figura 28. Reducció de la distensió lisosòmica al SNC després de l'administració intra-PCR de l'AAV9-mSgsh. (A) Anàlisi immunohistoquímica utilitzant el marcador LIMP2 a diferents àrees del cervell de ratolins mascles WT i tractats a 6 mesos d'edat amb el vector AAV9-Nul (5×10^{10} vg/ratolí) o l'AAV9-mSgsh (5×10^{10} vg/ratolí). Els animals es van analitzar després de 4 mesos de tractament. Escala: 200 μ m (50 μ m per l'ampliació). **(B)** Els histogrames mostren la quantificació de la senyal de LIMP2 als diferents grups experimentals. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM. n= 5 animals per grup. *, $p < 0,05$ i ***, $p < 0,001$ vs. MPSIII A-Nul.

1.5.1.4. Avaluació de la neuroinflamació

Després de l'observació de l'efecte terapèutic del tractament tant a l'acumulació de GAGs com a la patologia lisosòmica del SNC, també es va avaluar l'estat de la neuroinflamació mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica utilitzant els marcadors per a la detecció d'astròcits (GFAP) i micròglia activada (BSI-B4). Al cap de 4 mesos de tractament, es va observar una reducció estadísticament significativa de l'astrocitosi a totes les regions del SNC analitzades (Figura 29A), i també va evidenciar l'absència total d'infiltració per part de la micròglia als ratolins MPSIIIA tractats (Figura 29B). Per tant, la correcció de la neuroinflamació va tenir lloc, fins i tot en ratolins MPSIIIA tractats amb l'AAV9-mSgsh en una etapa més tardana de la malaltia.

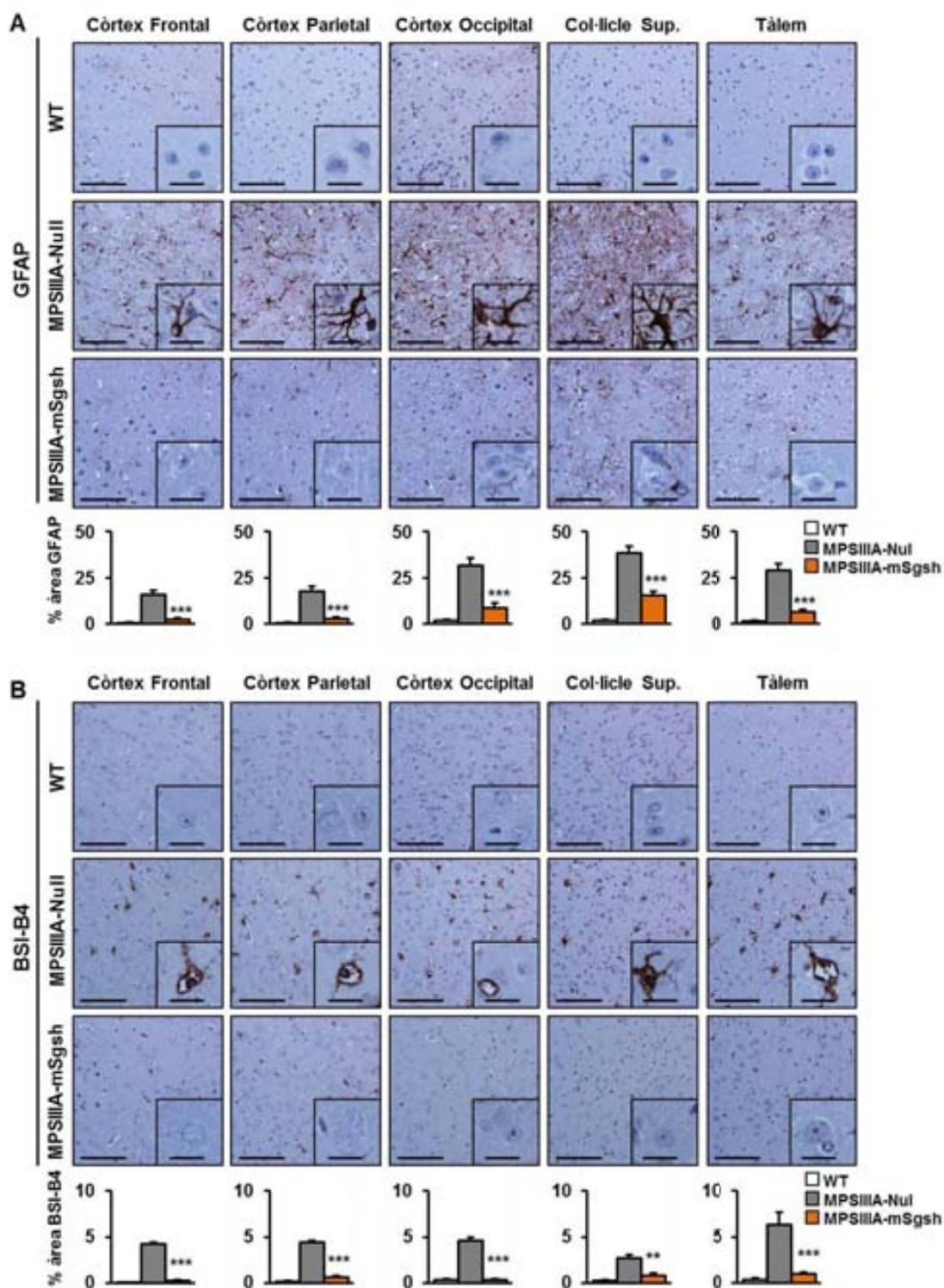


Figura 29. Correcció de la neuroinflamació després de l'administració intracisternal de l'AAV9-mSgsh a ratolins en estadis més avançats de la malaltia. (A, B) Anàlisi immunohistoquímica utilitzant el marcador d'astrocits, GFAP, (A) i el marcador de la microglia activada, BSI-B4, (B) a les seccions del còrtex frontal, parietal i occipital, col·licle superior i tàlem de ratolins mascles MPSIII A tractats a 6 mesos d'edat amb l'AAV9-mSgsh a una dosi de 5×10^{10} vg/ratolí. Els animals es van analitzar a 4 mesos post-tractament (10 mesos d'edat) juntament amb WT i MPSIII A injectats amb el vector AAV9-Nul. Escala: 100 μ m (20 μ m per l'ampliació). Els histogrames representen la intensitat de senyal a cada regió analitzada per cada grup de tractament. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM. n=5 animals per grup. **, $p < 0,01$ i *, $p < 0,001$ vs. MPSIII A-Nul. Sup., superior.**

1.5.2. Efecte als teixits perifèrics de l'administració intra-LCR de l'AAV9-mSgsh de ratolins amb la malaltia més avançada

1.5.2.1. Activitat sulfamidasa a fetge i sèrum

Quatre mesos després de l'administració intra-LCR de l'AAV9-mSgsh a ratolins MPSIIIA tractats a 6 mesos d'edat, es va detectar la presència d'activitat sulfamidasa a fetge i sèrum de mascles i femelles, tal com s'havia detectat prèviament en ratolins MPSIIIA tractats a 2 mesos d'edat (Figura 10 i 11). Als mascles tractats, l'activitat sulfamidasa a fetge va presentar uns nivells propers al 220% de l'activitat WT (Figura 30A), mentre que les femelles només van arribar al 20% de l'activitat WT (Figura 30B). Els valors d'activitat sulfamidasa de fetge dels mascles tractats van correlacionar directament amb l'activitat enzimàtica detectada a sèrum després de 4 mesos de tractament, activitat que es va mantenir a nivells estables durant tot el període de seguiment (Figura 30A). Al sèrum, les femelles MPSIIIA tractades van presentar uns valors d'activitat sulfamidasa propers al 50% del WT a 15 dies post-injecció, a partir d'aquí l'activitat enzimàtica van anar decaient lentament amb el pas del temps fins a arribar al 20% de l'activitat WT detectada a sèrum a punt final (Figura 30B). Els valors d'activitat sulfamidasa de fetge i sèrum van ser similars als que prèviament s'havien observat a 4 mesos post-injecció en ratolins MPSIIIA tractats a 2 mesos d'edat amb l'AAV9-mSgsh. A més, se seguien observant les diferències d'activitat sulfamidasa entre ambdós sexes a causa de la baixa eficiència de transducció del fetge de femelles per part dels vectors AAVs a ratolins (Davidoff, 2003; Ruzo, 2012a; Ruzo, 2012b). Aquestes dades suggerien que en estadis més avançats de la malaltia el fetge també era transduït eficientment i podria actuar com a font d'enzim circulant.

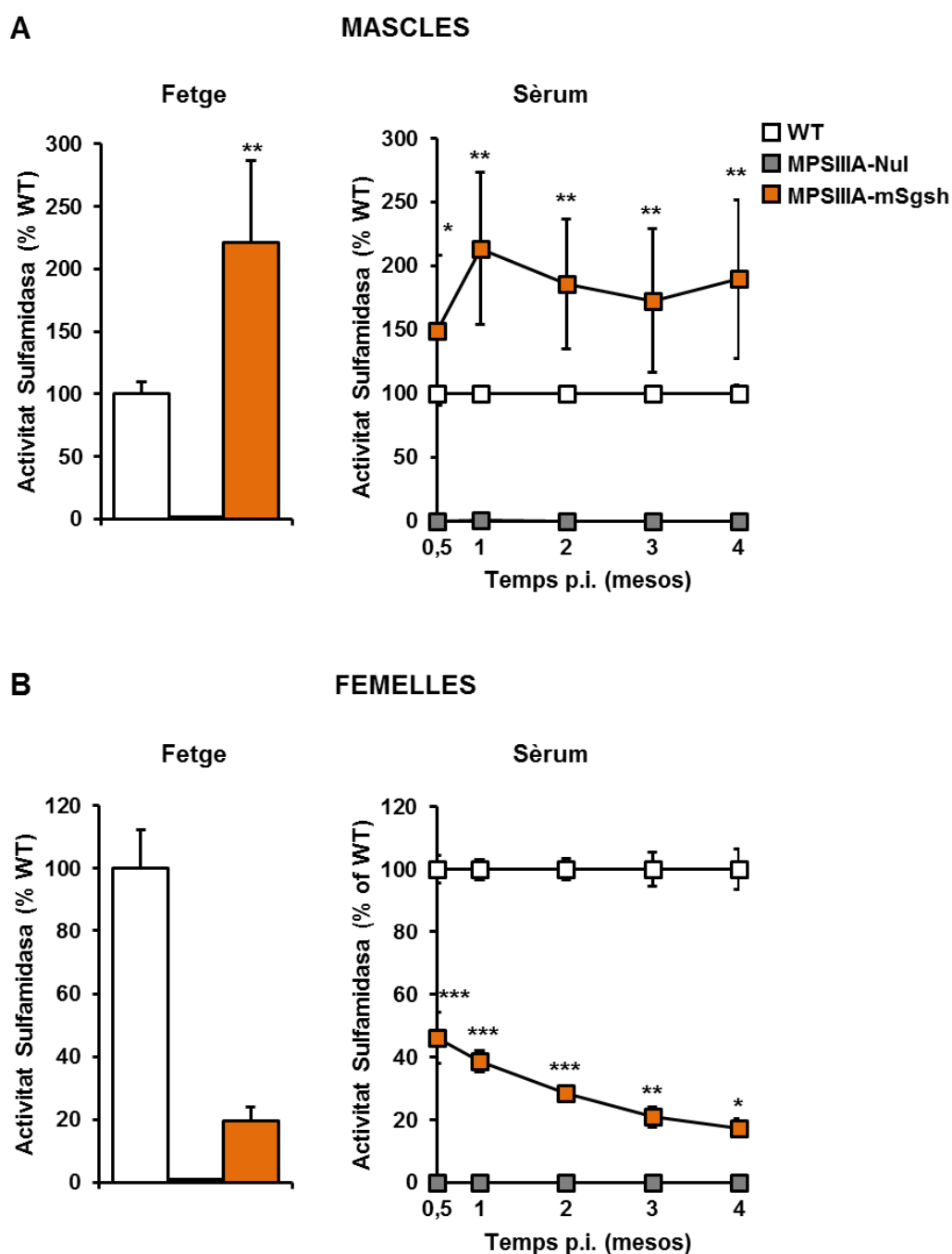


Figura 30. Producció de sulfamidasa al fetge i secreció al sèrum després de l'administració de l'AAV9-mSgsh directament al LCR a ratolins a mb estadis més tardans de la malaltia. **(A, B)** Percentatge de l'activitat sulfamidasa en el fetge i el sèrum de ratolins MPSIII A mascles **(A)** i femelles **(B)** després de 4 mesos de l'administració intra-LCR (10 mesos d'edat) de 5×10^{10} vg/ratolí de l'AAV9-mSgsh. Els animals es van analitzar juntament amb WT i MPSIII A injectats amb el vector AAV9-Nul, utilitzats com a control. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM; $n=4-5$ animals per grup. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ *** i $p < 0,001$ vs. MPSIII A-Nul. p.i., post.injecció.

1.5.2.2. *Acumulació de GAGs a òrgans somàtics*

Després de 4 mesos de l'administració intra-LCR del vector AAV9-mSgsh (als 10 mesos d'edat), es va analitzar la quantificació de GAGs als òrgans somàtics dels ratolins MPSIIIA, els quals es van tractar a una fase més avançada de la malaltia (6 mesos d'edat). Als mascles tractats, es va observar una completa correcció de l'acumulació de GAGs a tots els òrgans somàtics analitzats fins a nivells indistingibles dels WT (Figura 31A). Per altra banda, els ratolins femelles MPSIIIA van mostrar una reducció estadísticament significativa de l'acumulació de GAGs a la majoria de teixits perifèrics, a excepció del ronyó (Figura 31B) que és un òrgan refractari a la millora del contingut de GAGs. Aquesta observació havia estat detectada prèviament a les femelles MPSIIIA tractades a dos mesos d'edat i analitzades a llarg termini (Figura 12 i 13) (Ruzo, 2012; Ruzo, 2012b; Donsante, 2007; Garcia, 2007). Per tant, l'administració intra-LCR de l'AAV9-mSgsh a ratolins MPSIIIA a una fase més avançada de la malaltia va demostrar la correcció de la patologia somàtica a una dosi de 5×10^{10} vg/ratolí després de 4 mesos de tractament.

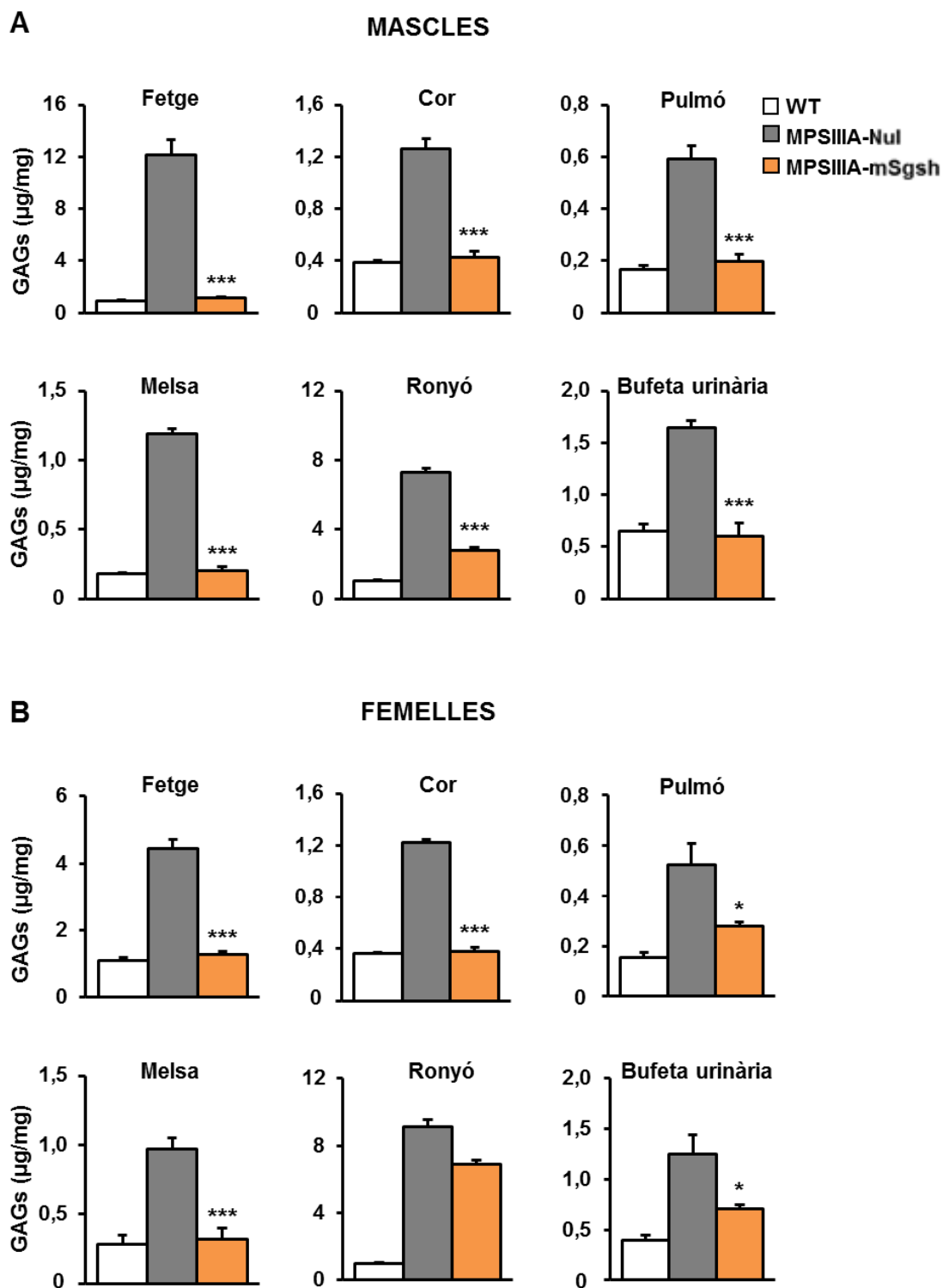


Figura 31. Correcció de l'acumulació de GAGs a teixits perifèrics de sprés de la teràpia gènica directa al LCR a ratolins MPSIIIA de 6 mesos d'edat. (A-B) Contingut de GAGs a fetge, cor, pulmó, melsa, ronyó i bufeta urinària de ratolins MPSIIIA mascles (A) i femelles (B) tractats a 6 mesos d'edat amb l'AAV9-mSgsh. Els animals es van analitzar després de 4 mesos post-tractament juntament amb WT i MPSIIIA injectats amb l'AAV9-Nul. Els resultats es mostren com a mitjana \pm SEM; n=4-5 animals per grup. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ i *, $p < 0,001$ vs. MPSIIIA-Nul.**

1.5.2.3. Distensió lisosòmica a teixits perifèrics

L'anàlisi immunohistoquímica c ontra LAMP1 va mostrar una disminució de la mida del compartiment lisosòmic als òrgans somàtics analitzats de mascles i femelles MPSIIIA tractats a 6 mesos d'edat amb l'AAV9-mSgsh a una dosi de 5×10^{10} vg/ratolí (Figura 32). Així doncs, el tractament de ratolins MPSIIIA en fases més avançades de la malaltia també va permetre la reducció de la distensió lisosòmica.

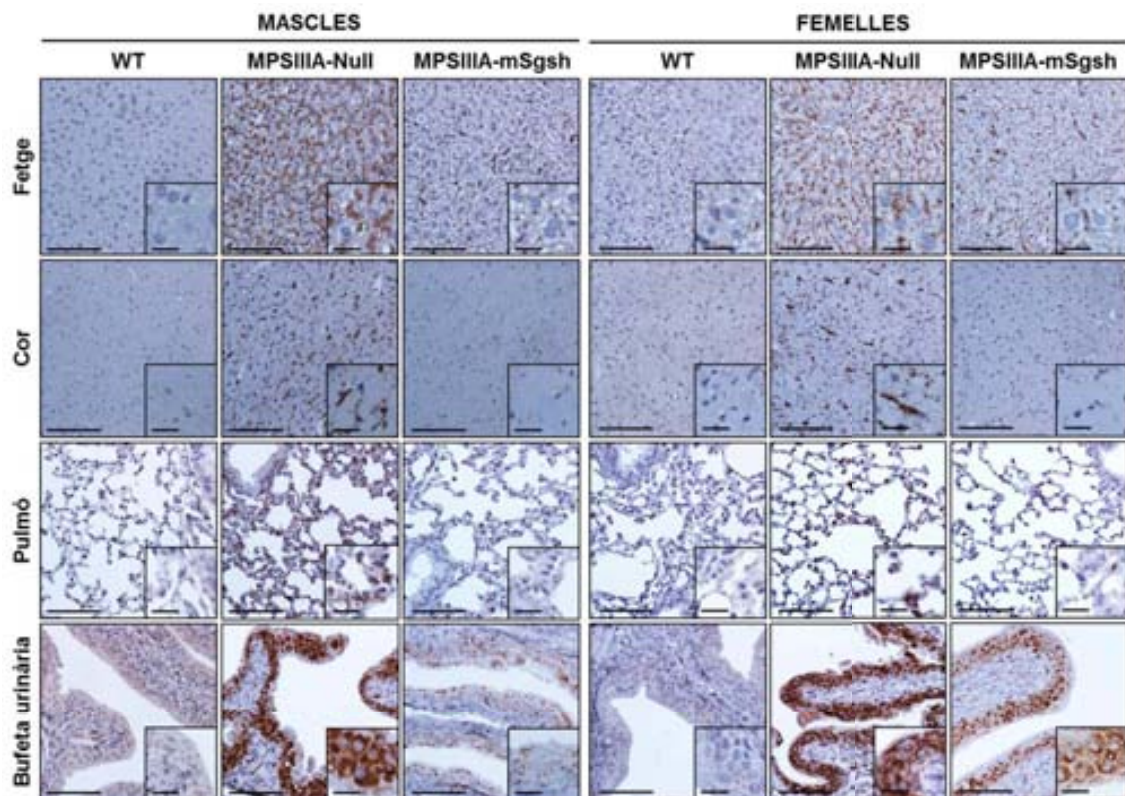


Figura 32. Reducció de la mida del compartiment lisosòmic després de la teràpia gènica intra-LCR. Anàlisi immunohistoquímica utilitzant el marcador de lisosomes LAMP1 al fetge, cor, pulmó i bufeta urinària de ratolins sans (WT), afectats (MPSIIIA injectats amb l'AAV9-Null) i tractats (5×10^{10} vg de l'AAV9-mSgsh) a 6 mesos d'edat. Escala: 100 μ m (20 μ m per les ampliacions).

2. TRANSLACIÓ DEL TRACTAMENT PER A LA MPSIIIA A GOSSOS BEAGLE ADULTS

Les dades obtingudes de l'administració intra-LCR del vector AAV9-mSgsh en els ratolins MPSIIIA van demostrar eficàcia terapèutica del tractament en aquest model animal. Per tant, per tal d'avançar cap a la translació clínica d'aquest estudi era necessari la recerca preclínica en models animals grans per tal de validar els resultats anteriors. Per avaluar la viabilitat de la teràpia en un model animal amb una mida de cervell clínicament rellevant, es van utilitzar els gossos Beagle adults sans als quals es va administrar una dosi de 2×10^{13} vg/animal del vector viral AAV9. Aquesta dosi es va escalar a partir de la dosi identificada com a primera dosi terapèutica en ratolins MPSIIIA (5×10^{10} vg per animal) respecte al pes corporal dels ratolins en comparació amb el dels gossos. A partir d'aquí, es va realitzar un seguit d'estudis com l'anàlisi de la biodistribució del vector viral, la quantificació dels nivells de sulfamidasa al LCR i la determinació de la ruta d'administració òptima al LCR per tal de demostrar la possible translació d'aquesta aproximació cap a un futur assaig clínic en humans.

2.1. Estudi de la biodistribució del vector viral AAV9 després de l'administració intra-LCR a gossos

El vector viral AAV9 amb el gen marcador de la GFP es va administrar a la cisterna magna dels gossos Beagle adults per tal de validar el patró de biodistribució prèviament observat en ratolins (Tesi doctoral A. Ruzo, 2010). A més, també es va avaluar l'efecte de la velocitat d'infusió del vector viral AAV9 injectat directament al LCR en la biodistribució del vector, sabent que la producció de LCR en gossos en condicions fisiològiques és de 0,047 μ l/min. Per tant, a dos gossos es va administrar un volum total d'un mil·lilitre de vector viral durant un període de 10 minuts per mitjà d'una bomba d'infusió (lent, Gossos 1 i 2). La velocitat d'infusió durant l'administració va ser de 0,1 μ l/min, el doble de la velocitat de producció de LCR, per tal d'arribar a un compromís entre el temps d'administració i els nivells de producció de LCR en condicions fisiològiques. Mentre que l'altre grup experimental es va administrar el vector amb un bolus d'1 ml en menys de 15 segons (ràpid, Gossos 3 i 4) (Figura 33). Els gossos es van sacrificar després de 8 dies post-administració per tal d'evitar la resposta immunitària

contra la proteïna forana GFP. Ambdós procediments es van tolerar correctament i no es va detectar cap alteració als paràmetres bioquímics i hematològics analitzats durant els 8 dies de seguiment. A més, el recompte de leucòcits i la quantificació del contingut de proteïna total al LCR es va mantenir dins dels valors de referència a tots els animals injectats (Taula 1).

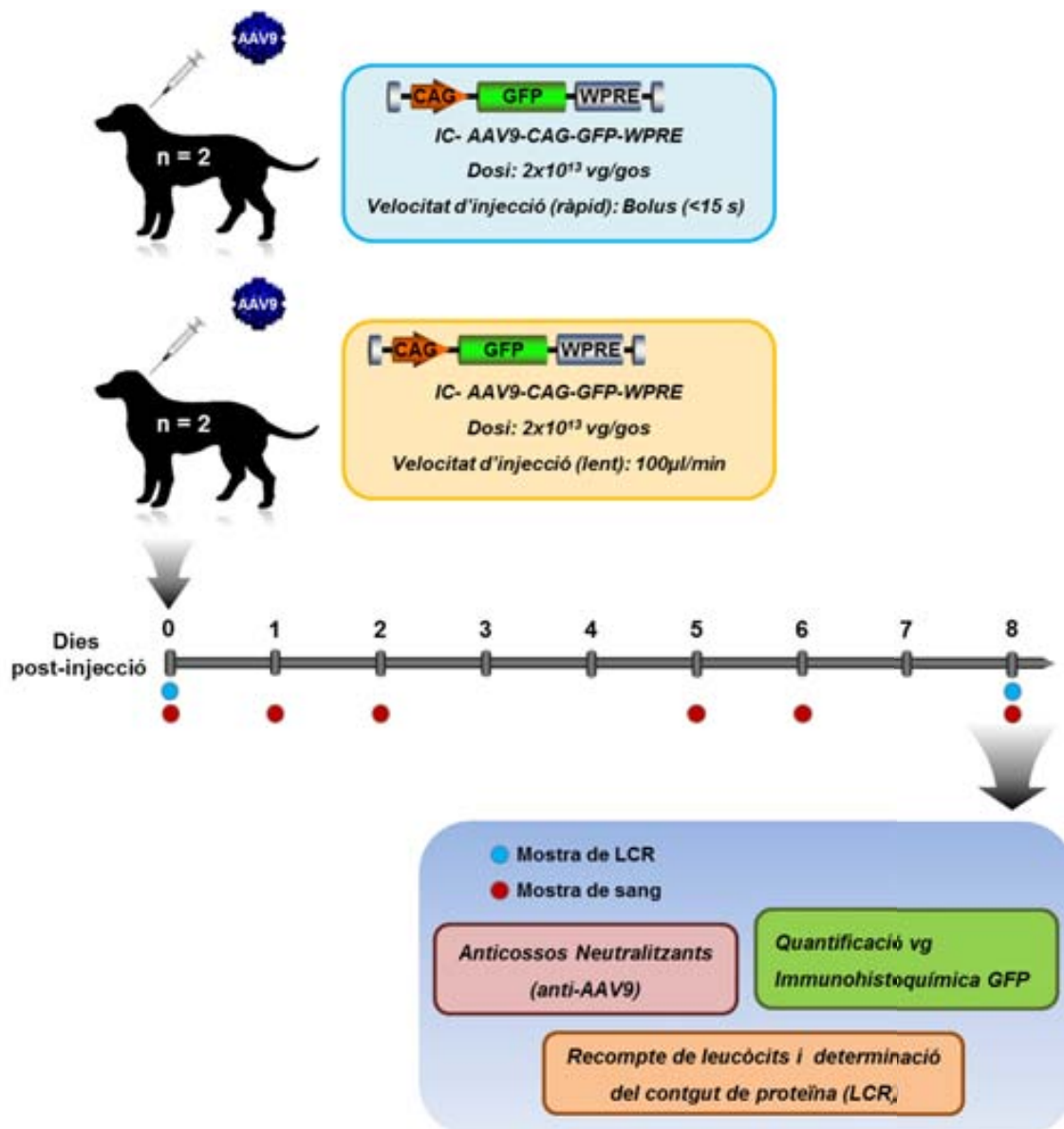


Figura 3.3. Disseny experimental de l'estudi de biodistribució del vector viral AAV9 després de l'administració intra-LCR a gossos Beagle adults. IC, intracisternal. WPRE, element regulador post-transcripcional del virus de l'hepatitis de marmota o *Woodchuck Posttranscriptional Regulator Element*, augmenta l'estabilitat del mRNA incrementant l'expressió del gen transferit.

Taula 1. Recompte de leucòcits i eritròcits i quantificació del contingut de proteïna total al LCR després de l'administració intracisternal del vector AAV9 en gossos.

ID Gos	Velocitat d'injecció	Paràmetre	Dies post-injecció	
			0	8
1	Lent	RBC	NA	0
		WBC	NA	0
		TP	NA	23,3
2	Lent	RBC	0	0
		WBC	0	0
		TP	18	18
3	Ràpid	RBC	4*	0
		WBC	3200*	0
		TP	31,6*	23,4
4	Ràpid	RBC	0	0
		WBC	0	0
		TP	20,2	17,9

Els valors de referència dels paràmetres analitzats al LCR són: recompte d'eritròcits (o *Red Blood Cell Count*, RBC) = 0, recompte de leucòcits (o *White Blood Cell Count*, WBC) < 5 cells/ μ l i Proteïna Total (o *Total Protein*, TP) < 25 mg/dl. NA: mostra no disponible; ID: Identificació. *, mostra contaminada amb sang.

2.1.1. Determinació del número de còpies de genomes virals

Després de l'administració intra-LCR, el vector viral AAV9 es va detectar a totes les regions del SNC analitzades, fins i tot a aquelles més distals al punt d'injecció com, per exemple, el còrtex cerebral (Taula 2). Tal com s'havia observat prèviament en ratolins, l'administració directa al LCR també va resultar en la detecció de genomes virals a fetge, com també a d'altres teixits perifèrics tot i que amb un número de còpies molt més baix (Taula 2). El gangli limfàtic cervical va presentar un alt número de còpies de genomes virals pel fet de ser un gangli proper al SNC on pot drenar el LCR (Taula 2). A més, també es va detectar un alt número de còpies de genomes virals a la melsa, probablement per ser un òrgan on es filtra la sang perifèrica (Taula 2). Finalment, cal remarcar que no es va observar cap diferència en el patró de biodistribució de l'AAV9 en ambdues velocitats d'infusió analitzades (Taula 2).

Taula 2. Distribució del vector viral AAV9 després de l'administració intra-LCR a gossos.

		Genomes Virals / genomes diploides			
		Lent		Ràpid	
		Gos 1	Gos 2	Gos 3	Gos 4
SNC	Rinencèfal	1,82-3,4	1,62-5,86	15,36	1,72-4,2
	Còrtex Frontal Dorsal	5,85-6,58	2,34-3,34	2,20-3,05	5,4-6,2
	Còrtex Frontal Medial	3,82	1,67	1,49	1,24
	Còrtex Parietal Dorsal	1,07	0,03	1,68	1,93
	Còrtex Parietal Lateral	3,07	6,93	0,6	6,2
	Còrtex Temporal	2,14	2,6	0,43	3,26
	Lòbul piriforme	16,43	3,98	3,98	11
	Hipocamp	0,82	1,49	3,75	0,86
	Pons	3,25	0,31	0,1	3,37
	Cerebel	0,27-0,4	0,32-0,78	2-3,6	0,18-0,38
	Medul·la Oblonga	0,3-1,17	1,22	NA	2,42-7,12
	C3-C6	NA	0,34-0,51	10,39	7,22
Òrgans somàtics	Fetge	4,72-6,61	1,75-1,52	4,13-7,77	2,73-1,54
	Cor	0,09	0,05	0,24	0,01
	Pulmó	0,22	0,12	0,48	0,04
	Melsa	4,12	1,68	17,73	3,24
	Pàncreas	0	0	0,01	0
	Intestí	0,07	0,01	0,03	0,02
	Ronyó	0,22	0,49	0,25	0,26
	Múscul esquelètic	0,23	0,13	0,25	0,04
	Gònades	0,03	0,01	0,12	0,02
	Nòdul Limfàtic Cervical	2,9	1,82	3,69	0,01
	Nòdul Limfàtic Popliti	NA	NA	0,42	0,56

Número de còpies de genomes virals/genoma diploide a diferents regions del SNC com també a diversos teixits perifèrics dels gossos que han rebut una infusió lenta (Gossos 1 i 2) o ràpida (Gossos 3 i 4) de 2×10^{13} vg del vector AAV9 a la cisterna magna. Pels teixits dels quals hi havia dues mostres disponibles, s'ha donat ambdós valors obtinguts. *NA*: Mostra no disponible.

2.1.2. Expressió del transgèn

D'acord amb la distribució de genomes virals, l'anàlisi immunohistoquímica contra GFP a diferents seccions del cervell també va demostrar una àmplia biodistribució de l'AAV9 al SNC (Figura 34A). L'expressió del transgèn es va detectar tant a regions properes a la cisterna magna, com el pont o la medulla oblonga; com també a àrees distants al punt d'injecció, per exemple el còrtex (Figura 34A). Les àrees més properes a la superfície cerebral, que estan més en contacte amb el LCR, van presentar un nombre més elevat de cèl·lules GFP positives, tot evidenciant un patró de distribució horitzontal difús des de les leptomeninges cap a les regions més profundes (Figura 34A). Aquesta distribució del vector va mostrar que el LCR n'havia realitzat la difusió dels vectors des de la superfície fins a les àrees més internes. Al còrtex cerebral, es va observar un patró multifocal de cèl·lules GFP positives que ocupaven bona part de la matèria gris arribant a les làmines més profundes (veure còrtex frontal i occipital de la Figura 34A) i, fins i tot, es van detectar els seus axons positius a la matèria blanca adjacent. Per altra banda, no es va detectar cap diferència en la transducció del SNC per part del vector viral AAV9 en funció de la velocitat d'infusió (Figura 34B). Tal com s'havia observat en ratolins, l'administració de l'AAV9 a la cisterna magna va resultar en la transducció d'aproximadament d'un 3-5% d'hepatòcits, quantificant el número d'hepatòcits positius per a la GFP d'una imatge del fetge pel nombre total d'hepatòcits per imatge (Figura 34C). Per tant, l'administració del vector AAV9 directa al LCR de gossos Beagle adults va revelar una àmplia transducció del SNC, mentre que una part del vector va drenar cap a sang perifèrica transduint eficientment el fetge.

La majoria de les cèl·lules transduïdes del SNC presentaven la típica morfologia neuronal (fletxes negres, Figura 34A). Així que es va realitzar un estudi de colocalització mitjançant la immunotinció doble del gen marcador GFP i els marcadors específics de cèl·lules del SNC com les neurones (NeuN), astròcits (GFAP) i micròglia (IBA1). L'anàlisi de diverses regions del cervell va demostrar que la majoria de cèl·lules transduïdes eren neurones, tot i que també es va detectar alguns astròcits de forma més aïllada (Figura 35). No es va detectar l'expressió del transgèn a cap cèl·lula de la micròglia de les àrees del SNC analitzades (Figura 35).

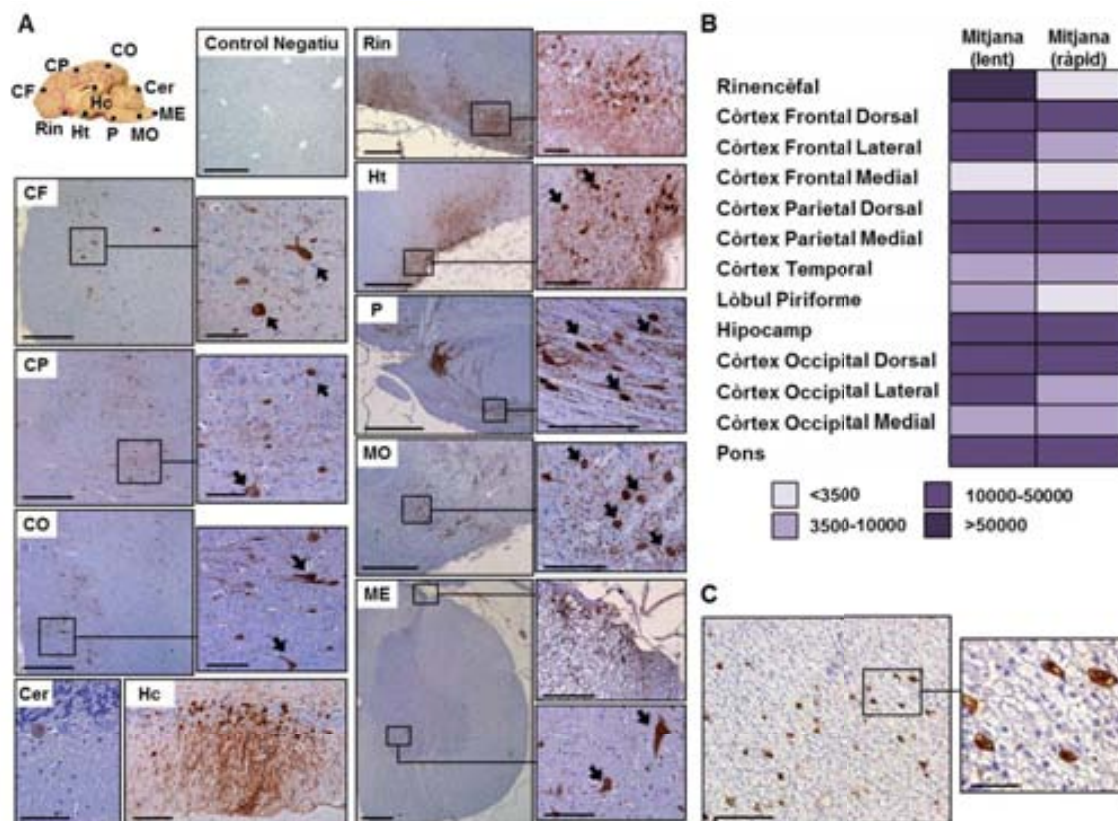


Figura 34. Transducció del SNC i el fetge després de l'administració intra-LCR del vector AAV9 a gossos. (A-C) Els gossos Beagle adults sans (Gosso 1-4) van rebre una dosi total de 2×10^{13} vg del vector AAV9 co-dificant pel gen marcador GFP i es van analitzar 8 dies post-administració. (A) Anàlisi de l'expressió del transgèn mitjançant la immunohistoquímica de GFP al SNC del gos 1. Les seccions corresponen a diverses regions del SNC (indicades al diagrama): CF, Còrtex Frontal; CP, Còrtex Parietal; CO, Còrtex Occipital; Cer, Cerebel; Hc, Hipocamp; Rin, Rinencèfal; Ht, Hipotàlem; P, Pons; MO, Medulla oblonga; ME, Medulla Espinal. Les fletxes negres indiquen les cèl·lules amb morfologia neuronal. Escala: 500 μ m pel CF, CP, CO, Rin, Ht, P, MO, ME (100 μ m per les ampliacions) i 100 μ m pel Cer i Hc. (B) Comparació de l'efecte de la velocitat d'infusió en la distribució del vector administrat utilitzant una bomba d'infusió durant un període de 10 minuts (Gossos 1 i 2, lent) o en un bolus de <15 s (Gossos 3 i 4, ràpid). La transducció de les diferents àrees del SNC es va comparar mitjançant la quantificació de la intensitat de senyal de GFP en 2 imatges/àrea/gos en diverses regions del cervell. (C) Transducció del fetge després de la transferència directa al LCR del vector AAV9. Escala: 500 μ m pel fetge (100 μ m per l'ampliació).

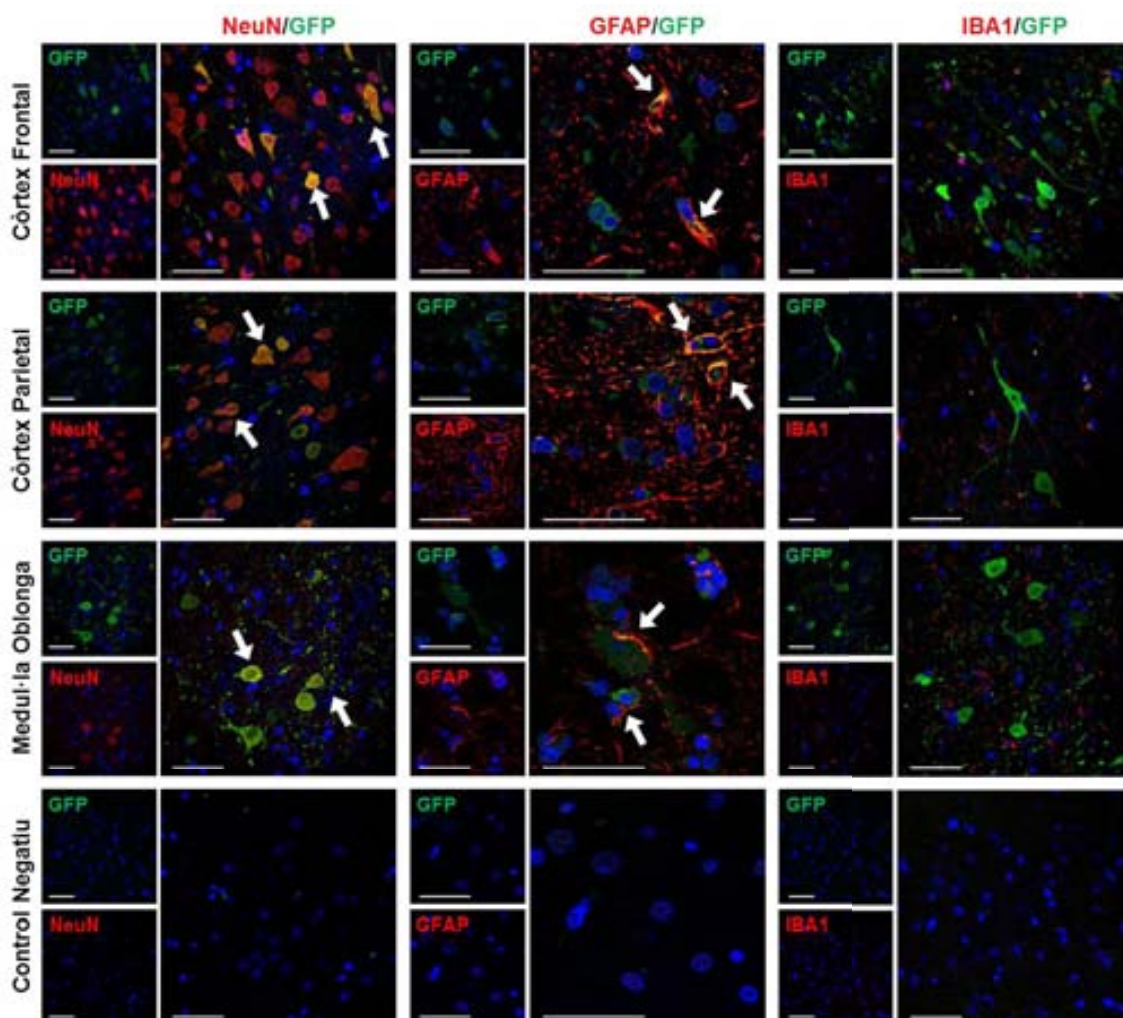


Figura 35. Transducció eficient de les neurones després de l'administració intra-LCR de l'AAV9 a gossos Beagle. Estudi de colocalització amb el microscopi confocal a les diferents regions del cervell de gossos Beagle adults que havien rebut una administració intracisternal de 2×10^{13} vg totals de l'AAV9 codificant per la GFP. Immunotincions dobles de diferents seccions del cervell pel marcador de GFP (verd) i el marcador específic (vermell) de neurones (NeuN, panells de l'esquerra), a stròcits (GFAP, panells centrals) o micròglia (IBA1, panells de la dreta). Els nuclis es van teñir amb TO-PRO-3®. Les fletxes blanques indiquen les cèl·lules doble positives. Escala: 50 µm.

2.2. Transferència del gen de la sulfamidasa al SNC de gossos Beagle mitjançant l'administració del vector AAV9

Després de l'administració intra-LCR de l'AAV9, es va detectar una àmplia biodistribució del vector a diverses regions de tot el SNC, i també la transducció del fetge i d'altres teixits somàtics després del drenatge del vector des del LCR cap al torrent circulatori perifèric. Amb aquests resultats previs, es va decidir examinar si el tractament d'un gos Beagle adult amb una única administració intracisternal de l'AAV9 codificant pel gen de la sulfamidasa permet actuar al LCR com a font endògena i continuada de l'enzim deficient necessari. Una de les opcions terapèutiques per a la MPSIIIA, actualment en fase d'investigació clínica, consisteix en l'administració directa de la sulfamidasa recombinant al LCR. (NCT01155778, NCT01299727 i NCT02060526, clinicaltrials.gov, Crawley 2011). Aquesta teràpia es basa en el subministrament de la sulfamidasa al LCR per tal de corregir, principalment, l'afectació neurològica de la MPSIIIA, que prèviament ja havia demostrat eficàcia terapèutica en gossos afectats per la malaltia (Hemsley, 2009b; Crawley, 2011). Per aquest estudi, es va decidir avaluar l'activitat sulfamidasa present al LCR després la transferència del vector AAV9 codificant pel gen de la sulfamidasa humana directament al LCR dels gossos Beagle; i més endavant, es va dur a terme el mateix estudi amb el gen específic d'espècie, la sulfamidasa canina.

2.2.1. Transferència del gen de la sulfamidasa humana

El vector AAV9 que codifica per a la sulfamidasa humana (hSgsh) es va administrar a la cisterna magna de gossos Beagle adults sans a una dosi de 2×10^{13} vg totals (Gossos 5 i 6, Figura 36A). Durant els tres mesos post-injecció, es va realitzar el seguiment dels gossos mitjançant la presa de mostra de sang i LCR periòdicament (Figura 36A). Finalment, els animals es van sacrificar per tal d'analitzar l'activitat sulfamidasa al LCR com també l'expressió del gen terapèutic al SNC, sistema nerviós perifèric (SNP) i teixits perifèrics. Durant tot el procediment els gossos van estar clínicament bé.

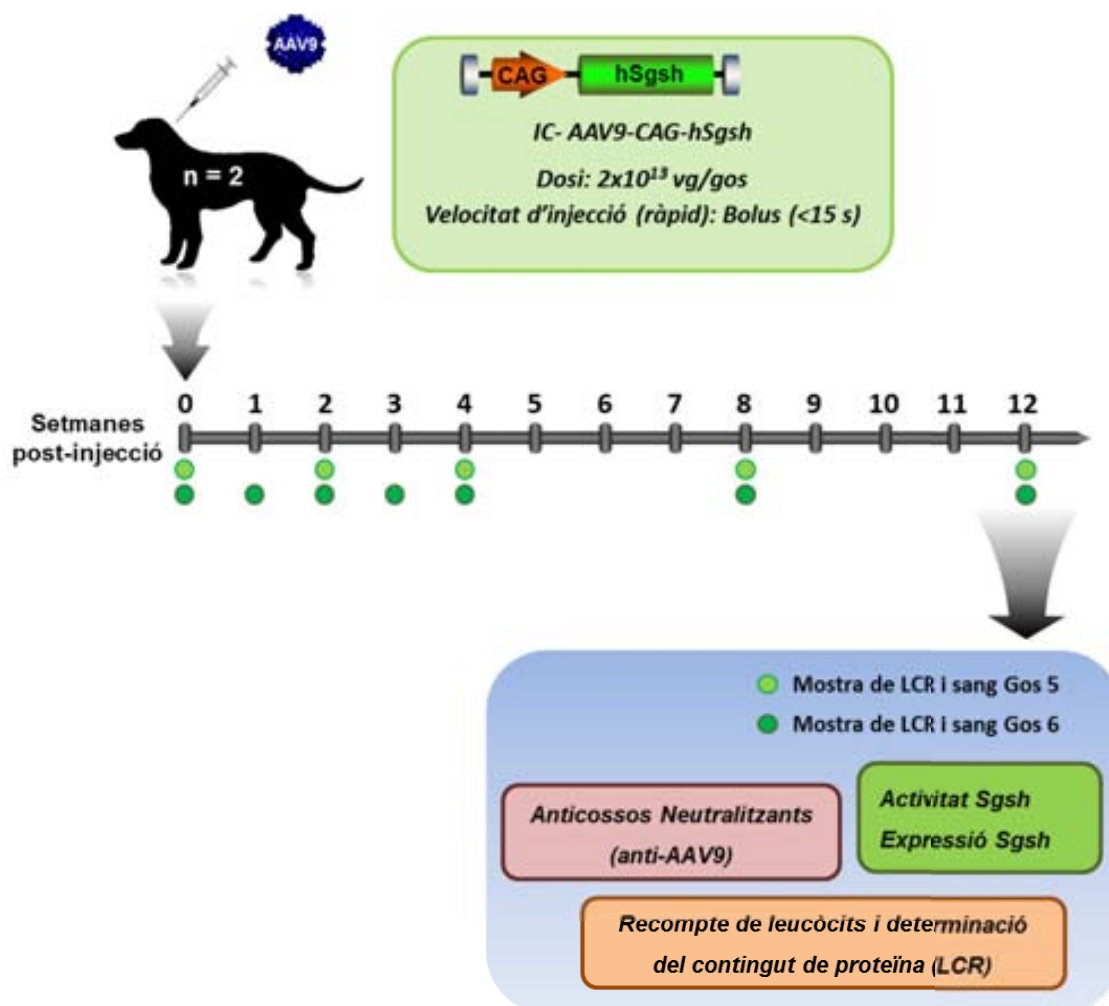


Figura 36. Disseny experimental de l'administració intra-LCR de l'AAV9 codificant per a la Sgsh humana en gossos Beagle sans a una dosi de 2×10^{13} vg totals. IC, intracisternal.

2.2.1.1. Activitat sulfamidasa al LCR

Després de l'administració intracisternal, es va mesurar l'activitat sulfamidasa al LCR de gossos Beagle adults sans injectats amb l'AAV9-hSgsh. Al cap d'una setmana de la injecció, els nivells d'activitat sulfamidasa van augmentar per sobre els nivells basals i van arribar al pic d'expressió al voltant de les 2-3 setmanes post-injecció (Figura 37A). Després de l'increment d'activitat sulfamidasa al LCR en ambdós animals, es va observar una pronunciada davallada a les 3-4 setmanes post-administració fins a arribar a uns nivells estables propers als valors basals (Figura 37A). El pic d'activitat sulfamidasa observat després de la transferència del vector AAV9-hSgsh va coincidir amb la detecció de cèl·lules mononuclears, predominantment limfocítiques, al LCR (Figura 37A i B), un fenomen prèviament documentat en gossos

quan s'utilitza un transgèn no específic d'espècie (Ellinwood, 2011). El número de cèl·lules inflamatòries va baixar progressivament, juntament amb la pèrdua de l'activitat sulfamidasa (Figura 37B). Tot i la reacció inflamatòria, els gossos no van presentar cap símptoma clínic.

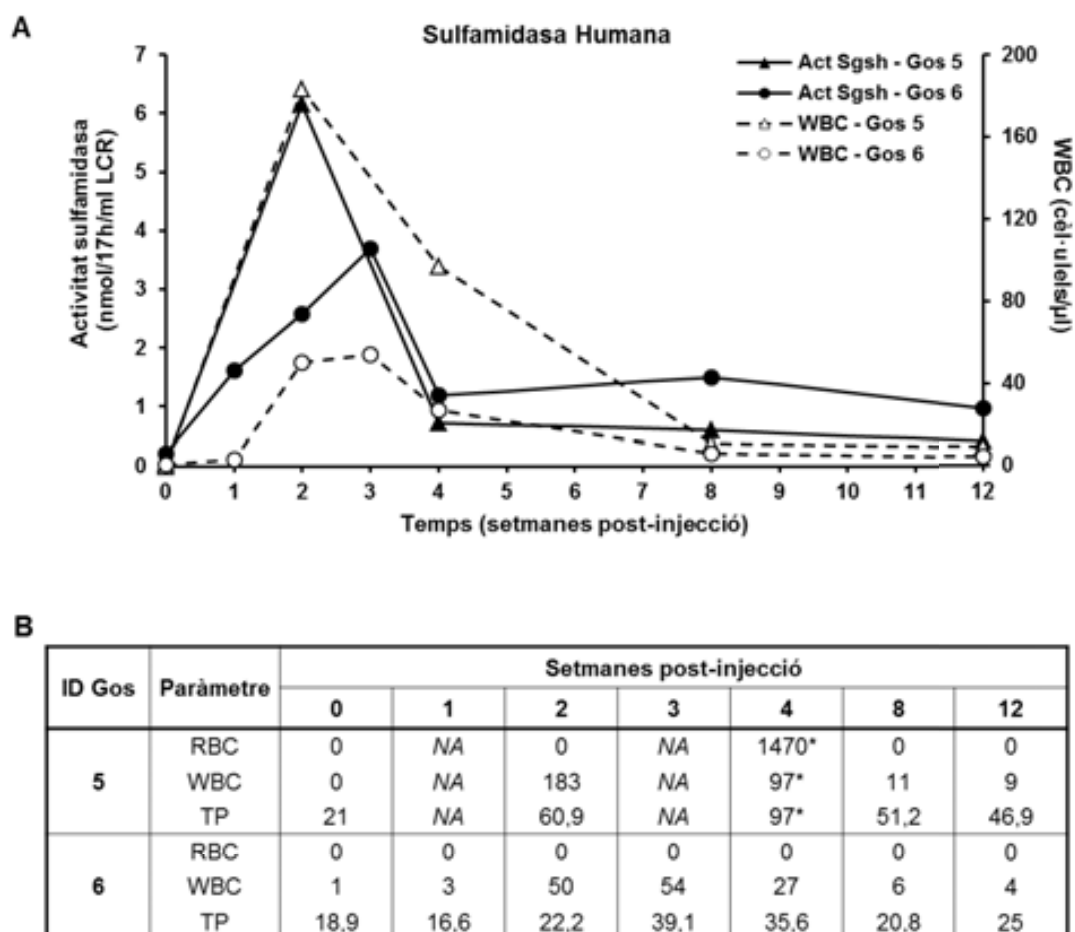


Figura 3 7. Ad ministració intr a-LCR de l'AAV9-hSgsh a gossos. (A) Seguiment de l'activitat sulfamidasa al LCR després de la transferència de l'AAV9-hSgsh (Gossos 5 i 6). L'activitat sulfamidasa (símbols negres) i el recompte de leucòcits (símbols blancs) es representen al mateix gràfic. L'activitat sulfamidasa basal està per sota dels límits de detecció de la tècnica després de la quantificació de 10 mostres de LCR de gossos Beagle sans no tractats. Act, Activitat. **(B)** Recompte de cèl·lules i quantificació del contingut de proteïna total al LCR dels gossos injectats. Els valors de referència dels paràmetres analitzats al LCR són: recompte d'eritròcits (o *Red Blood Cell Count*, RBC) = 0, recompte de leucòcits (o *White Blood Cell Count*, WBC) < 5 cells/μl i Proteïna Total (o *Total Protein*, TP) < 25 mg/dl. NA: mostra no disponible; ID: Identificació; *, mostra contaminada amb sang.

2.2.1.2. Expressió del gen de la sulfamidasa humana

D'acord amb els nivells d'activitat enzimàtica assolits al LCR, l'expressió de la sulfamidasa humana, quantificada 3 mesos després de l'administració del vector, es va detectar en diverses àrees del SNC, tant properes com llunyanes del punt d'injecció (Figura 38). A més a més, el SNP i alguns teixits perifèrics com el fetge, la melsa i els nòduls limfàtics cervicals també van mostrar un bon nivell d'expressió del gen de la sulfamidasa (Figura 38). Aquest patró d'expressió coincidia amb el patró de distribució de genomes virals detectat prèviament després de l'administració intra-LCR del vector viral AAV9-GFP en gossos Beagle adults sans. A més, indicava que tot i la disminució dels nivells d'activitat al LCR, molt probablement a causa de la presència d'anticossos neutralitzants contra l'enzim humà, l'expressió del gen es va mantenir a nivell elevats.

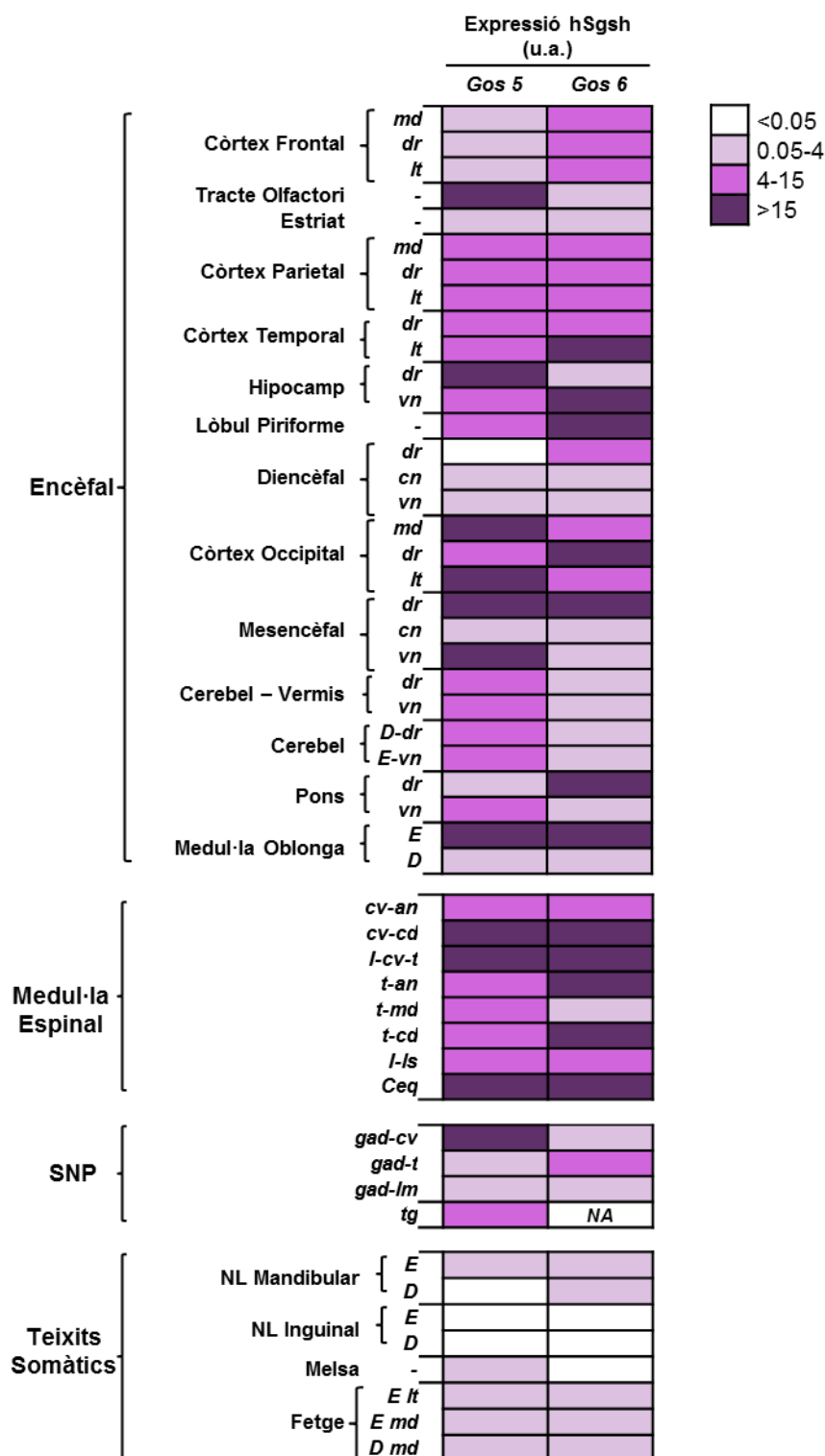


Figura 38. Persistència de l'expressió de la sulfamidasa humana després de l'administració intra-LCR de l'AAV9-hSgsh. Expressió del mRNA de la sulfamidasa humana al SNC, medul·la espinal, SNP i els teixits perifèrics després de 3 mesos de la injecció intra-LCR de 2×10^{13} vg de l'AAV9-hSgsh a gossos Beagle adults sans (Gossos 5 i 6). *md*, medial; *dr*, dorsal; *lt*, lateral; *vn*, ventral; *cn*, central; *D*, dreta; *E*, esquerra; *cv-an*, cervical anterior; *cv-cd*, cervical caudal; *I*, intumescència; *cv-t*, cervical toràcic; *t-an*, toràcica anterior; *t-md*, toràcic medial; *t-cd*, toràcic caudal; *ls*, lumbosacra; *ceq*, cua de cavall; *gad*, gangli de l'arrel dorsal; *cv*, cervical; *t*, toràcic; *lm*, lumbar; NL, nòdul limfàtic. u.a., unitats arbitràries. NA: Mostra no disponible.

2.2.2. Transferència del gen de la sulfamidasa canina

Per tal de corroborar que la resposta immunitària observada a ls gossos Beagle administrats amb la sulfamidasa humana era a causa del gen no específic d'espècie, es va administrar el vector viral AAV9 codificant per a la sulfamidasa canina (cSgsh) a una dosi de 2×10^{13} vg totals en gossos Beagle adults sans (Gossos 7-9, Figura 39A). La intervenció es va tolerar correctament i els gossos es van mantenir clínicament bé durant tot el període de seguiment de 16 mesos, durant els quals es van prendre mostres de sang i LCR (Figura 39A). Actualment, els gossos segueixen en observació per tal de monitoritzar els nivells d'activitat sulfamidasa al LCR i analitzar la seguretat de la teràpia a llarg termini.

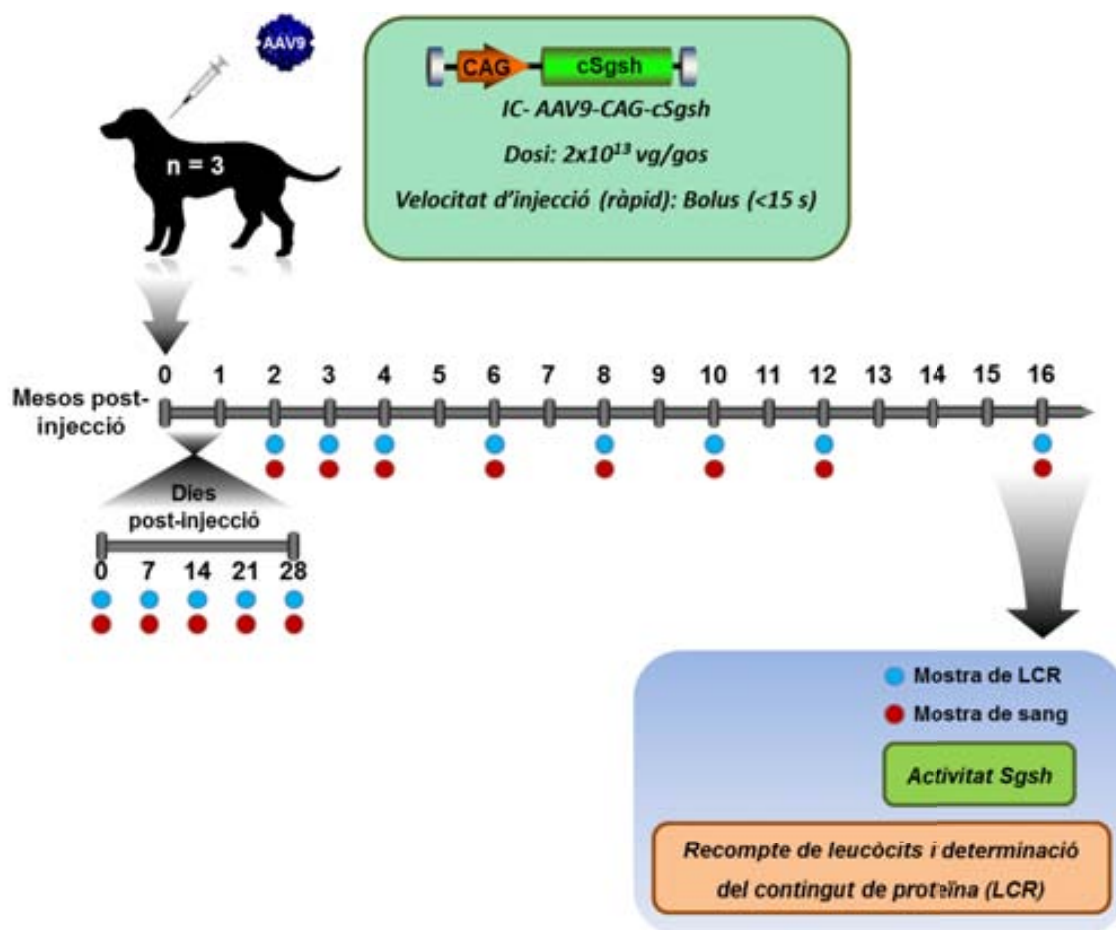
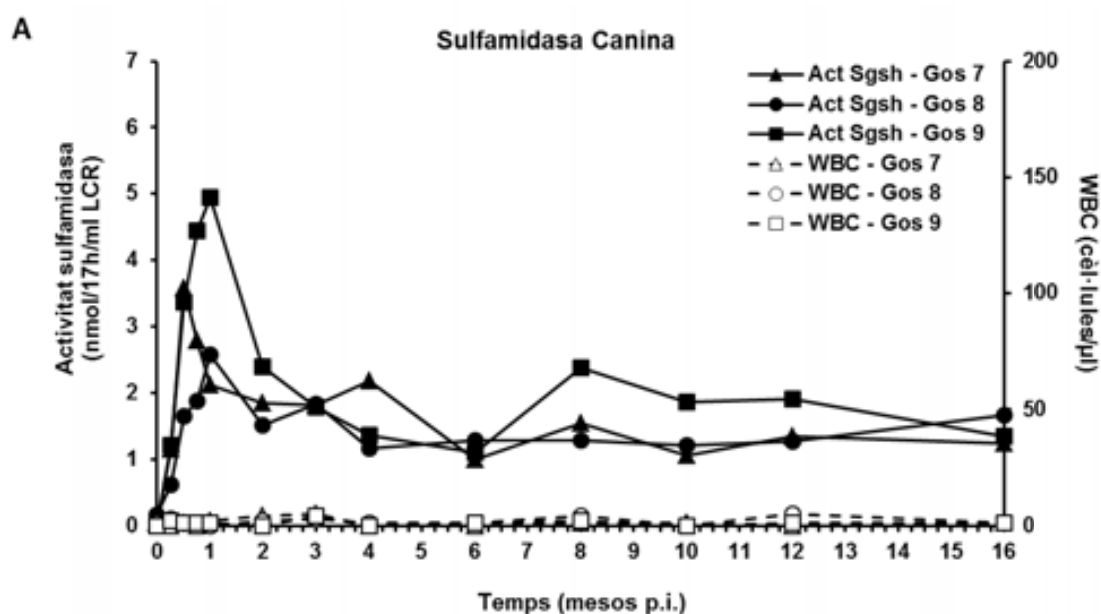


Figura 39. Disseny experimental de l'administració intra-LCR de l'AAV9 codificant per a la sulfamidasa canina a gossos Beagle adults sans. IC, intracisternal.

Tal com s'havia observat prèviament, l'activitat sulfamidasa al LCR va fer un pic entre les 2-4 setmanes després de l'administració intra-LCR de l'AAV9-cSgsh (Figura 40A). En contrast amb la caiguda d'activitat enzimàtica observada als animals que havien rebut el gen de la sulfamidasa humana, l'expressió del transgèn es va mantenir a uns nivells alts per sobre del valor basal durant tot el període de seguiment analitzat (>16 mesos) (Figura 40A). A més, el recompte de WBC i la quantificació del contingut de la proteïna total del LCR d'aquests gossos es va mantenir dins els valors normals de referència durant tot el seguiment (Figura 40B).

Per tant, aquests resultats van demostrar que la pèrdua de l'activitat de la sulfamidasa humana observada als gossos 5 i 6 era com a conseqüència de la utilització d'un transgèn no específic d'espècie que induïa un procés immunitari al SNC. Contràriament, l'activitat enzimàtica mesurada al LCR de gossos Beagle adults injectats amb l'AAV9-cSgsh es va mantenir estable a llarg termini suggerint que una única administració intra-LCR del vector AAV9 seria suficient pel tractament de la MPSIIIA.

**B**

ID Gos	Paràmetre	Setmanes post-injecció				Mesos post-injecció									
		0	1	2	3	1	2	3	4	6	8	10	12	16	
7	RBC	0	0	0	0	0	235*	0	0	0	0	0	0	0	0
	WBC	1	0	1	0	2	4*	5	0	0	1	1	0	1	
	TP	17,6	17,1	14,9	17,4	25,1	22,7*	21	19,3	24,8	22,7	20,2	19	18,2	
8	RBC	0	251*	0	0	0	0	0	59*	0	0	0	0	0	
	WBC	1	3*	1	1	0	2	3	1*	1	4	0	5	1	
	TP	17,9	19,6*	16,9	17,1	20,3	29,4	18,9	19,4*	22,8	21,6	19,1	21,1	22,6	
9	RBC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	WBC	0	2	1	1	1	0	4	0	0	2	0	1	1	
	TP	13,4	14,8	11,6	11,9	15,2	18	18,9	19,6	18,9	19,4	21,7	18,9	22,6	

Figura 40. Detecció de l'activitat sulfamidasa al LCR després de l'administració de l'AAV9-cSgsh. (A) Seguiment de l'activitat sulfamidasa al LCR després de la injecció intracisternal de 2×10^{13} vg totals de l'AAV9-cSgsh (Gossos 7, 8 i 9). L'activitat sulfamidasa (símbols negres) i el recompte de leucòcits (símbols blancs) es representen al mateix gràfic. L'activitat sulfamidasa basal està per sota dels límits de detecció de la tècnica després de la quantificació de 12 mostres de LCR de gossos Beagle sans no tractats. Act, Activitat. (B) Recompte de cèl·lules i la quantificació del contingut de proteïna total al LCR dels gossos injectats. Els valors de referència dels paràmetres analitzats al LCR són: recompte d'eritròcits (o *Red Blood Cell Count*, RBC) = 0, recompte de leucòcits (o *White Blood Cell Count*, WBC) < 5 cèl·lules/μl i Proteïna Total (o *Total Protein*, TP) < 25 mg/dl. ID: Identificació; *, mostra contaminada amb sang.

2.3. Comparació de la biodistribució del vector AAV9 després de l'administració per la via intracisternal i intracerebroventricular

La cisterna magna és accessible fàcilment en ratolins i gossos, i la punció cisternal és un procediment rutinari en medicina veterinària. D'altra banda, l'administració intracisternal no és una pràctica clínica estàndard en pacients pediàtrics, mentre que l'administració intracerebroventricular (ICV) és una tècnica utilitzada habitualment en neurocirurgia pediàtrica. Per tant, es va dissenyar un estudi comparatiu entre ambdues rutes d'administració per tal de determinar el patró de distribució d'aquest vector viral al SNC, SNP i teixits perifèrics.

El disseny experimental de l'estudi va consistir en l'administració directa al LCR del vector viral AAV9 codificant pel gen marcador GFP mitjançant una injecció intracisternal (Gos 10) o bé intracerebroventricular (Gossos 11 i 12) (Figura 41A). Abans de l'administració ICV, es va realitzar una ressonància magnètica nuclear del cervell de cada gos per tal d'identificar el ventricle lateral més gran al qual s'hi administraria el vector sense provocar danys al cervell. Durant el procediment, es va utilitzar un neuronavegador per guiar la trajectòria que el catèter havia de seguir des de la superfície del crani fins al ventricle lateral (Figura 41B). Es va administrar 1 ml de la solució que contenia el vector viral, durant aproximadament 15 segons, a dins del ventricle lateral. Tots els animals injectats per via ICV van tolerar correctament el procediment quirúrgic, tal com van evidenciar els valors del recompte de leucòcits i la quantificació del contingut de proteïna total de les mostres de LCR després de l'administració (Figura 41C).

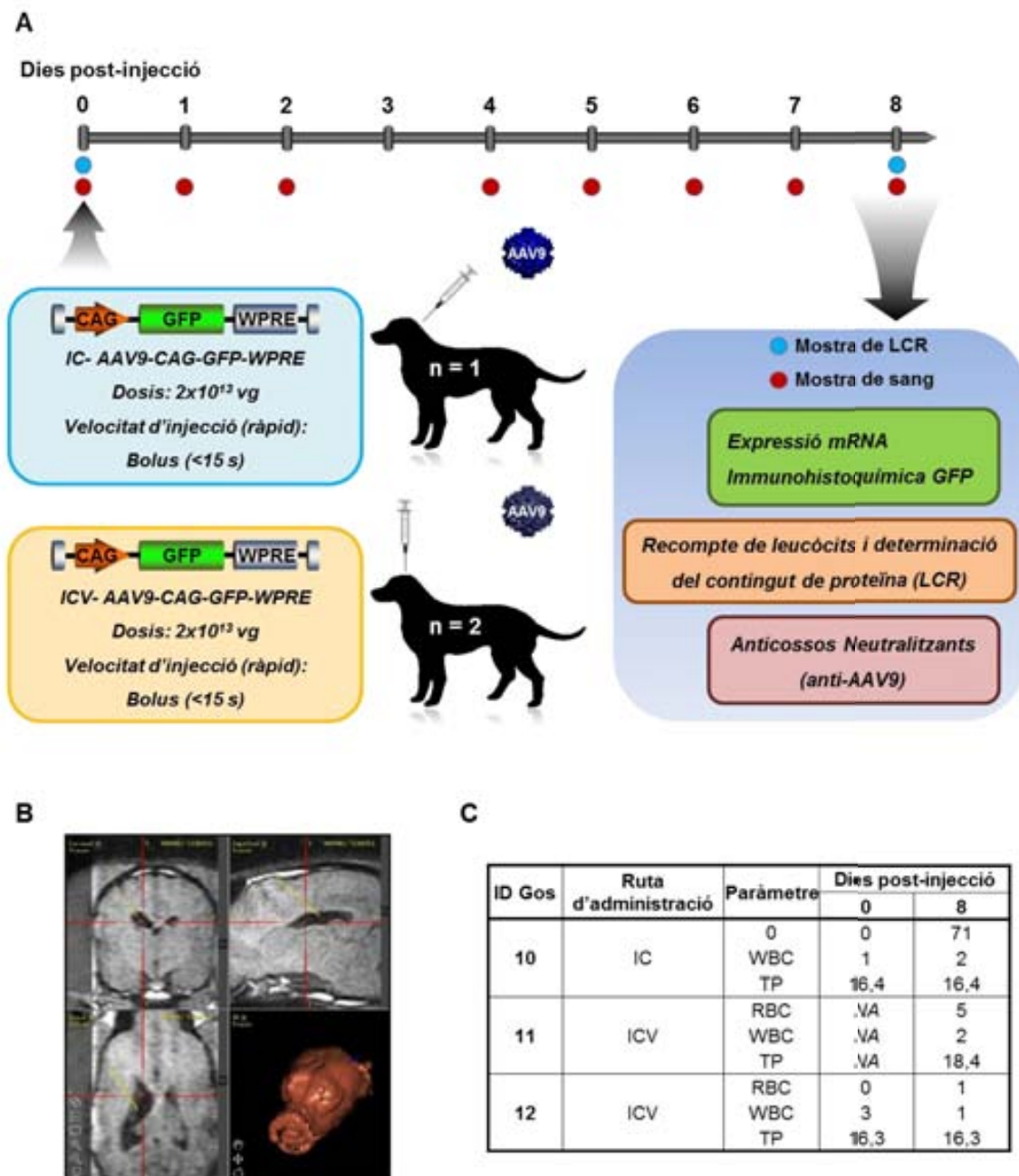


Figura 41. Comparació de dues rutes d'administració del vector viral AAV9 intra-LCR: intracisternal o intracerebroventricular. (A) Disseny experimental de l'estudi comparatiu de les dues rutes d'administració (intracisternal, IC, o intracerebroventricular, ICV) del vector AAV9 al LCR. **(B)** Imatges del cervell que mostren la trajectòria guiada des del neuronavegador per tal d'arribar al ventricle lateral des de la superfície del crani durant la injecció intracerebroventricular. **(C)** Recompte de cèl·lules i proteïna total després de l'administració intra-LCR del vector AAV9 a gossos. Els valors de referència dels paràmetres analitzats al LCR són: recompte d'eritròcits (o *Red Blood Cell Count*, RBC) = 0, recompte de leucòcits (o *White Blood Cell Count*, WBC) < 5 cells/ μ l i Proteïna Total (o *Total Protein*, TP) < 2.5 mg/dl. NA: mostra no disponible; ID: Identificació. WPRE, element regulador post-transcripcional del virus de l'hepatitis de marmota o *Woodchuck Posttranscriptional Regulator Element*, augmenta l'estabilitat del mRNA incrementant l'expressió del gen transferit.

2.3.1. Anàlisi histològic de les dues rutes d'administració

La immunohistoquímica de GFP de les seccions del SNC dels gossos injectats per via ICV es va observar que l'epiteli del plexe coroide i els endotèl·lies del ventricle lateral de l'hemisferi injectat es transduïen més eficientment, en comparació amb l'hemisferi contralateral, a on també es va observar cèl·lules GFP positives però més aïllades (Figura 42). Ambdues rutes d'administració van mostrar una forta immunoreactivitat de la GFP a les cèl·lules de les leptomeninges, que presentaven aproximadament un 75-100% de les cèl·lules transduïdes al cerebel i les regions més caudals del cervell; mentre que la transducció de les leptomeninges de les àrees més rostrals era menor. Al còrtex cerebral dels gossos injectats ICV, les cèl·lules GFP positives van mostrar el mateix patró de transducció difús horitzontal i multifocal que s'havia observat prèviament als gossos injectats a la cisterna magna (Figura 42). A més, les regions més superficials del cerebel dels gossos injectats ICV que es trobaven en contacte directe amb el LCR van presentar més positivitat que a les làmines més profundes, tal com es va observar clarament al còrtex occipital (Figura 42). En general, l'expressió del transgèn després de l'administració ICV es va detectar a tot el SNC, tant a regions properes com distals al punt d'injecció. A més, el SNP també es va transduir tal com van mostrar els ganglis de l'arrel dorsal.

Per tant, ambdues rutes d'administració van demostrar un patró similar de biodistribució del vector viral AAV9 al SNC i SNP. Ara bé, la injecció ICV també era capaç de la transducció eficient dels endotèl·lies i l'epiteli del plexe coroide del ventricle lateral on s'havia administrat el vector viral.

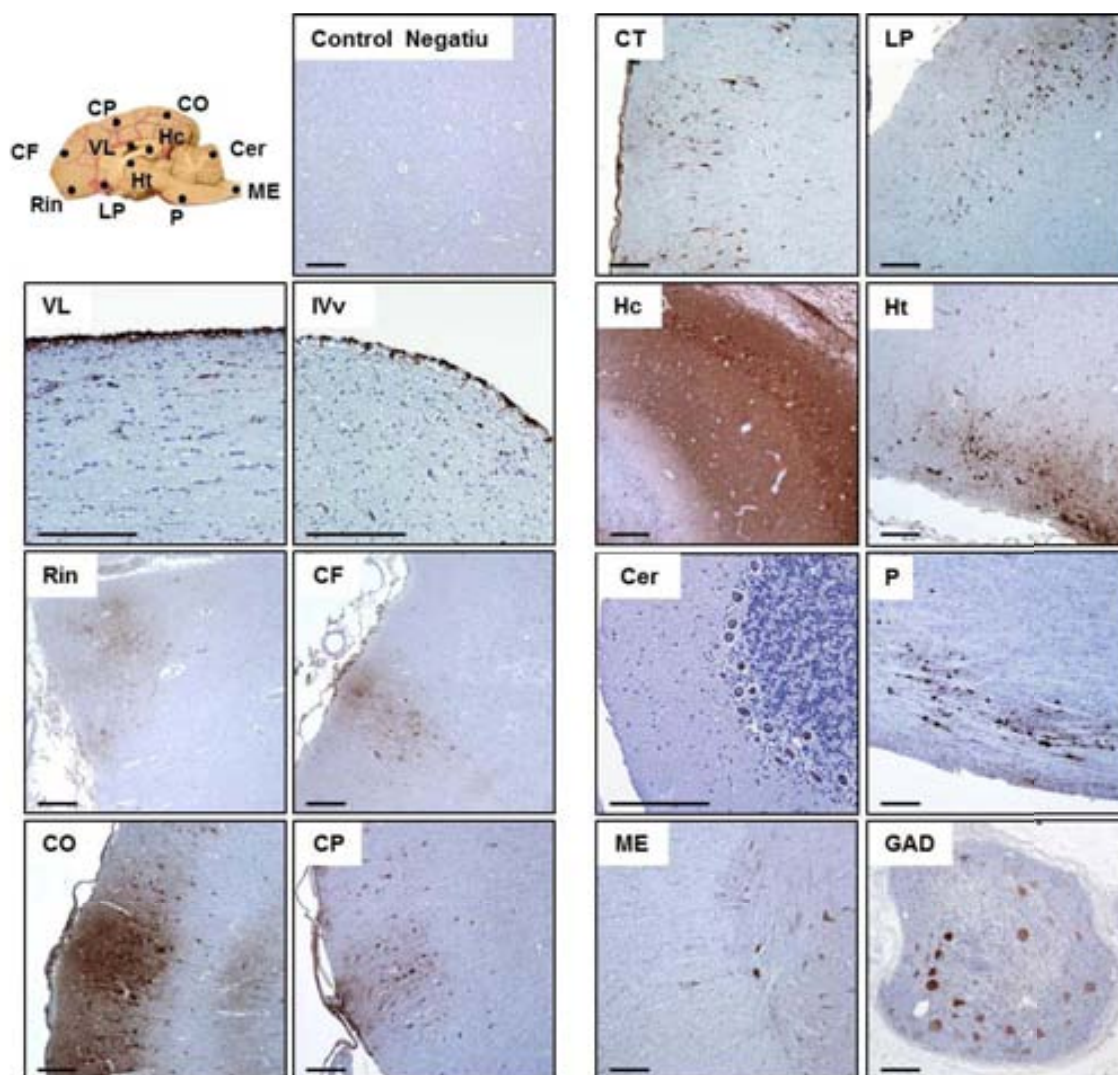


Figura 42. Administració intracerebroventricular del vector AAV9 a gossos. Expressió del transgèn analitzada per immunohistoquímica de GFP després de 8 dies de l'administració ICV unilateral de 2×10^{13} vg totals d'AAV9-GFP a gossos Beagle adults sans (imatges representatives del Gos 12). VL, Ventricle Lateral; IVv, Quart Ventricle; Rin, Rinencèfal; CF, Còrtex Frontal; CO, Còrtex Occipital; CP, Còrtex Parietal; CT, Còrtex Temporal; LP, Lòbul Piriforme; Hc, Hipocamp; Ht, Hipotàlem; Cer, Cerebel; P, Pons; ME, Medul·la Espinal; GAD, Gangli de l'Arrel Dorsal. Escala: 250 μ m.

2.3.2. Número de còpies de genomes virals i expressió del mRNA

L'anàlisi de la biodistribució del vector viral i de l'expressió del transgèn (GFP) al SNC, SNP i òrgans somàtics no va suggerir unes diferències importants en el patró de transducció del vector mitjançant la ruta d'administració IC o ICV (Figura 43). D'entrada, es va detectar la presència de genomes virals distribuïts al llarg de totes les regions de l'encèfal analitzades (Figura 43 i 44). A més, també es va observar una transducció eficient del SNP, tal com va evidenciar la detecció d'alt nombre de còpies de genomes virals i forta expressió de GFP al gangli de l'arrel dorsal i el trigemin (Figura 43). Tant després de l'administració IC com ICV, el vector viral va drenar des del LCR cap a sang perifèrica transduint principalment el fetge, a on també es van detectar un nombre alt de còpies de genomes virals i una forta expressió de GFP.

Per tant, tots aquests resultats van mostrar que era possible aconseguir una àmplia distribució del vector AAV9 administrat per via ICV assolint uns bons nivells d'expressió del transgèn al SNC, SNP i fetge, i a més, essent comparable als resultats obtinguts després de l'administració IC del vector (Figura 43 i 44).

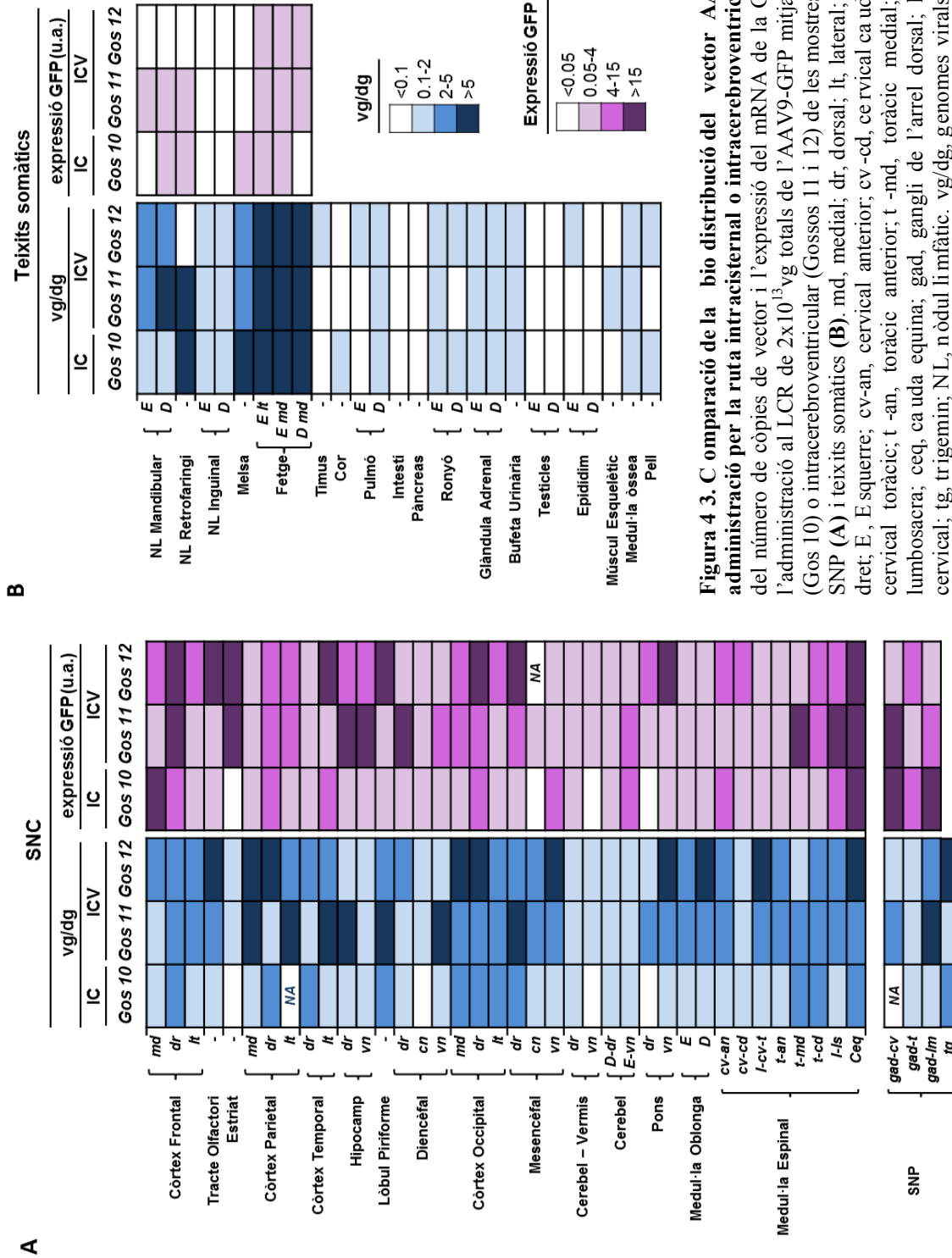


Figura 4 3. C omparació de la **bio** distribuïció del vector **AAV9** després de la **s** eva **administració** per la ruta **intracisternal** o **intracerebroventricular**. **(A, B)** Quantificació del número de còpies de vector i l'expressió del mRNA de la GFP a 3 gossos després de l'administració al LCR de 2×10^{13} vg totals de l'AAV9-GFP mitjançant la ruta intracisternal (Gos 10) o intracerebroventricular (Gossos 11 i 12) de les mostres representatives del SNC i SNP **(A)** i teixits somàtics **(B)**. md, medial; dr, dorsal; lt, lateral; vn, ventral; cn, central; D, dret; E, E esquerre; cv-an, cervical anterior; cv-cd, cervical caudal; I, in tumescència; cv-t, cervical toràcic; t-an, toràcic anterior; t-md, toràcic medial; t-cd, to ràcic caudal; ls, lumbosacra; ceq, cauda equina; gad, gangli de l'arrel dorsal; lm, lumbar; t, toràcic; cv, cervical; tg, trigemin; NL, nòdul limfàtic. vg/dg, genomes virals / genomes diploides; u.a., unitats arbitràries; IC, intracisterna; ICV, intracerebroventricular; NA, mostra no disponible.

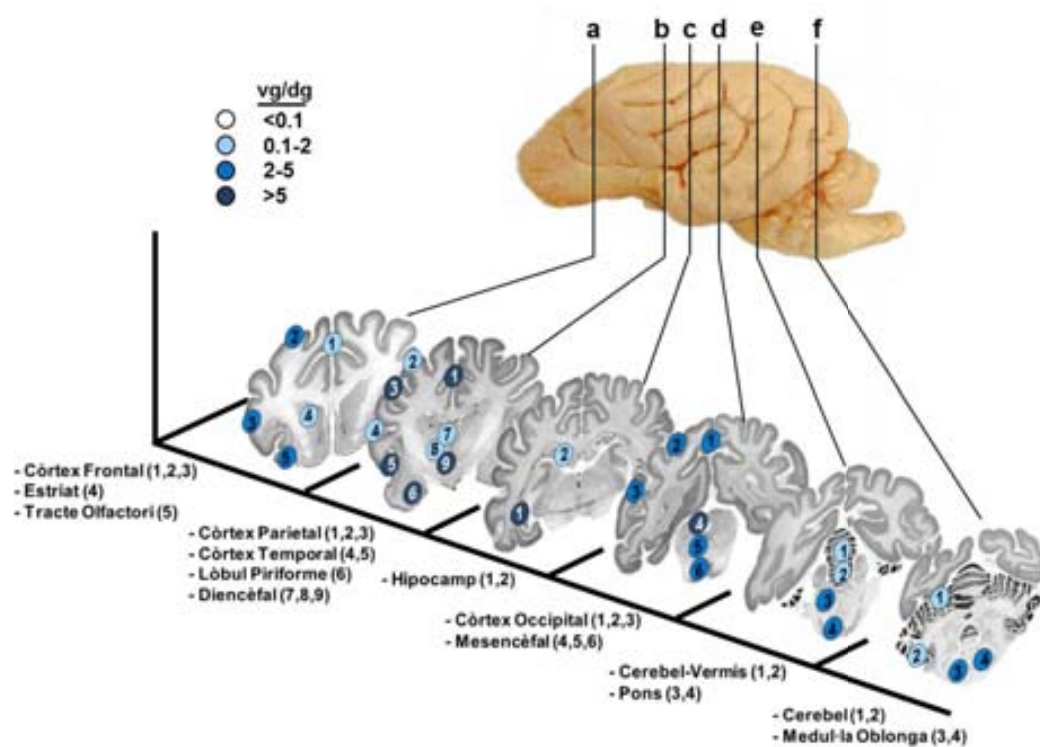


Figura 44. Àmplia distribució del vector AAV9 al SNC després de l'administració ICV de l'AAV9 al LCR. Representació esquemàtica mitjançant una escala de colors del número de còpies de genomes virals quantificades a les mostres d'un dels gossos injectats ICV amb l'AAV9-GFP (Gos 11). Les regions mostrejades estan indicades numèricament a l'hemisferi esquerre de les sis seccions representatives (a-f) de l'encèfal del gos. vg/dg, genomes virals/genomes diploides.

2.4. Resum de l'administració intra-LCR del vector AAV9

La transferència de l'AAV9 directa al LCR mitjançant l'administració unilateral al ventricle lateral o bé intracisternal va provocar l'àmplia distribució de les partícules de vector a tot el cervell, la medulla espinal i el SNP (Figura 45A). A més, una part dels vectors va drenar des del LCR cap a circulació perifèrica provocant la transducció del fetge (Figura 45A). Com a resultat d'aquest patró de distribució del vector, l'activitat sulfamidasa va augmentar al LCR dels gossos injectats amb l'AAV9 codificant per la sulfamidasa. A més, els ratolins model de la MPSIIIA també es va poder demostrar un increment de l'activitat sulfamidasa tant al SNC com al fetge, el qual actua com a principal font productora i secretora d'enzim circulant per la resta de teixits perifèrics (Figura 45B). Així doncs, els nivells d'activitat sulfamidasa assolits van permetre la correcció de la patologia neurològica i somàtica a ratolins MPSIIIA després de l'administració directa al LCR del vector AAV9 codificant pel gen de la sulfamidasa.

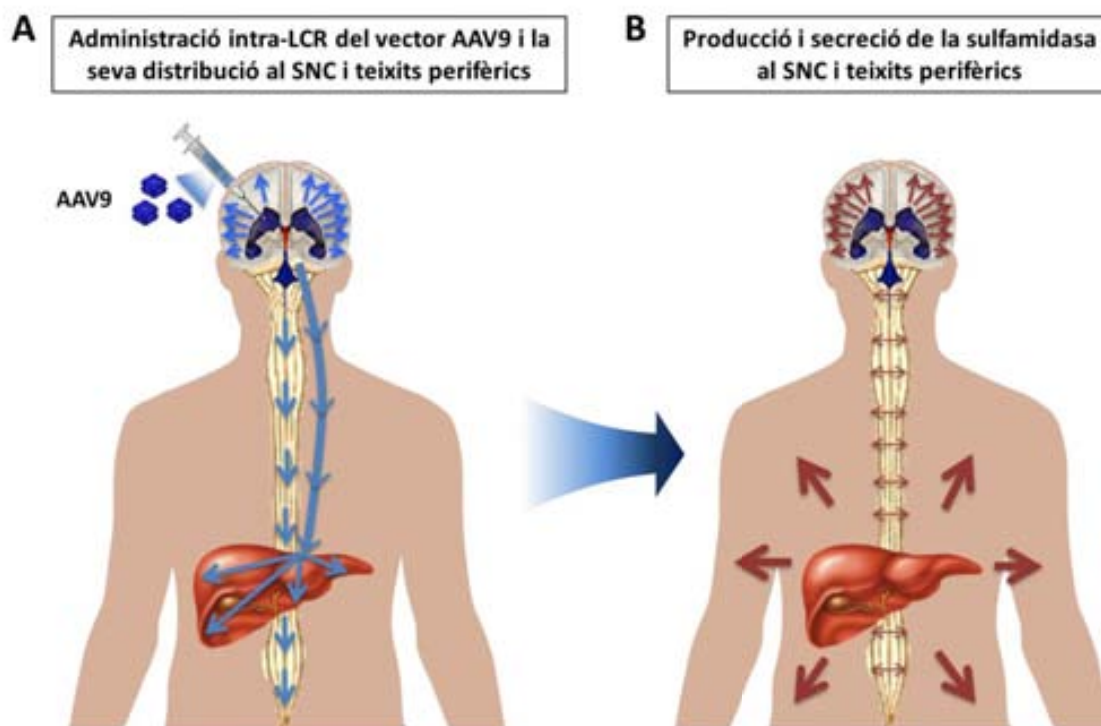


Figura 4 5. Representació esquemàtica de la distribució del vector i el transgèndesprés de l'administració intra-LCR del vector AAV9. (A) Esquema de l'administració intra-LCR del vector viral AAV9 i la seva distribució al SNC i el fetge. (B) Esquema de la producció i secreció de la sulfamidasa al SNC i al fetge.

3. IMPACTE DE LA IMMUNITAT HUMORAL PREEXISTENT EN L'EFICIÈNCIA DE TRANSDUCCIÓ DEL SNC

Els anticossos neutralitzants (o *Neutralizing Antibodies*, NAbs) contra els AAVs són molt freqüents en humans (Boutin, 2010). Després de l'administració sistèmica del vector viral, els NAbs anti-AAV poden afectar directament en l'eficiència de transducció dels AAVs (Manno, 2006; Jiang, 2006; Scallan, 2006). Així que actualment s'estan estudiant diverses aproximacions per tal de sobrepassar aquesta limitació de la teràpia gènica amb AAVs (Mingozzi, 2013; Monteilhet, 2011). Algunes LSDs, que són susceptibles a ser tractades per teràpia gènica, tenen alterada les funcions de la BHE i podria ser que les immunoglobulines circulants entressin lliurement al SNC bloquejant fàcilment la transducció dels vectors AAVs (Begley, 2008). Tot i això, l'estudi d'un pacient de la MPSIIIA no ha evidenciat cap alteració de la BHE (Garbuzova-Davis, 2013).

3.1. Distribució asimètrica dels anticossos neutralitzants anti-AAV a causa de la barrera hematoencefàlica

3.1.1. Títols d'anticossos neutralitzants a pacients humans

En aquest treball, es va estudiar l'impacte de la malaltia i del possible trencament de la BHE associat a ella en la distribució dels NAbs anti-AAV als individus sans i afectats per la MPSIIIA. La Dra. Pineda, de l'Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, va cedir-nos les mostres emparellades de LCR i sèrum de diversos pacients en edat pediàtrica per testar-les mitjançant l'assaig *in vitro* descrit per Manno *et. al* (Manno, 2006). En general, els títols de NAbs anti-AAV2 van ser més elevats que els títols anti-AAV9 (Taula 3), coincidint amb els estudis previs sobre la freqüència dels anticossos neutralitzants a la població (Boutin, 2010). A més, també es va detectar la presència de NAbs a les mostres de LCR, tot i que els títols eren molt més baixos que a les mostres de sèrum del mateix pacient (Taula 3). En particular, els individus afectats per la MPSIIIA també van presentar més anti-AAV a sèrum que a les mostres emparellades de LCR, suggerint que la malaltia no havia alterat la permeabilitat de la BHE a les

immunoglobulines circulants. Tot i el petit nombre de mostres de sèrum-LCR emparellades disponibles, els títols de NAb van tenir tendència a augmentar amb l'edat, tal com havien descrit prèviament altres estudis sobre la freqüència dels NAb en la població pediàtrica (Calcedo, 2011; Li, 2012).

Taula 3. Títols d'anticossos neutralitzants a mostres de sèrum i LCR d'individus sans i pacients de MPSIIIA.

ID Pacient	Edat	Mostra	AAV9 NAb	AAV2 NAb
Control 1	4 dies	Sèrum	1:1	1:10-1:31,6
		LCR	1:1-1:3,1	1:1-1:3,1
Control 2	1 mes	Sèrum	1:1	1:1
		LCR	1:1-1:3,1	1:1
Control 3	1 any	Sèrum	1:10-1:31,6	1:100-1:316
		LCR	1:1-1:3,1	1:1
Control 4	4 anys	Sèrum	1:1	1:1-1:3,1
		LCR	1:1-1:3,1	1:1
Control 5	5 anys	Sèrum	1:1	1:1
		LCR	1:1-1:3,1	1:1-1:3,1
MPSIIIA-1	6 anys	Sèrum	1:1-1:3,1	1:3,1-1:10
		LCR	1:1-1:3,1	1:1-1:3,1
MPSIIIA-2	7 anys	Sèrum	1:31,6-1:100	1:316-1:1000
		LCR	1:1-1:3,1	1:1-1:3,1
MPSIIIA-3	7 anys	Sèrum	1:100-1:316	1:1000-1:3160
		LCR	1:1-1:3,1	1:3,1-1:10
MPSIIIA-4	12 anys	Sèrum	1:316-1:1000	1:1000-1:3160
		LCR	1:3,1-1:10	1:3,1-1:10

Títols d'anticossos neutralitzants (NAb) anti-AAV9 i anti-AAV2 determinats a les mostres de sèrum i LCR de pacients sans i afectats per la MPSIIIA. ID: Identificació.

3.1.2. Títols d'anticossos neutralitzants a gossos

Com que el vector AAV9 prové de virus humans, cap dels gossos injectats va presentar nivells detectables de NAb anti-AAV9 a sèrum o LCR a bans de l'administració. A gossos Beagle adults sans, l'administració del vector viral AAV9 directa al LCR va resultar en una resposta sistèmica humoral contra la càpsida de l-AAV9 (Taulas 4 i 5). Tal com era d'esperar, els títols de sèrum van augmentar

ràpidament després de l'exposició al vector, així que 8 dies després de l'administració tots els gossos van mostrar uns títols de NAbs a sèrum > 1:1000 (Taula 4 i 5). D'altra banda, les mostres de LCR van presentar uns títols inferiors a 1:10, confirmant la distribució asimètrica dels NAbs a través de la BHE (Taula 4). Després de l'administració IC de l'AAV9 codificant pel gen de la sulfamidasa humana als gossos 5 i 6, els quals van presentar signes d'inflamació al SNC, es va observar que els títols de NAbs anti-AAV al LCR incrementaven fins a valors de 1:100-1:1000 (Taula 5).

Taula 4. Seguiment dels títols d'anticossos neutralitzants a les mostres de sèrum i LCR abans i després de l'administració intra-LCR de l'AAV9 a gossos.

ID Gos	Mostra	Dies post-injecció	
		0	8
1	Sèrum	1:3-1:10	NA
	LCR	NA	1:1-1:3,1
2	Sèrum	1:3,1-1:10	>1:3160
	LCR	1:1-1:3,1	1:1-1:3,1
3	Sèrum	1:3,1-1:10	>1:3160
	LCR	1:1-1:3,1	1:1-1:3,1
4	Sèrum	NA	>1:3160
	LCR	1:1-1:3,1	1:1-1:3,1
10	Sèrum	<1:1	>1:1000
	LCR	1:1-1:3,1	1:1-1:10
11	Sèrum	<1:1	>1:1000
	LCR	1:1-1:3,1	1:1-1:10
12	Sèrum	<1:1	>1:1000
	LCR	1:1-1:3,1	1:1-1:10

NA: Mostra no disponible; ID: Identificació.

Taula 5 . Seguiment dels anticossos neutralitzants a mostres de sèrum i LCR després de la transferència de l'AAV9-hSgsh.

ID Gos	Mostra	Setmanes post-injecció						
		0	1	2	3	4	8	12
5	Sèrum	<1:1	NA	>1:1000	NA	>1:1000	>1:1000	>1:1000
	LCR	1:1-1:3,1	NA	1:100-1:1000	NA	1:100-1:1000	1:100-1:1000	1:100-1:1000
6	Sèrum	<1:1	>1:1000	>1:1000	>1:1000	>1:1000	>1:1000	>1:1000
	LCR	1:1-1:3,1	1:1-1:3,1	>1:1000	1:100-1:1000	1:10-1:100	1:100-1:1000	1:10-1:100

NA: Mostra no disponible; ID: Identificació.

3.2. Administració intracisternal d'AAV9-GFP en gossos Beagle preimmunitzats contra l'AAV9

Després de detectar títols de NAbs a LCR més baixos que a sèrum, es va investigar si l'eficiència de transducció del vector viral AAV9 administrat directament al LCR podria variar a causa de la immunitat humoral preexistent. D'aquesta manera, es podria determinar si els pacients de la MPSIIIA seropositius per a l'AAV9 podrien ser candidats per a l'aproximació de teràpia gènica desenvolupada al nostre laboratori.

En aquesta part de l'estudi, es va dur a terme la immunització contra l'AAV9 de dos gossos Beagle adults sans (Gos 13 i 14) mitjançant l'administració sistèmica del vector AAV9-Nul a una dosi de 1.2×10^{12} vg totals (Figura 46). Després d'un mes de la immunització, els animals van rebre 2×10^{13} vg totals de l'AAV9-GFP per via intracisternal (Figura 46). Per tal d'evitar la possible resposta immunitària contra la proteïna GFP forana, els gossos es van sacrificar 8 dies després l'administració IC per tal d'avaluar l'eficiència de transducció del vector als gossos amb immunitat humoral anti-AAV9 preexistent (Figura 46). El recompte de leucòcits i la quantificació de la proteïna total al LCR es van mantenir dins dels valors de referència a tots els animals injectats (Taula 6).

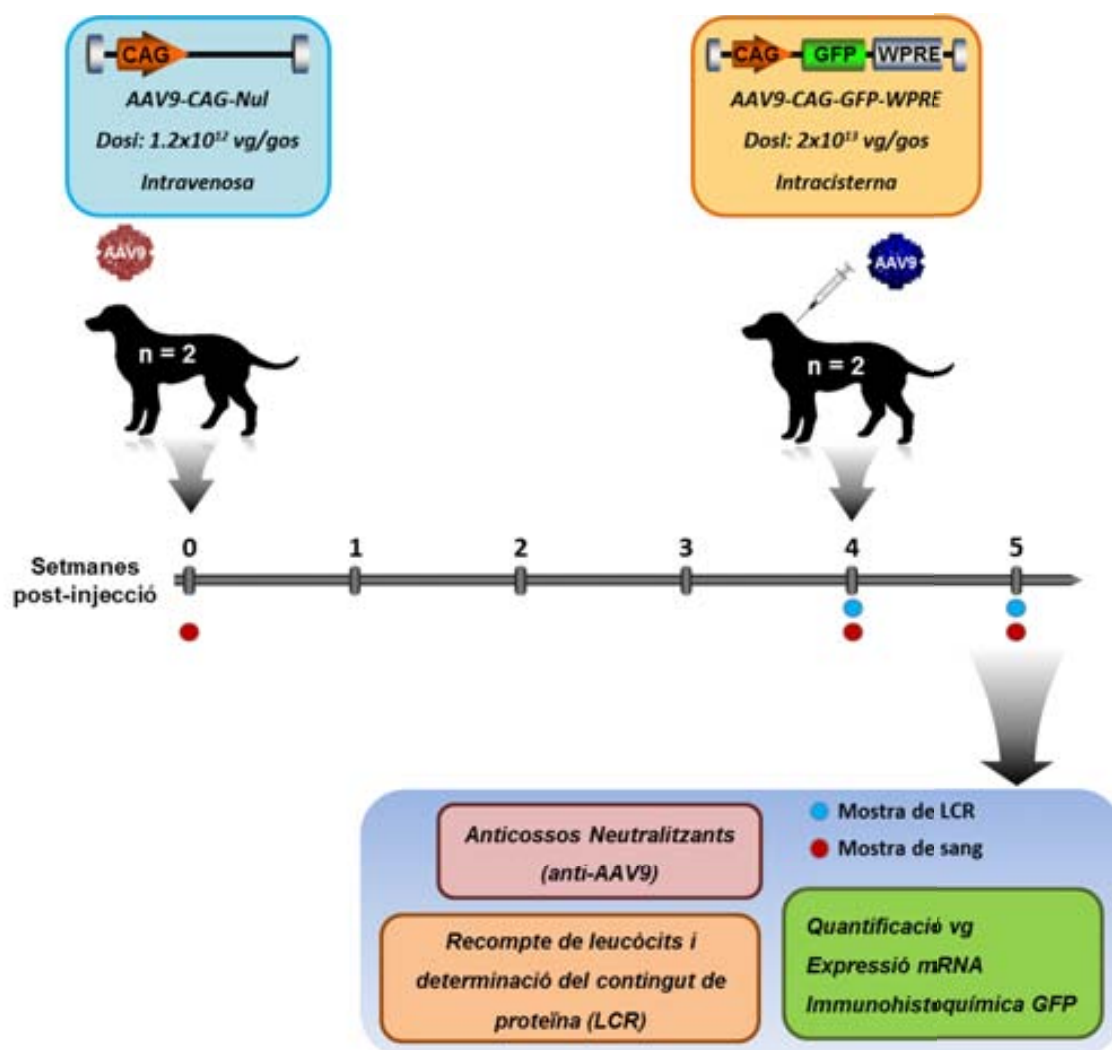


Figura 46. Disseny experimental de l'administració intra-LCR del vector AAV9 a gossos Beagle adults amb immunitat humoral anti-AAV9 pre existent. AAV9-CAG-Nul, vector AAV9 que no codifica per cap transgèn i s'utilitza per a la preimmunització dels gossos contra el vector AAV9.

Taula 6. Rec ompte de cè l·lules i quantificació del contingut de proteïna total al LCR després de l'administració intra-LCR del vector AAV9 a gossos amb immunitat humoral preexistent.

ID Gos	Paràmetre	Dies post-injecció	
		0	8
13	RBC	0	0
	WBC	0	4
	TP	18,7	19,3
14	RBC	0	0
	WBC	0	3
	TP	19,1	15,7

El temps "0" correspon a la mostra obtinguda abans de l'administració intracisterna d'AAV9-GFP, és a dir, 30 dies després de la immunització amb una administració intravenosa del vector AAV9-Nul ($1,2 \times 10^{12}$ vg/gos). Els valors de referència dels paràmetres analitzats al LCR són: recompte d'eritròcits (o *Red Blood Cell Count*, RBC) = 0, recompte de leucòcits (o *White Blood Cell Count*, WBC) < 5 cells/ μ l i Proteïna Total (o *Total Protein*, TP) < 25 mg/dl. ID: identificació.

3.2.1. Títols d'anticossos neutralitzants

Després de la immunització dels gossos, els títols de NAbs anti-AAV9 a sèrum van arribar a valors $>1:1000$ (Taula 7). Aquests valors són molt més elevats que els de la majoria de la població humana contra el vector viral AAV9 (1:20), i únicament un 20% dels individus seropositius presenten un títol més elevat de 1:400 (Boutin, 2010). Així doncs, la situació generada durant el procés d'immunització dels gossos era molt més astringent que la presència d'aquests NAbs a la majoria de la població humana analitzada. El LCR dels gossos preimmunitzats va presentar uns títols de NAbs molt més baixos que el sèrum, al voltant de 1,1 a 1:3,1 (Taula 7).

Taula 7. Seguiment dels títols d'anticossos neutralitzants a les mostres de sèrum i LCR abans i després de l'administració intra-LCR de l'AAV9 a gossos preimmunitzats.

ID Gos	Paràmetre	Dies post-injecció	
		0	8
13	Sèrum	1:100-1:1000	$>1:1000$
	LCR	1:1-1:3,1	<i>NM</i>
14	Sèrum	1:100-1:1000	$>1:1000$
	LCR	1:1-1:3,1	1:1-1:10

El temps "0" correspon a la mostra obtinguda abans de l'administració intracisternal, és a dir, 30 dies després de la immunització amb una administració intravenosa del vector AAV9-Nul (1.2×10^{12} vg/gos). *NM*: Mostra no mesurada, ID: identificació.

3.2.2. Anàlisi immunohistològic de la transducció del SNC

Els gossos prèviament immunitzats es van injectar per via intracisternal a una dosi de 2×10^{13} vg de l'AAV9 codificant per a la GFP per tal de detectar la distribució del vector viral en unes condicions més astringents (títols de NAbs a sèrum $>1:1000$). L'anàlisi immunohistoquímica contra GFP va revelar que l'AAV9 havia transduït eficientment diverses regions del SNC d'ambdós gossos i, principalment, les leptomeninges (Figura 47).

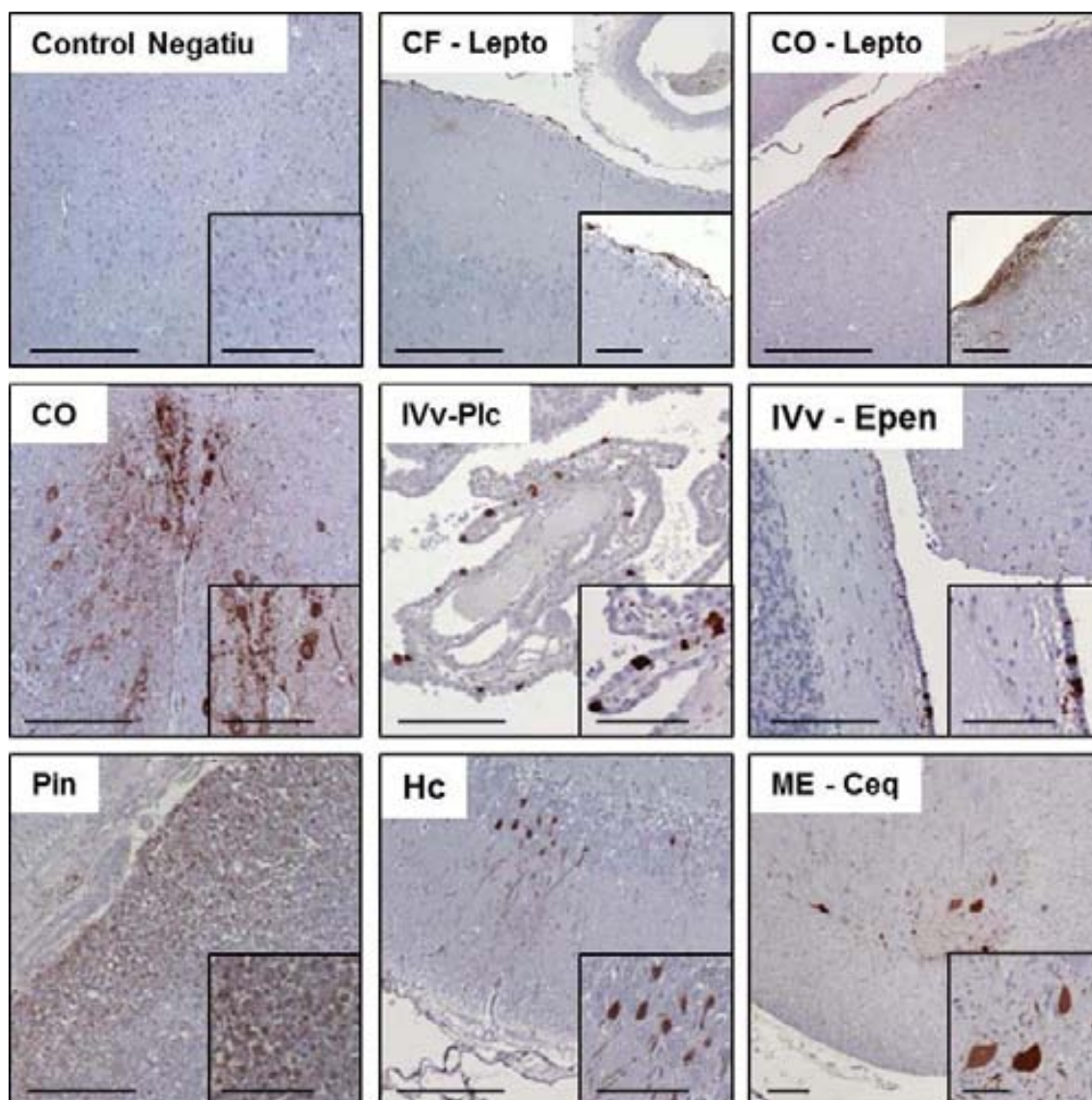


Figura 47. Impacte de la immunitat humoral preexistent en la transducció del SNC després de la transferència del vector AAV9 al LCR. Immunodetecció de les cèl·lules GFP positives al SNC després de l'administració intracisternal de 2×10^{13} vg totals de l'AAV9-GFP a gossos B6 adults 5 ans preimmunitzats contra l'AAV9 (Gossos 13 i 14). CF-Lepto, Leptomeninges del Còrtex Frontal; CO-Lepto, Leptomeninges del Còrtex Occipital; CO, Còrtex Occipital; IVv-Plc, Plexe coroide del Quart ventricle; IVv-Epen, Ependimòcits del Quart ventricle; Hc, Hipocamp; Pin, Glàndula Pineal; ME-Ceq, Cua de cavall (o *cauda equina*) de la Medul·la Espinal. Escala: 200 μm (100 μm per l'ampliació).

3.2.3. Número de còpies de genomes virals i expressió del mRNA

Finalment, la quantificació del número de còpies de vector i el mRNA de la GFP present als gossos preimmunitzats va permetre la detecció de genomes virals i expressió del transgèn al 70-95% de les mostres del SNC analitzades (Figura 48). A més a més, també es va transduir eficientment el SNP, després de l'administració directa al LCR dels gossos preimmunitzats (Figura 48).

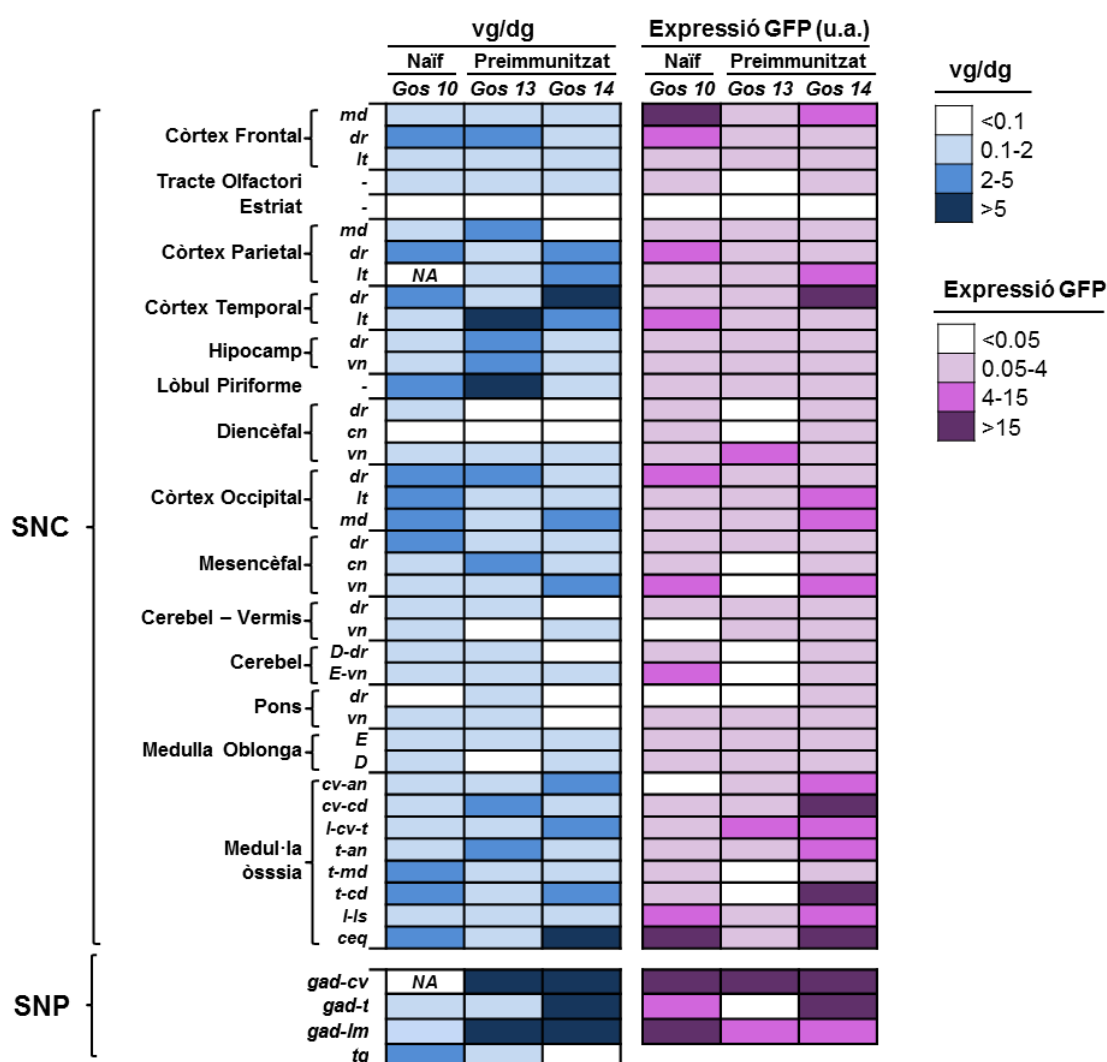


Figura 48. Impacte de la immunitat humoral a la transducció del SNC després de l'administració directa al LCR. El número de còpies de genomes virals i expressió del mRNA de la GFP després de l'administració intra-LCR de 2×10^{13} vg totals del vector AA V9-GFP a gossos naïfs (Gos 10) o preimmunitzats (Gossos 13 i 14). Les mostres són representatives de tot el SNC, SNP. md, medial; dr, dorsal; lt, lateral; vn, ventral; cn, central; D, dreta; E, esquerre; cv-an, cervical anterior; cv-cd, cervical caudal; I, intumescència; c-v-t, cervical toràcic; t-an, toràcic anterior; t-md, toràcic medial; t-cd, toràcic caudal; ls, lumbosacra; ceq, cauda equina; gad, gangli de l'arrel dorsal; lm, lumbar; t, toràcic; cv, cervical; vg/dg, genomes virals/genomes diploide; u.a., unitats arbitràries; NA, mostra no disponible.

Per altra banda, no es van de tectar còpies dels genomes virals o expressió de l transgèn a cap dels teixits perifèrics analitzats, tal com s'esperaria a causa de l'elevat títol de NAb presents al sèrum (Figura 49 i Taula 7). Aquestes dades suggerien que la immunitat humoral dels AAVs pot disminuir lleugerament l'eficàcia de la transducció del vector al SNC després de l'administració directa al LCR, quan els títols de NAb circulants són realment molt elevats.

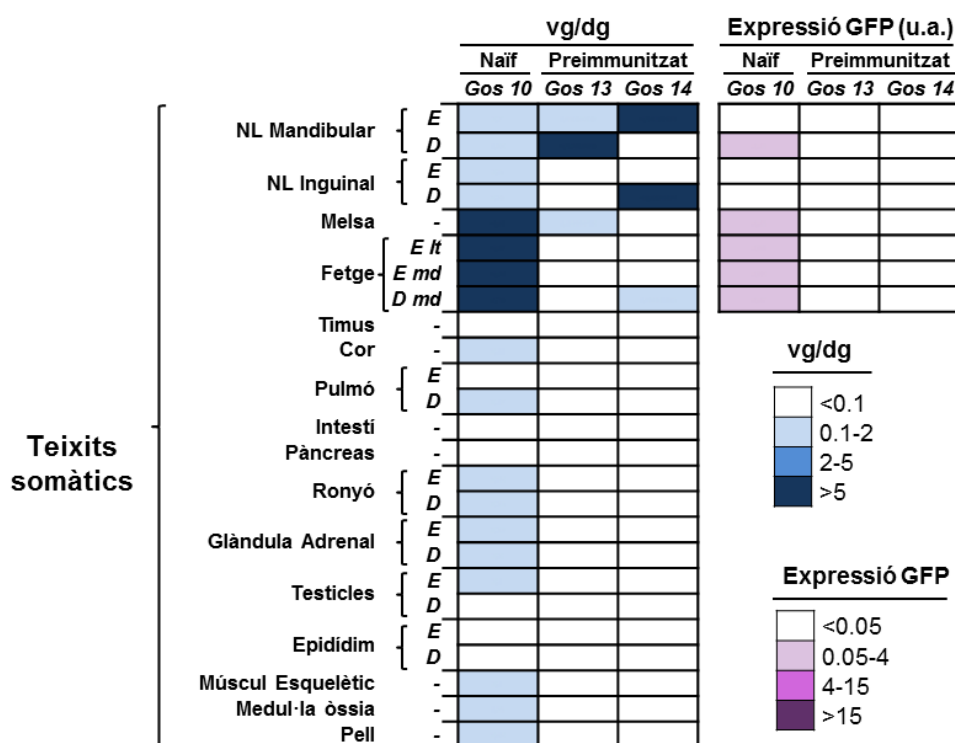


Figura 49. Impacte de la immunitat humoral a la transducció dels teixits perifèrics després de l'administració directa al LCR. El número de còpies de genomes virals i expressió del mRNA de la GFP després de l'administració intra-LCR de 2×10^{13} vg totals del vector AAV9-GFP a gossos naïfs (Gos 10) o preimmunitzats (Gossos 13 i 14). Les mostres són representatives de diversos teixits perifèrics. md, medial; lt, lateral; NL, nòdul limfàtic; vg/dg, genomes virals/genomes diploide; u.a., unitats arbitràries; NA, mostra no disponible.

Tots els resultats d'aquest treball constitueixen la base preclínica necessària per a la translació cap a la clínica de l'administració directa al LCR de l'AAV9 codificant pel gen de la sulfamidasa com a tractament per a la MPSIIIA, com també per altres LSDs amb afectació, principalment, neurològica. A més, l'última part d'aquest estudi demostra la transducció del SNC en presència d'immunitat humoral contra l'AAV9. D'aquesta manera, l'aproximació terapèutica desenvolupada en aquesta tesi obra la possibilitat de tractament de pacients seronegatius i, fins i tot, seropositius per l'AAV9.

V. DISCUSSION

La MPSIIIA és una malaltia metabòlica hereditària d'acumulació lisosòmica que es caracteritza per una severa neurodegeneració combinada amb una patologia somàtica poc severa. Com la gran majoria de LSD, actualment no hi ha cap tractament efectiu aprovat. Tot i això, hi ha algunes aproximacions terapèutiques que s'estan testant en humans, com l'ERT o la teràpia gènica amb vectors AAVs. L'ERT pel tractament de la MPSIIIA consisteix en l'administració mensual de la sulfamidasa recombinant al LCR mitjançant un dispositiu intratecal permanent per tal contrarestar l'afectació neurològica (NCT01155778, NCT01299727, clinicaltrials.gov). Tot i que no s'han publicat els resultats del primer assaig clínic amb l'ERT, l'avaluació preliminar sembla indicar una manca evident d'efecte terapèutic, possiblement pel tractament de pacients en estadis massa avançats de la MPSIIIA (Wijburg, 2013). Per aquest motiu, han iniciat un nou assaig clínic en un estadi més inicial de la malaltia (< 4 anys), que actualment està en fase de reclutament de participants (NCT02060526, clinicaltrials.gov). Els principals inconvenients de la teràpia basada en ERT són: (i) elevats costos derivats de la producció de la proteïna recombinant; (ii) repetitives administracions de l'enzim, com a conseqüència de la curta vida de la sulfamidasa, a pacients pediàtrics amb problemes de comportament; (iii) limitació de l'enzim per creuar la BHE pel tractament de l'afectació neurològica (Enns, 2008) i (iv) risc d'infeccions associat al dispositiu intratecal permanent. Per altra banda, la segona aproximació en fase de desenvolupament clínic per a la MPSIIIA consisteix en l'administració intraparenquimàtica de l'AAVrh.10 codificant per a la sulfamidasa i SUMF1 en 6 punts d'injecció repartits entre els dos hemisferis, a dues alçades diferents (NCT02053064 i NCT01474343, clinicaltrials.gov). L'inconvenient principal d'aquesta teràpia és l'arriscada i complicada intervenció quirúrgica altament invasiva a la qual se sotmet el pacient. A part d'això, els resultats d'aquest estudi indiquen que el tractament no demostra una millora evident de la patologia central de la MPSIIIA (Tardieu, 2014), tal com s'ha observat prèviament als estudis clínics de la malaltia de Batten amb el mateix vector viral i a una dosi molt similar (Sondhi, 2012). L'eficàcia d'aquest tractament pot ser limitada a causa de la poca difusió del vector des dels punts d'injecció impeding-ne una àmplia distribució a tot el SNC. Per tant, és necessari la recerca d'una nova aproximació terapèutica per a la MPSIIIA que sigui més eficaç, perdurable i menys invasiva.

La teràpia gènica ha esdevingut una estratègia molt prometedora pel tractament dels pacients amb LSD, com la Síndrome de Sanfilippo A, pel fet que pot permetre una

correcció completa i perllongada de la deficiència enzimàtica causant de la patologia (Sands, 2006). Les avantatges que presenten aquestes malalties amb aquest tipus de teràpia són les següents: (i) malalties monogèniques fàcilment tractables gràcies al subministrament d'una còpia correcta del gen deficient; (ii) correcció creuada, on la transducció d'un nombre reduït de cèl·lules com a font productora i secretora de l'enzim lisosòmic té la capacitat de corregir les cèl·lules veïnes mitjançant la recaptació de l'enzim secretat via el receptor M6P; i (iii) expressió a llarg termini de la proteïna terapèutica després d'una única administració (Parenti, 2013).

D'entre tots els vectors virals més utilitzats en teràpia gènica, els AAVs presenten l'avantatge de no ser patogènics i rarament s'integren al genoma hoste, evitant els riscs associats a la mutagènesi per inserció (Nienhuis, 2013). Existeixen diversos serotips d'AAVs que administrats directament al LCR en diferents models animals resulten en una àmplia distribució del vector viral per tot el SNC (Passini, 2003; Fu, 2010; Fraldi, 2007b; Samaranch, 2013), a excepció de l'administració ICV de l'AAV4 que transdueix únicament els endimòcits (Liu, 2005). Però en concret, el vector viral AAV9 administrat per via sistèmica es caracteritza per ser un dels millors serotips capaços de creuar la BHE i transduir eficientment el SNC (Foust, 2009; Duque, 2009; Yang, 2014); mentre que l'administració de l'AAV9 directa al LCR demostra una àmplia i robusta distribució al SNC, superior a altres serotips analitzats, amb una eficient transducció del fetge per part del vector que drena des del LCR cap a circulació perifèrica (Tesi doctoral A. Ruzo, 2010), tal com també han demostrat posteriorment d'altres estudis (Samaranch, 2012; Bucher, 2014). Així doncs, cal desenvolupar una aproximació terapèutica per a la MPSIIIA que permeti una àmplia distribució de l'enzim lisosòmic deficient pel tractament eficient de l'afectació neurològica, i en segon terme, de la patologia somàtica. Conseqüentment, el nostre laboratori va dissenyar una aproximació de teràpia gènica basada en l'administració intra-LCR del vector viral AAV9 per corregir la patologia central, com també poder arribar al fetge, per tal que aquest esdevingués una font productora i secretora de sulfamidasa pels teixits perifèrics. Actualment, aquest vector, juntament amb nous serotips com l'AAVrh.8 o rh.10, han demostrat ser els millors per a la transducció eficient del SNC (Yang, 2014).

L'administració directa al LCR del vector viral AAV9 codificant la sulfamidasa murina pel tractament de ratolins MPSIIIA va provocar un augment de l'activitat de l'enzim deficient tant al cervell, com al fetge i al sèrum. Tot i que d'altres

aproximacions terapèutiques amb diferents serotips d'AAV també han detectat vectors virals a teixits perifèrics (Ciron, 2009; Colle, 2010), el nostre estudi va mostrar que la quantitat de vector que va passar cap a la circulació perifèrica després de l'administració directa al LCR va ser suficient per permetre la correcció de l'afectació somàtica de la MPSIIIA. Així, una única administració intra-LCR del vector viral AAV9 a una dosi de 5×10^{10} vg/ratolí va permetre la correcció de la patologia neurològica i perifèrica, tant a curt com a llarg termini, evidenciat per: (i) la reducció de l'acumulació de GAGs a cervell i teixits perifèrics; (ii) reducció de la distensió lisosòmica a cervell i teixits perifèrics; i (iii) reducció/normalització de la neuroinflamació al SNC. La correcció histopatològica de la malaltia es va traduir en una reversió dels dèficits de comportament característics de la MPSIIIA i una prolongació de la supervivència dels ratolins MPSIIIA tractats fins a arribar a nivells similars als dels controls sans. A llarg termini, els nivells d'activitats sulfamidasa assolits al SNC es van mantenir estables, fet que també va permetre el manteniment de la correcció de la patologia neurològica i somàtica. De fet, l'expressió a llarg termini per part dels vectors AAV també s'ha observat a gossos amb hemofília B després de la transferència gènica directa al feto de l'AAV2 codificant pel gen del Factor IX (Niemeyer, 2009). Després de 8 anys, els gossos no han presentat cap toxicitat envers al tractament, ni han patit cap hemorràgia gràcies a l'eficàcia dels valors estables de Factor IX, d'entre el 4-10% (Niemeyer, 2009). Fins i tot, a un pacient tractat amb teràpia gènica intramuscular amb el Factor IX, el qual presentava valors subterapèutics (<1%), s'ha detectat l'expressió del transgèn 10 anys després del tractament (Buchlis, 2012).

En canvi, l'anàlisi a llarg termini dels ratolins MPSIIIA després d'una administració intracisternal de l'AAV9-mSgsh van mostrar una disminució dels nivells d'activitat sulfamidasa a fetge i sèrum, fins a valors propers al 48% en mascles i 5-8% en femelles. Tot i que l'expressió del transgèn no es va mantenir estable al llarg del temps, aquests valors van ser suficients per contrarestar la patologia somàtica a llarg termini (12-14 mesos edat), edat a la qual els ratolins afectats van començar a morir. L'ERT amb una dosi baixa de glucuronidasa recombinant en ratolins models de la MPSVII provoca la correcció de l'acumulació de GAGs amb valors d'activitat a fetge propers al 5% (Donsante, 2007). A més, pacients amb activitat sulfamidasa propera o superior al 3% poden presentar fenotips més atenuats de la malaltia (Meyer, 2008; Muschol, 2011). Per tant, encara que els valors circulants de sulfamidasa a llarg termini

van ser molt baixos en femelles, es va contrarestar la patologia de la majoria de teixits somàtics amb una correcció més moderada a aquells òrgans més refractaris al tractament, com el ronyó o el pulmó, fet que també s'ha observat en d'altres estudis (Donsate, 2007; McCarty, 2009; Garcia, 2007). Així doncs, una única administració de l'AAV9, que a més permet la correcció de la patologia de la MPSIIIA a llarg termini, és més apropiada que les repetitives infusions que han de rebre els pacients tractats amb l'enzim recombinant.

L'administració sistèmica del vector viral AAV9 pel tractament de diverses malalties amb afectació neurològica també ha estat estudiat àmpliament (Ruzo, 2012b; Fu, 2011; Foust, 2010). Aquesta aproximació terapèutica presenta determinades limitacions respecte l'administració directa al LCR. En primer lloc, són necessàries dosis molt elevades de vector per aconseguir una correcció total de la patologia (Ruzo, 2012b; Fu, 2011). En segon lloc, la capacitat de transducció dels vectors AAVs es pot bloquejar per la presència d'anticossos neutralitzants anti-AAV en sèrum (Manno, 2006; Jiang, 2006; Scallan, 2006), els quals són molt freqüents en la població humana (Boutin, 2010). En últim terme, altes dosis de vector per via sistèmica poden provocar una resposta immunitària de cèl·lules T CD8⁺ citotòxiques contra la càpsida del vector viral (Manno, 2006; Nathwani, 2011; Mingozzi, 2007a). Per tant, l'administració directa al LCR del vector viral permetria superar aquestes dificultats biològiques gràcies a la reducció de la dosi terapèutica, la limitada exposició del vector als NAbs anti-AAV, i l'eficàcia terapèutica amb una dosi que no generi una resposta citotòxica de cèl·lules T.

Un detall remarcable del nostre estudi és haver testat el tractament intra-LCR AAV9-mSgsh en ambdós sexes. Tot i que els nivells d'activitat sulfamidasa al SNC i la conseqüent correcció de la patologia assolida a llarg termini va ser similar, les femelles van presentar uns nivells d'expressió a fetge molt més baixos. Aquest fenomen ja s'ha documentat prèviament en diversos estudis amb ratolins utilitzant els serotips d'AAV tipus 1, 2, 5, 6, 8 i 9 (Ruzo, 2012a; Ruzo, 2012b; Davidoff, 2003; Pañeda, 2009). Les diferències de transducció del fetge entre ambdós sexes és independent de la soca i el promotor utilitzat (Ruzo, 2012a; Ruzo, 2012b; Davidoff, 2003; Pañeda, 2009), no afecta a la transducció de teixits no hepàtics (Ruzo, 2012b; Davidoff, 2003) i sembla ser causat pels andrògens presents a les femelles (Davidoff, 2003). Ara bé, l'eficiència de la transferència gènica en ambdós sexes de primats no humans resulta en els mateixos nivells d'expressió del gen terapèutic després de l'administració intravenosa de l'AAV

(Binny, 2012). Aquests resultats en primats no humans emfatitzen la importància del model animal escollit per a la realització dels estudis preclínic d'eficàcia terapèutica. No obstant això, l'estudi de femelles de la majoria de model animals per les LSD, tractades amb teràpia gènica basada en AAV, és important per tal de veure la possible influència del sexe en la correcció de la patologia.

Un punt crític de la teràpia és l'extrapolació de la dosi terapèutica des dels ratolins cap a humans. En primer lloc, per tal de realitzar els estudis preclínic en un model animal amb una mida de cervell clínicament rellevant com els gossos, es va escalar la dosi de vector viral segons el pes corporal, obtenint una dosi de 2×10^{13} vg/gos. En humans, el pes corporal durant la infància-adolescència augmenta constantment a causa del creixement. De fet, si es té en compte que els pacients de la MPSIIIA afectats es diagnostiquen entre els 3-5 anys (Delgadillo, 2013; Héron, 2011; Valstar, 2010a; Malm, 2010; Meyer, 2007) i presenten una supervivència mediana de 15 anys (Meyer, 2007; Delgadillo, 2013; Malm, 2010; Héron, 2011), podrien pesar aproximadament entre 15-50 kg. Per tant, la dosi necessària pel tractament seria d'entre 3×10^{13} a 1×10^{14} vg/totals. A causa de l'elevada variabilitat entre les dosis, els pacients de menor edat podrien rebre una dosi 10 vegades inferior al SNC, fet que podria resultar en una disminució de l'eficàcia terapèutica. Així doncs, l'extrapolació de la dosi terapèutica de ratolins cap a humans es durà a terme per volum de cervell (1.4×10^{14} vg), òrgan diana de la teràpia. Com que la mida del cervell de nens i nenes s'estabilitza als 2 anys de vida i no presenta diferències entre els dos sexes (Brain Development Cooperative Group, 2012), aquesta aproximació de càlcul de dosi permetria utilitzar una única dosi independentment del pes corporal o sexe del pacient. La dosi total utilitzada en ratolins és, en termes de dosi total, més elevada que les dosis testades en alguns assajos clínics pel tractament de malalties neurodegeneratives, tant en la població pediàtrica com l'adult (Leone, 2012; Worgall, 2008; Christine, 2009; Kaplitt, 2007; Marks, 2010). Tot i això, assumint que el cervell és l'únic òrgan diana del tractament amb un volum mitjà de 1260 ml (Brain Development Cooperative Group, 2012), la dosi clínica proposada del nostre estudi és de $1,1 \times 10^{11}$ vg/ml òrgan per tots els pacients. Aquest valor està lleugerament sobreestimat pel fet que no té en compte el volum d'altres regions del SNC o òrgans somàtics que també es transduiran per part del vector viral, com per exemple, la medul·la espinal, els ganglis de les arrels dorsals, i el fetge. L'anàlisi de la correlació entre la dosi total administrada i el volum de l'òrgan diana a d'altres assaigs clínics amb

eficàcia terapèutica demostrada i un registre de seguretat excel·lent, demostra que la dosi clínica proposada en aquest estudi no està fora del rang de dosis utilitzades en humans. Per exemple, un assaig clínic aleatori a doble-cec en pacients de Parkinson, el qual presenta eficàcia terapèutica, es va administrar una dosi de vector AAV2 codificant per l'àcid glutàmic descarboxilasa de $3,5 \times 10^{10}$ vg a cada nucli subtalàmic (Kaplitt, 2007; LeWitt, 2011). Aquesta regió té un volum de $0,13 \pm 0,01$ ml (Colpan, 2010), per tant, la dosi usada en aquest assaig extrapolada per volum d'òrgan és de $2,7 \times 10^{11}$ vg/ml, aproximadament el doble de la dosi clínica proposada pel nostre estudi. De manera similar, un estudi clínic de l'amaurosi congènita de Leber, on es va administrar $1,5 \times 10^{11}$ vg del vector a l'espai subretinal (Maguire, 2009), van utilitzar una dosi de $2,3 \times 10^{10}$ vg/ml d'òrgan, considerant que l'ull humà adult té un volum de 6,5 ml (Hermann, 2009). El nou estudi dosis-resposta de la nostra aproximació terapèutica va revelar que la dosi clínica es podria reduir aproximadament a la meitat, $5,09 \times 10^{10}$ vg/ml, obtenint la mateixa eficàcia terapèutica. D'aquesta manera, el rang de dosis possible de la nostra aproximació terapèutica ($5,09 \times 10^{10} - 1,1 \times 10^{11}$ vg/ml) estaria a dins del que, actualment, ha demostrat seguretat i eficàcia terapèutica en humans ($2,3 \times 10^{10} - 2,7 \times 10^{11}$ vg/ml). Un dels punts positius de la teràpia proposada en aquest treball és el confinament de la majoria de vector viral a dins del SNC, òrgan immune privilegiat, fet que pot ser favorable pel que fa al desenvolupament de respostes immunitàries no desitjades (Galea, 2007). En últim terme, els estudis en pacients permetran saber si la nostra aproximació de teràpia gènica basada en AAV és realment eficaç i segura.

La majoria de pacients amb MPSs presenten una gran heterogeneïtat clínica que en complica el seu diagnòstic precoç. Per aquest motiu, durant l'aparició dels primers signes i símptomes ja poden haver succeït danys importants a diversos teixits, que en alguns casos poden ser irreversibles (Muenzer, 2011c). Així doncs, el moment de l'administració del tractament és crucial per aconseguir contrarestar tots els danys causats per la malaltia per tal de tractar eficaçment els pacients. La nostra aproximació de teràpia gènica es va administrar a ratolins afectats per la MPSIIIA de 2 mesos d'edat, és a dir, quan la patologia ja està establerta mostrant una clara acumulació de GAGs i una evident distensió lisosòmica a fetge i a cervell, on també s'ha detectat presència de neuroinflamació (Ruzo, 2012a; Ruzo, 2012b; Crawley, 2006; Gliddon, 2004). A més, no només la patologia a nivell tissular ja és present a 2 mesos, sinó que també s'observa una alteració del comportament amb el test de l'OF (Hemsley, 2005; Lau, 2008). El

tractament dels ratolins MPSIIIA a aquesta edat va permetre una correcció de la patologia neurològica i perifèrica amb una normalització dels dèficits de comportament que va resultar en una prolongació de la supervivència. Així doncs, la nostra aproximació terapèutica va ser capaç de revertir la patologia central i perifèrica de la MPSIIIA, tal com s'ha observat en d'altres LSDs com la leucodistrofia metacromàtica (Biffi, 2006). En canvi, l'ERT a ratolins de 6 setmanes d'edat no permet una reversió completa de la neuropatologia de la MPSIIIA (Hemsley, 2005); sinó que únicament s'observa en aquells ratolins tractats des del moment del naixement, quan la BHE no és madura i permet el pas de l'enzim recombinant lliurement cap al SNC (Gliddon, 2004).

A partir d'aquí, es va voler avaluar el punt de no retorn de la malaltia, on el dany neuronal causat pels signes clínics ja era totalment irreversible. Per aquest motiu, es van tractar animals de 6 mesos d'edat, en una fase més tardana de la MPSIIIA amb greus dèficits de comportament. L'anàlisi d'aquests ratolins a 10 mesos, quan alguns animals afectats van començar a morir, va revelar una reducció de tots els paràmetres histopatològics fins a uns nivells indistingibles als d'un ratolí sa. Ara bé, seria necessari l'avaluació del comportament per demostrar que l'eliminació dels dipòsits d'acumulació als lisosomes a edats més avançades també provoca una millora funcional, o bé ja s'hauria arribat al punt de no retorn on el dany neuronal ja seria irreversible. En general, les malalties genètiques rares presenten una gran variabilitat clínica, i l'evolució de la patologia és molt diferent a cada pacient afectat (Muenzer, 2011c). A la MPSIIIA, la pèrdua de les funcions cognitives i motores succeeix a finals de la primera dècada de vida i a principis de l'adolescència, respectivament (Valstar, 2010a; Meyer, 2007; Malm, 2010). Per tant, si es considerés que el punt de no retorn és la pèrdua d'aquestes funcions als infants afectats, el ventall pel tractament de la MPSIIIA és bastant ampli, aproximadament des del moment del diagnòstic (3-5 anys) fins al voltant dels 10 anys de vida. Ara bé, si també es demostrés la millora dels dèficits de comportament del model animal de la MPSIIIA tractat a 6 mesos d'edat, indicaria que la teràpia seria capaç de revertir fases molt avançades de la malaltia on el dany al SNC és més greu.

Per a la translació a la clínica de la nostra aproximació de teràpia gènica era necessari testar l'eficàcia i seguretat en un model animal gran amb una mida de cervell clínicament rellevant. En primer lloc, es va demostrar que l'administració intra-LCR de l'AAV9 a gossos permetia una àmplia distribució del vector amb la detecció de genomes virals a regions tant properes com distals al punt d'injecció, independentment

de la velocitat d'infusió. El número de còpies del vector va variar des de 0,03 a 16,43 genomes virals per cèl·lula, amb un valor mitjà proper a 3,35, evidenciant un patró de distribució molt homogeni a tot el SNC. En canvi, l'administració directa del vector AAVrh.10 al parènquima cerebral pel tractament de la LINCL provoca una distribució més limitada del vector transduint únicament el 32% del volum del cervell de primats no humans (Sondhi, 2012). L'AAVrh.10 i l'AAV9 administrats directament al cervell presenten un perfil de transducció similar amb una distribució limitada en diverses espècies animals com els ratolins, les rates i els gossos (Cearley, 2006; Klein, 2008; Swain, 2014). Per tant, l'àmplia distribució de l'AAV9 al SNC és possible, principalment, gràcies a la ruta d'administració escollida. En segon lloc, es va detectar que una part del vector viral es va escapar cap al torrent circulatori perifèric transduint entre un 3-5% dels hepatòcits dels gossos, tal com s'ha observat en primats no humans (Gray, 2013). Per últim, l'administració intracisternal de l'AAV9 va resultar en la transducció de neurones i astròcits a diverses regions del SNC de gossos, tal com s'ha documentat en primats no humans (Samaranch, 2012; Samaranch, 2013). A més a més, un estudi recent ha revelat que l'administració intracisternal de l'AAV9 en gats joves permet la transducció eficient de neurones, astròcits, i fins i tot, oligodendròcits (Bucher, 2014). Per tant, l'àmplia distribució de l'AAV9 a diverses regions del SNC i el fetge després de l'administració directa al LCR, juntament amb una transducció eficient de diversos tipus cel·lulars del SNC, pot facilitar la correcció general de la patologia.

L'avaluació de la transferència del transgèn terapèutic (sulfamidasa humana) per via intracisternal mitjançant el vector viral AAV9 va evidenciar un increment destacat dels nivells d'activitat sulfamidasa al LCR. Seguidament, els valors assolits van disminuir ràpidament a causa del que podria ser una resposta immunitària específica al transgèn, explicable per les diferències entre la seqüència proteica de la sulfamidasa humana administrada i la canina, pròpia de l'animal. En macaco rhesus també s'han observat aquests tipus de resposta immunitària després de la transferència al fetge del Factor IX humà mitjançant AAV (Mingozzi, 2007b; Nathwani, 2006), com també succeeix en gossos afectats per la MPSI i MPSIIIB tractats amb el transgèn humà (Ciron, 2006; Ellinwood, 2011). Ara bé, en el context de l'hemofilia B, la resposta immunitària específica del transgèn observada en primats no humans (Mingozzi, 2007b; Nathwani, 2006) no va permetre predir els resultats obtinguts en humans, ja que no es va observar cap immunitat humoral o cel·lular contra el transgèn humà del Factor IX,

fins i tot en aquells pacients amb mutacions nul (Manno, 2006; Nathwani, 2011). En el cas concret de la MPSIIIA, l'estudi més extens de pacients realitzat a dia d'avui ha revelat que el 90% de les mutacions són sense sentit, però el 98% dels pacients afectats presenten com a mínim un al·lel amb aquest tipus de mutació (Valstar, 2010a). Per tant, és molt possible que els pacients que portin mutacions sense sentit tinguin un cert grau tolerància a la proteïna, i no desenvolupin una resposta immunitària contra el transgèn terapèutic. Per tal de confirmar que la pèrdua de l'expressió de la sulfamidasa humana era a causa del transgèn no específic d'espècie, es va testar l'administració intra-LCR del vector AAV9 amb el transgèn específic d'espècie en gossos. Aleshores, la sulfamidasa al LCR va incrementar, amb un patró similar al prèviament observat amb els gossos injectats amb la sulfamidasa humana, però sense observar una caiguda dels valors a causa d'una inflamació al CNS. Així doncs, després d'una única administració intra-LCR de l'AAV9, quan s'utilitza el transgèn específic d'espècie, es va aconseguir l'expressió estable de la sulfamidasa a llarg termini (>16 mesos). Aquests resultats van evidenciar que era important l'elecció adequada del transgèn durant els estudis preclínic per no subestimar els resultats d'una possible teràpia. A més, els estudis de l'ERT amb el model animal murí i caní per a la MPSIIIA demostren que l'administració de la sulfamidasa directa al LCR és essencial per la millora de la neuropatologia (Hemsley, 2008; Hemsley, 2009a; Hemsley, 2009b; Crawley, 2011). Així doncs, l'increment de sulfamidasa activa al LCR, tenint en compte que el LCR banya tot el SNC, és necessari per contrarestar l'afectació neurològica de la MPSIIIA.

La nostra aproximació terapèutica va maximitzar la correcció de la malaltia corregint-ne el principal òrgan diana (cervell), però a més a més també va ser capaç de millorar la patologia somàtica transduint un percentatge d'hepatòcits que produïen la sulfamidasa activa circulant. L'eficàcia de la teràpia s'havia demostrat en ratolins MPSIIIA, mentre que en gossos es va confirmar l'àmplia distribució del transgèn després de l'administració intracisternal. Aquesta via d'administració s'utilitza de forma rutinària en la pràctica veterinària; però en humans, aquesta tècnica és molt arriscada per la mida reduïda de la cisterna magna i la seva proximitat a centres vitals. Així doncs, per a la translació segura del tractament a humans sense la pèrdua d'eficàcia terapèutica, era necessari explorar noves rutes per administrar els vectors directament al LCR. Una possible alternativa era l'administració intracerebroventricular, on el vector es va dipositar als ventricles laterals, que és un espai relativament gran i de fàcil accés a

través de la perforació d'una regió muda del parènquima cerebral, reduint al mínim el risc associat a la tècnica (Piatt, 1991). A més, aquesta ruta d'accés al LCR és una tècnica terapèutica i de diagnòstic usada freqüentment pels neurocirurgians, amb més de 40.000 procediments a l'any a Estats Units (American Association of Neurological Surgeons). Ambdues rutes, intracerebroventricular i intracisternal, van aconseguir un patró de distribució del vector similar tot transduint eficientment el SNC, SNP i alguns teixits somàtics, on també es va detectar l'expressió del transgèn. Els genomes virals es van detectar tant a les regions més rostrals, com el còrtex frontal, fins a les regions més caudals, com la medulla espinal. El patró de distribució del vector viral suggeria que la seva penetració al SNC des de les àrees més superficials fins a les àrees més profundes ve determinat per la circulació/flux del LCR (Brodbeck, 2007). Per tant, els avantatges que presenta l'administració ICV són els següents: (i) tècnica freqüentment utilitzada amb un ampli registre de seguretat i efectes adversos ben documentats; (ii) simplifica el procés de translació clínica, ja que tots els neurocirurgians a nivell mundial coneixen la tècnica i no requereix un entrenament específic per a l'assaig clínic; i (iii) el vector s'administra al LCR, enlloc del parènquima cerebral, on es pot usar un volum gran durant un període de temps relativament curt, reduint el temps de neurocirurgia i incrementant la flexibilitat de la formulació i concentració del vector. El gran inconvenient de l'administració intraparenquimàtica testada actualment en pacients és posar a punt una nova tècnica quirúrgica que implica el disseny d'un aparell específic per a la transferència del vector per tal de realitzar-la durant un temps adequat sense causar dany al teixit cerebral (Worgall; 2008; Souweidane, 2010; Leone, 2012; Tardieu, 2014).

Una altra ruta alternativa per administrar el vector directament al LCR podria ser la punció lumbar, que és una tècnica usada habitualment en pacients però presenta una limitada distribució dels productes terapèutics cap a l'encèfal. Els estudis en porcs van demostrar que l'administració lumbar local de l'AAV9 resultava en l'expressió gènica a les àrees properes al punt d'injecció; mentre que l'àmplia dispersió del vector viral només es va aconseguir després de diverses administracions del vector a les regions cervicals, toràciques i lumbars, suggerint que la transducció per part del vector succeeix principalment al voltant del catèter (Federici, 2012). En macacos cinomolgus, es va demostrar la transducció global del SNC després de l'administració intratecal de l'AAV a primats no humans de mida petita (~3-7 Kg) utilitzant un AAV *self-complementary*

diluït en una solució hiperosmòtica (Gray, 2013). Tot i que l'aproximació anterior és viable, són necessaris nous estudis en models animals més grans per tal de confirmar els resultats anteriors. Estudis en ratolins van demostrar uns resultats contradictoris sobre la distribució del vector després de la punció lumbar. Mentre que un d'ells va aconseguir la dispersió del vector per tot el SNC (Gray, 2013), l'altre només van detectar el transgèn a la regió lumbar amb algun axó positiu a la medul·la espinal cervical i limitades àrees del cervell (Snyder, 2011). Aquests resultats tan oposats podrien explicar-se com a conseqüència de les diferències en les formulacions dels vectors, els títols de vectors, els volums administrats o la velocitat d'injecció. En humans, s'ha observat que la punció lumbar d'aminoglicosides provoca la detecció d'altres concentracions a la regió lumbar, però baixes concentracions al LCR ventricular; mentre que l'administració directa al LCR pels ventricles laterals resulta en elevades concentracions tant al LCR del ventricle com al de la regió lumbar (Cook, 2009). Aquestes dades suggereixen que el flux unidireccional del LCR des dels ventricles cap a la medul·la espinal dificultaria l'àmplia distribució del vector administrat mitjançant una punció lumbar, tot i que són necessaris més estudis en models animals petits i grans per confirmar aquests resultats. Per tant, l'administració ICV de l'AAV9 és una bona ruta d'elecció a causa dels nostres resultats que van demostrar una àmplia distribució del vector a tot el SNC i SNP, i fins i tot a alguns teixits perifèrics com el fetge, gràcies al flux natural del LCR.

Els AAV wild-type són uns virus no patogènics molt comuns que causen infeccions asimptomàtiques als humans. Així doncs, la principal limitació de la teràpia gènica amb AAVs recombinants és que la majoria de la població ha estat exposada als virus wild-type i han generat respostes immunitàries humoral contra l'AAV que poden limitar l'eficàcia de la transducció del vector (Boutin, 2010). La presència de títols d'anticossos molt baixos (1:5 o 1:10) és capaç de bloquejar la transferència gènica *in vivo* després d'una administració sistèmica d'AAVs en ratolins, gats i primats no humans (*macaco rhesus*) (Manno, 2006; Scallan, 2006; Ferla, 2013). En humans, la prevalença i magnitud de la seropositivitat dels individus varia molt segons el tipus d'AAV (Boutin, 2010). Mentre que el 59 % de població adulta presenta anticossos neutralitzants contra l'AAV2 principalment a títols alts (>1:400), només un 33.5 % dels individus tenen anticossos anti-AAV9 detectables, i bàsicament a títols baixos (>1:20) (Boutin, 2010). Independentment del serotip, hi ha una seroconversió amb l'edat on els NAbs anti-AAV

augmenten progressivament durant la infància i l'adolescència persistint al llarg del temps (Calcedo, 2011; Li, 2012). El nostre estudi d'un petit grup d'infants sans i afectats per la MPSIIIA va revelar les mateixes tendències anteriors: (i) l'AAV2 va presentar uns títols de NAbs més elevats que l'AAV9, i (ii) els títols de NAbs van augmentar amb l'edat, on la majoria de nens menors de 6 anys van ser seronegatius. Com que l'òrgan diana de la nostra teràpia és el SNC, també es van mesurar els NAbs a les mostres de LCR dels mateixos individus. Els resultats van revelar que els títols van ser més baixos, o fins i tot indetectables, en comparació amb els valors obtinguts en sèrum independentment del serotip analitzat. A més, tots els gossos injectats amb el vector viral AAV9 per via IC o ICV també van presentar uns títols de NAbs molt més alts a sèrum respecte al LCR, fenomen que també s'ha observat recentment en gats i primats no humans (Gray, 2013; Bucher, 2014). Per tant, aquestes dades demostren la distribució asimètrica de les immunoglobulines a través de la BHE dels individus sans i afectats per la MPSIIIA després de la seva exposició al vector viral. A més, la distribució asimètrica dels NAbs en infants afectats indicaria que la BHE és capaç de mantenir la majoria d'immunoglobulines fora del SNC, o fins i tot, podria ser que la BHE no està alterada a causa de la malaltia, com suggereix algun estudi recent en un pacient de la MPSIIIA (Garbuzova-Davis, 2013).

Finalment, gossos Beagle sans es van preimmunitzar mitjançant una administració d'AAV9 no codificant per dissenyar un model animal on es pogués explorar l'impacte de la immunitat humoral preexistent. Un mes després de la immunització, els gossos van presentar uns títols de NAbs a sèrum de 1:100-1:1000, mentre que els nivells al LCR van ser de 1:1-1:3. El model generat va evidenciar la mateixa distribució asimètrica dels anticossos neutralitzants presents en humans. En canvi, els títols de NAbs assolits a sèrum van ser molt més elevats que els de la majoria de la població humana (Boutin, 2010). D'aquesta manera, es va testar l'efecte de la immunitat humoral preexistent en el pitjor escenari possible. Després de la immunització, els gossos van rebre una administració directa al LCR del vector AAV9 que va provocar un dràstic augment dels títols a sèrum, mentre que els títols de NAbs al LCR es van mantenir baixos. L'anàlisi de la distribució del vector i l'expressió del transgèn van revelar una transducció del 70-95 % del SNC i SNP, mentre que l'expressió a nivell perifèric va ser totalment bloquejada pels NAbs anti-AAV de sèrum. A més, aquests resultats es van confirmar, posteriorment, amb un altre estudi on els títols baixos de NAbs en primats no

humans no causen un efecte inhibitori en la transferència gènica al SNC (Gray, 2013). Ambdós resultats van contrastar amb un estudi prèviament publicat en primats no humans on la transducció es bloquejava per títols IgG totals $>1:200$ en sèrum (Samaranch, 2012). Tot i això, els nostres resultats van demostrar que l'administració intra-LCR de l'AAV9 era possible en presència d'immunitat humoral preexistent. Aleshores, els títols baixos de NAbs al LCR en la població pediàtrica, juntament amb els resultats del nostre estudi, evidencien la possibilitat de tractament de la majoria de pacients MPSIIIA. D'aquesta manera, la nostra teràpia permetria la correcció de la patologia neurològica i somàtica causada per la MPSIIIA en pacients seronegatius, com també la patologia neurològica en els seropositius per l'AAV9. Aquests últims es podrien tractar amb una teràpia combinada: per una banda, l'administració directa al LCR de l'AAV9 codificant per la Sgsh pel tractament de la patologia neurològica; i per l'altra, l'ERT per via sistèmica pel tractament de la patologia somàtica.

En resum, en el nostre estudi la transferència directa al LCR del vector AAV9 va provocar una reversió de la patologia central i perifèrica a ratolins afectats per la MPSIIIA que va liderar una correcció dels dèficits de comportament i una supervivència més extensa. L'expressió a llarg termini del gen terapèutic va ser fonamental per aconseguir la correcció completa de l'acumulació patològica de GAGs. A més, en estadis més avançats de la malaltia també es va assolir la millora de la patologia lisosòmica del SNC i teixits perifèrics juntament amb una reducció de la neuroinflamació. La translació d'aquests resultats a models animals grans va revelar: (i) una àmplia distribució del vector al SNC, SNP, i fetge; (ii) una expressió robusta a llarg termini del transgèn específic d'espècie, que se secretava al LCR; i (iii) el mateix patró de transducció de l'AAV9 amb l'administració IC o la tècnica usada comunament en la neurocirurgia pediàtrica, administració ICV. A més, la immunitat preexistent a títols baixos al LCR va permetre una eficient transducció del SNC i SNP, però no als teixits somàtics a causa dels alts títols a sèrum. Per tant, aquesta teràpia maximitza la distribució del producte terapèutic minimitzant-ne els risc associats a l'administració, i permet la correcció de la patologia central i somàtica, i aquest última passa a ser un punt important del tractament a causa de la prolongació de la supervivència dels pacients. D'aquesta manera, els nostres resultats donen suport a la translació d'aquesta aproximació de teràpia gènica pel tractament de la patologia de la MPSIIIA, com també d'altres LSD amb afectació, principalment, neurològica.

VI. CONCLUSIONS

1. L'administració intra-LCR del vector viral AAV9 codificant per la sulfamidasa murina (5×10^{10} vg/ratolí) va permetre la correcció tant de la patologia central com perifèrica dels ratolins MPSIIIA tractats a dos mesos d'edat. A més, la teràpia també va corregir els dèficits en el comportament i va perllongar la supervivència dels ratolins tractats.
2. A llarg termini (>1 any), una única administració intra-LCR va demostrar eficàcia terapèutica mantenint la correcció de la patologia neurològica i somàtica, i també la millora dels dèficits de comportament.
3. Es va identificar la dosi de $2,32 \times 10^{10}$ vg/ratolí de l'AAV9-mSgsh com la dosi més baixa amb els mateixos nivells d'eficàcia terapèutica demostrats amb el tractament a una dosi de 5×10^{10} vg/ratolí.
4. El tractament de ratolins MPSIIIA a estadis més avançats de la malaltia (6 mesos d'edat) amb la nova aproximació terapèutica també va permetre la reversió de la patologia a nivell central i perifèric.
5. El vector viral AAV9-GFP administrat directament al LCR de gossos Beagle adults va resultar en una àmplia distribució a tot el SNC i SNP, com també en la transducció eficient del fetge.
6. L'administració intra-LCR de l'AAV9 codificant pel gen caní de la sulfamidasa va resultar en la producció a llarg termini d'alts nivells de sulfamidasa activa al LCR.
7. L'administració intracerebroventricular, tècnica utilitzada habitualment en la pràctica pediàtrica, per la transferència del vector directament al LCR va presentar el mateix patró de distribució de l'AAV9 que la ruta intracisterna, ja que va resultar en l'expressió del transgèn al SNC, SNP i a teixits perifèrics, especialment el fetge.

8. L'estudi dels anticossos neutralitzants contra la càpsida del vector AAV9 va demostrar una distribució asimètrica a través de la barrera hematoencefàlica, tant als individus sans com en pacients de MPSIIIA. Aquest patró de distribució també es va detectar als gossos injectats amb el vector viral AAV9.
9. La immunitat humoral anti-AAV9 va disminuir molt lleugerament l'eficient transducció del SNC i SNP després de l'administració de l'AAV9 directament al LCR, però va bloquejar completament la transducció dels teixits perifèrics, com a conseqüència dels elevats nivells d'anticossos neutralitzants a sèrum.
10. En resum, tots aquests resultats constitueixen la base preclínica per a la translació cap a la clínica de l'administració al líquid cefaloraquídi d'AAV9-sulfamidasa com a tractament per a la MPSIIIA.

VI. MATERIALS I MÈTODES

1. MATERIALS

1.1. Animals

Els ratolins C57Bl/6 amb una mutació puntual al gen de la sulfamidasa, com a model animal del síndrome de Sanfilippo A, es van comprar a The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, EE.UU.). La colònia es va establir a l'estabulari lliure de patògens específics del SER-CBATEG, i es va amplificar a partir de fundadors heterozigots per tal d'obtenir ratolins sans i afectats per a la MPSIIIA necessaris pels procediments experimentals. Els animals es van alimentar *ad libitum* amb aigua i una dieta estàndard (Teklad Global Diets 2018 S; Harlan Laboratories, Indianapolis, IN, EE.UU.), i es van mantenir sota condicions controlades de temperatura i llum (cicles de llum-obscuritat de 12h). La genotipificació dels ratolins es va dur a terme amb la reacció en cadena de la polimerasa (o *polymerase chain reaction*, PCR) seguida d'una digestió amb l'enzim de restricció MspAII, mètode prèviament descrit per Bhattacharyya *et al.* (Bhattacharyya, 2001).

Els gossos mascles adults sans de raça Beagle es van adquirir a Isoquimen (Sant Miquel de Codines, Barcelona, Espanya) i a Marshall BioResources (North Rose, NY, EE.UU.). Els animals es van estabular a les gosseres del Servei de Granges i Camps Experimentals de la UAB. Els animals van tenir accés a aigua *ad libitum*, i es van alimentar una vegada al dia de forma individualitzada amb 30 g de pinso estàndard per Kg de pes corporal (Elite Nutrition o Purina Proplan, Nestlé; Castellbisbal, Barcelona, Espanya). L'estat de salut dels animals es va controlar periòdicament mitjançant exàmens clínics, hematològics i bioquímics.

Tots els procediments experimentals van ser aprovats pel Comitè d'Ètica d'Experimentació Animal i Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

1.2. Soques bacterianes

Per tal d'obtenir els constructes plasmídics usats a tots els procediments experimentals, es va utilitzar la soca bacteriana d'*E. Coli XL2blue* (Stratagene). Tots els plasmidis contenen el gen de la resistència a l'ampicil·lina, el qual va permetre

seleccionar-los en el cultiu bacterià de medi LB (Miller's LB Broth; Laboratorios Conda) amb 50 µg/ml d'ampicil·lina (Sigma-Aldrich). Quan les cèl·lules es van fer créixer en medi sòlid, es va afegir 2% d'agar al medi LB.

1.3. Anticossos

Tots els anticossos utilitzats en la tècnica d'immunohistoquímica estan descrits a la taula següent:

Anticòs	Hoste	Proveïdor	Codi
Anticossos primaris			
Anti-LAMP1	Rata	Santa Cruz Biotechnology	SC-19992
Anti-LIMP2	Conill	Novus Biologicals	NB400-129
Anti-GFAP	Conill	Dako Cytomation	Z0334
Anti-GFP	Cabra	Abcam	Ab6673
Anti-GFP	Pollastre	Abcam	Ab13970
Anti-NeuN	Ratolí	Millipore	MAB377
Anti-IBA1	Cabra	Abcam	Ab5076
Anti-MAC2	Rata	Cedarlane	CL8942AP
BSI-B4 (Isolectina B4)	-	Sigma-Aldrich	L5391
Anticossos secundaris			
Anti-rata IgG conjugat amb biotina	Rata	Dako Cytomation	E0467
Anti-cabra IgG conjugat amb biotina	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	SC2042
Anti-conill IgG conjugat amb biotina	Conill	Pierce	31820
Estreptavidina, Alexa Fluor® 488 conjugat amb biotina	-	Molecular Probes	S-11223
Estreptavidina, Alexa Fluor® 568 conjugat amb biotina	-	Molecular Probes	S-11226

1.4. Plasmidis

Els plasmidis utilitzats en aquest treball estan descrits a la taula següent:

Nom	Promotor	Gen d'interès	Optimització seqüència gènica	WPRE	PolyA
pAAV-CAG-GFP-WPRE	CAG	GFP	No	Si	β -globina de conill
pAAV-CAG-Nul	CAG	-	-	No	β -globina de conill
pAAV-CAG-mSgsh	CAG	Sulfamidasa murina	No	No	β -globina de conill
pAAV-CAG-cSgsh	CAG	Sulfamidasa canina	Si	No	β -globina de conill
pAAV-CAG-hSgsh	CAG	Sulfamidasa humana	Si	No	β -globina de conill

El promotor CAG és un promotor híbrid format pel potenciador intermedi/temprà del citomegalovirus humà (o *human citomegalovirus*, CMV), el promotor de la β -actina i el primer intró del gen de la β -globina humana, que s'expressa de forma ubicua i robusta. El WPRE és una seqüència hepadnavirus que ha estat usada àmpliament com a element regulador actuant en cis. Quan el WPRE es troba a la regió 3' no traduïble del mRNA, potencia l'expressió del transgèn incrementant els nivells de mRNA nuclears i citoplasmàtics (Zanta-Boussif, 2009). El plasmidi pAAV-CAG-Nul no conté cap gen, i es va utilitzar per generar el vector viral Nul, com a control de la tècnica d'administració IC. L'optimització del gen de la sulfamidasa canina i humana va consistir en optimitzar l'ús de codó i la seqüència de nucleòtids específicament per cada espècie amb la finalitat d'incrementar la traducció proteica.

Les estratègies utilitzades per construir els plasmidis estan resumides a la taula següent:

Nom	Origen dels fragments
pAAV CAG GFP WPRE	CBATEG
pAAV CAG MCS	CBATEG
pAAV CAG mSgsh	CBATEG
pAAV CAG cSgsh	Vector: pAAV CAG (CBATEG) digerit amb MluI i EcoRI
	Insert: 1073371 dSgsh HindIII pMA-RQ (GeneArt) digerit amb MluI i EcoRI
pAAV CAG hSgsh	Vector: pAAV CAG mSgsh(CBATEG) digerit amb MluI i EcoRI
	Insert: 0935187 human sulfamidase pMA (GeneArt) digerit amb MluI i EcoRI

1.5. Reactius

Tots els reactius de biologia molecular es van comprar a les següents cases comercials: Roche (Roche Diagnostics Corp., IN, EE.UU.), Invitrogen (ara Life Technologies) (San Diego, CA, EE.UU.), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EE.UU.), Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EE.UU.), Promega Corporation (Madison, WI, EE.UU.), Qia gen (Hilden, Alemanya), Fermentas (St. Leon-Rot, Alemanya), New England Biolabs (Ipswich, MA, EE.UU.), BioColor (Carrickfergus, County Antrim, Regne Unit), Moscardam Substrates (Oegstgeest, Holanda), Enantia (Barcelona, Espanya), Stratagene (ara Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.), Laboratorios Conda (Torrejón de Ardoz, Madrid, Espanya), Merck (Readington Township, NJ, EE.UU.), Panreac Química (Castellar del Vallès, Barcelona, Espanya), GeneArt (ara Life Technologies, San Diego, CA, EE.UU.), Merial (Duluth, GA, EE.UU.), Bayer (Leverkusen, Germany), Aesculap Inc. (Center Valley, PA, EE.UU.); Schering-Plough (Kenilworth, NJ, EE.UU.), B. Braun (Kronberg, Germany), Vetoquinol (Alcobendas, Madrid), Millipore (Billerica, MA, EE.UU.), Esteve (Barcelona, Espanya), Epicentre Biotechnologies Ecogen (Barcelona, Espanya), Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EE.UU.), Molecular Probes (Eugene, OR, EE.UU.), Abcam (Cambridge, Regne Unit), Cedarlane (Burlington, Ontario, Canadà), Novus Biologicals (Littleton, CO, EE.UU.)

2. MÈTODES

2.1. Preparacions de DNA plasmídic

Les minipreparacions de DNA plasmídic es van realitzar seguint el protocol de lisi alcalina descrit originàriament per Birnboim *et. al* (Birnboim i Doly, 1979). Per a quantitats més grans de DNA plasmídic, es van utilitzar diferents kits comercials com l'*EndoFree Plasmid Maxi Kit* (Promega Corporation) o *EndoFree Plasmid Mega Kit* (Qiagen), per tal d'obtenir un rendiment aproximat de 0,5 o 2,5 mg de DNA, respectivament.

2.2. Modificacions del DNA

2.2.1. Digestions del DNA amb enzims de restricció

Cada enzim de restricció utilitzar per a la construcció dels plasmidis presenta unes condicions específiques de pH, temperatura i força iònica per digerir específicament el DNA. Per aquest motiu, es van seguir les condicions de digestió indicades pel fabricant per cada enzim utilitzat (New England Biolabs, Roche o Fermentas). En general, el procediment que es va seguir era el següent: 1 µg de DNA es va digerir amb 1 unitat (U) d'enzim durant 1 h amb el tampó específic indicat pel fabricant. Tot seguit, els productes de digestió es van analitzar en gel d'agarosa. En el cas que el DNA es va digerir amb dos enzims de restricció diferents, les digestions es van realitzar a la temperatura i el tampó adequat per tal que ambdós enzims funcionin correctament. Si un enzim no funcionava òptimament al tampó més adequat, aquest es va suplementar amb més quantitat en funció de la seva eficiència de tall. Per exemple, si un dels dos enzims digereix teòricament al 50% de rendiment, es va posar el doble d'enzim (2 U) per digerir 1 µg de DNA durant 1 h.

2.2.2. Purificació i resolució del DNA

El mètode utilitzat per a la separació, identificació i purificació de fragments de DNA va ser l'electroforesi en gel d'agarosa. Per a la separació de fragments d'entre 0,5-

7 Kb, es van utilitzar gels d'agarosa al 1% w/p; mentre que els gels al 2% w/p van permetre separar fragments >0,5 Kb. Els gels es van preparar dissolent la proporció d'agarosa necessària en el tampó d'electroforesi TAE 1x (Tris-acetate pH 8,3, 40 mM i EDTA 1 mM) amb 0,5 µg/µl de bromur d'etidi. Per tal de permetre el dipòsit del DNA al fons del pou, les mostres es van carregar al gel amb el tampó de càrrega 1x (Fermentas). Seguidament, les mostres es van córrer amb el tampó d'electroforesi TAE 1x entre 50-90V per permetre la separació de les diferents bandes de DNA. La localització dels fragments de DNA es va determinar mitjançant llum ultraviolada de baixa longitud d'ona (320 nm) procedent d'un transil·luminador connectat a una càmera (Syngene, Synoptics Ltd.; Cambridge, Regne Unit), la qual era capaç de detectar la fluorescència del bromur d'etidi intercalat a la doble cadena de DNA. Aquesta tècnica va permetre visualitzar fins a 5 ng de DNA. A partir d'aquí, la mida dels diferents fragments de DNA separats en el gel d'agarosa es van calcular comparant la seva posició relativa al gel respecte a un patró de bandes de DNA conegut, *DNA ladder 1Kb* o *DNA ladder 100 bp* (Fermentas).

Per a l'extracció i purificació d'algun fragment d'interès del gel d'agarosa, es van retallar les bandes de la mida d'interès i es van processar segons les instruccions del fabricant del *GeneJETTM Gel Extraction kit* (Fermentas). El DNA es va quantificar mesurant l'absorbància a 260 nm mitjançant l'espectrofotòmetre NanoDrop ND-1000 (Termo Fischer Scientific Inc.; Waltham, MA, EE. UU.).

2.2.3. Lligació dels fragments de DNA

La T4 DNA lligasa de bacteriòfag es va utilitzar per les reaccions de lligació dels fragments d'interès (insert i vector) seguint les instruccions del fabricant (New England Biolabs). Com que tots els fragments usats presentaven extrems cohesius, la reacció de lligació es va dur a terme amb la presència del tampó de lligació suplementat amb ATP durant, com a mínim, 10 min a temperatura ambient.

2.2.4. Transformació d'*E. Coli* competents

El DNA plasmídic es va introduir a dins dels bacteris competents mitjançant el procés de transformació. Les cèl·lules *E. Coli XL2blue* es van transformar per electroporació afegint 1 µl de la reacció de lligació de DNA plasmídic a 40 µl de cèl·lules (2×10^{10} cèl·lules/ml), prèviament descongelades en gel. Seguidament, es va administrar una descàrrega elèctrica de 2500 V mitjançant un electroporador (Eppendorf; Hamburg, Alemanya), i ràpidament es van afegir 200 µl de LB a les cèl·lules electroporades per tal de recuperar-se de la descàrrega rebuda. Finalment, es van sembrar en plaques de LB amb 50 µg/µl ampicil·lina (Sigma), resistència present a tots els plasmidis utilitzats en aquest estudi, i es van incubar a 37°C durant tota la nit.

2.3. Genotipificació de ratolins MPSIIIA

Els ratolins MPSIIIA presenten una mutació puntual (G91A) que provoca l'eliminació de la diana de restricció MspAII (Bhattacharyya, 2001). D'aquesta manera, l'al·lel mutant, present en homozigosis o heterozigosis per a la MPSIIIA, va permetre la discriminació del genotip de cada ratolí.

2.3.1. Aïllament de DNA genòmic

El DNA genòmic es va extreure d'una mostra de cua, d'aproximadament 0,5 cm, dels ratolins d'entre 3-4 setmanes d'edat. Les mostres es van digerir durant tota la nit a 56°C amb 0,1% w/p de solució de proteïnasa K (Roche) en 750 µl de TESNA (100 mM Tris-HCl pH 8,5; 5 mM EDTA pH 8; 0,2 % w/p SDS; 200 mM NaCl). Aquesta incubació va permetre la digestió dels teixits per tal d'alliberar el DNA genòmic de l'interior de les cèl·lules. El dia següent, es van eliminar les restes de teixits mitjançant una centrifugació de 5 minut a 13.200 g, i es van recuperar 700 µl de sobrenedant, el qual es van barrejar amb 600 µl d'isopropanol per tal de precipitar el DNA genòmic. Després de 20 minuts de centrifugació a 13.200 g, es va descartar el sobrenedant i es va deixar assecar l'excés d'isopropanol. Finalment, el DNA precipitat es va rentar amb 70% v/v d'etanol i es va dissoldre en 1 ml d'aigua milliQ, prèviament escalfada a 65°C per facilitar la solubilització del DNA.

2.3.2. Genotipificació per PCR

Per tal d'amplificar el fragment de 506 bp de la regió que conté la mutació (G91A) en el gen de la sulfamidasa, es va utilitzar el kit comercial *GoTaq[®] DNA Polymerase (M300)* (Promega Corporation). En un volum total de 15 µl, es van afegir 2 µl de DNA tal com descriu la taula següent:

Reactiu	Volum (µl)
GoTaq Reaction Buffer (5x)	3
Mg²⁺ (25 mM)	0,9
Primers Forward 50 µM	0,1
Primers Reverse 50 µM	0,1
dNTP (25 mM)	0,12
GoTaq Polimerasa (5 U/µl)	0,1
Aigua milliQ	8,68
DNA genòmic	2

La PCR estàndard es va dur a terme seguint les següents condicions de temps i temperatura: 94°C durant 2 min per a la desnaturalització inicial del DNA, seguit de 40 cicles d'amplificació del DNA amb una desnaturalització (15 s a 94°C), *annealing* (15 s a 60°C) i elongació (25 s a 72°C), i una elongació final de 2 min a 72°C. Les seqüències d'oligonucleòtids utilitzats van ser:

Forward: 5' CACCTGAGTTTCCTGTGTTCC 3'

Reverse: 5' TCATCCCCTAGCCACTCTCA 3'

2.3.3. Digestió *MspAII* del producte de PCR

El producte de PCR es va digerir directament amb ~3 U d'enzim de restricció *MspAII* (C(A/C)G▼C(G/T)G) (New England Biolabs) a 37°C durant 1h 30 min en un volum total de 30 µl (descriu a la taula següent).

Reactiu	Volum (μ l)
Buffer NE 4 (10x)	3
BSA (100x)	0,3
MspA1I (10U/μl)	0,3
Aigua milliQ	11,4
Producte PCR	15

Després de la digestió enzimàtica, es va córrer el DNA en un gel d'agarosa al 2% w/p amb 0,5 μ g/ μ l de bromur d'etidi a 90-120 V per permetre la separació i resolució dels fragments de DNA. Les bandes esperades per cada genotip van ser les següents:

	Genotip	Mida de banda esperada
Control (WT)	Sgsh ^{WT} /Sgsh ^{WT}	277 + 118 + 111
Heterozigot	Sgsh ^{WT} /Sgsh ^{MPSIII A}	395 + 277 + 118 + 111
MPSIII A (homozigot)	Sgsh ^{MPSIII A} /Sgsh ^{MPSIII A}	395 + 111

Les bandes en negreta van permetre la discriminació del genotip dels ratolins.

2.4. Producció, purificació i caracterització dels vectors AAVs

2.4.1. Producció i purificació dels AAVs

Les partícules infeccives de l vector viral AAV9 es van generar en cultius de cèl·lules HEK-293 cultivades en *Roller Bottles* (RB) mitjançant un protocol de triple transfecció (Ayuso, 2010b), que implica la utilització de 3 plasmidis diferents (Figura 1). Aquest protocol, basat en la precipitació dels virus mitjançant PEG i la ultracentrifugació amb gradients de CsCl, va permetre l'eliminació de pràcticament tot el contingut de càpsides buides, com també la disminució de les impureses proteiques. D'aquesta manera, es va augmentar la puresa de la preparació viral final, la qual cosa va resultar en uns nivells de transducció *in vivo* més elevats (Ayuso, 2010a).

La cotransfecció de cada RB es va dur a terme en 30 ml de fosfat de calci amb 150 µg del DNA plasmídic d'interès (amb les seqüències ITRs i la seqüència gènica d'interès), juntament amb 150 µg del plasmidi accessori rep2/cap9 (plasmidi d'expressió codificant per a les proteïnes de la càpsida proteica de les partícules virals i les proteïnes necessàries per a la replicació viral) i 150 µg del plasmidi *helper* pWEAD (plasmidi d'expressió codificant per a les proteïnes adenovirals necessàries). La Dra. High de l *Children's Hospital of Philadelphia* EE.UU. va cedir generosament els plasmidis rep2/cap9 i pWEAD.

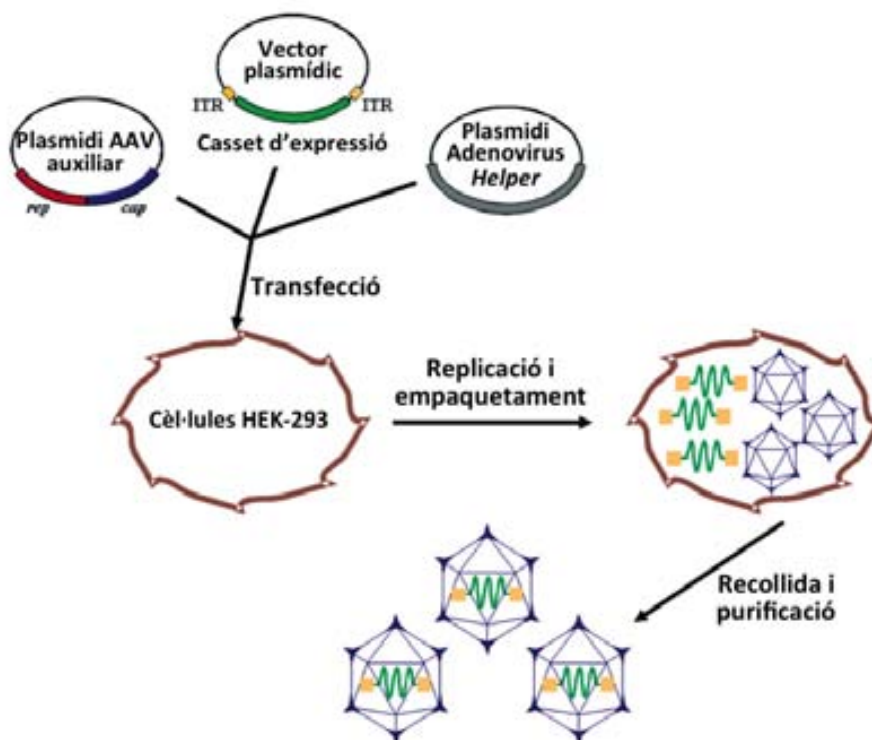


Figura 1 . Representació esquemàtica de la producció dels vectors AAVs recombinants pel protocol de triple transfecció. Per a la producció dels AAVs, ambdós ORFs virals (rep i cap) es van substituir pel transgèn flanquejat per les senyals d'empaquetament viral (ITRs). Les proteïnes virals rep i cap necessàries per a la producció van estar en *trans* a un plasmidi accessori. Les funcions dels virus auxiliars es van obtenir mitjançant la transfecció d'un tercer plasmidi, anomenat plasmidi *helper*, que codificava pels gens adenovirals necessaris per a la producció dels AAVs. Adaptat de Büning, 2008.

Després de 48 h de la transfecció, es van recollir les cèl·lules i es van centrifugar a 2.500 g durant 10 min. El medi de cultiu es va guardar a 4°C. El *pellet* cel·lular es va reconstituir en TMS (50mM TrisHCl, 150mM NaCl, 2mM MgCl₂, pH 8,0) i es va

sonicar per tal de lisar les cèl·lules i alliberar els virus del seu interior. El lisat es va centrifugar a 2.500 g durant 30 min, i el sobrenedant d'aquesta centrifugació es va afegir al medi de cultiu prèviament guardat a 4°C. A continuació, les partícules virals es van precipitar després d'una incubació de 15h en PEG 8000 al 8% (Sigma-Aldrich) a 4°C, i la posterior centrifugació a 4.000 g durant 30 min. Aquest nou *pellet*, que contenia els vectors virals tant del medi de cultiu com de les cèl·lules, es va reconstituir amb TMS, es va tractar amb benzonasa (Merck) durant 1 h a 37°C, i finalment es va centrifugar a 10.000 g durant 10 min. El sobrenedant resultant es va carregar en tubs de 37,5 ml *Ultra clear* (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, EE.UU.) que contenien un gradient discontinu de CsCl de densitat 1,5 g/ml (5ml) i 1,3 g/ml (10ml). A continuació, es van centrifugar durant 17h a 27.000 rpm en un rotor SW28 (Beckman). Les bandes de virus es van recollir mitjançant agulles de 18G i es van transferir a tubs *Ultra clear* de 12,5 ml, que es van enrasar amb CsCl a 1,379 g/ml per tal de generar un gradient continu. Aquests tubs es van centrifugar a 38.000 rpm en un rotor SW40Ti (Beckman) durant 48h. Finalment, les bandes corresponents a les partícules virals plenes es van recollir i dialitzar mitjançant una membrana de 10 KDa (Slide-A-Lyzer; Pierce), i posteriorment es van filtrar mitjançant filtres de 0,22 µm (Millipore).

2.4.2. Quantificació de genomes virals per PCR quantitativa (qPCR).

Els genomes virals de l'AAV9 es van determinar per qPCR, adequant el protocol descrit per *Lock et. al* (Lock, 2010) als vectors utilitzats en aquest estudi. La quantificació de cada vector es va fer en paral·lel amb un vector de referència de concentració coneguda per garantir la validesa dels resultats. Per no sobreestimar el títol de vector viral a causa de la presència de restes de DNA plasmídic procedents de la transfecció, es va realitzar un tractament amb DNAsa abans de la quantificació dels genomes virals, pel fet que els genomes encapsidats eren capaços de resistir la digestió amb DNAsa. Aleshores, es van afegir 5 µl de cada preparació de vector viral a 5 µl de tampó DNAsa 10x (130mM Tris-HCl, 50mM MgCl₂, 1,2mM CaCl₂, pH: 7,5), 1 µl de DNAsa (10 U/ µl) i 36 µl d'aigua milliQ. La digestió es va incubar durant 60 min a 37°C. Després de la digestió, les mostres es van diluir ($\sim 10^{-3}$ - 10^{-6}) per tal d'obtenir un valor d'amplificació dins del rang de la recta estàndard. La recta estàndard era un plasmidi linealitzat de concentració coneguda que es va diluir entre 10^3 - 10^8 còpies/µl.

En un volum final de 10 μ l, es va dur a terme la reacció de qPCR TaqMan, tal com es descriu a la taula següent:

Reactiu	Volum (μ l)
TaqMan LightCycler® 480 Probe Master	5
Oligos Forward (10 μ M)	0,2
Oligos Reverse (10 μ M)	0,2
Sonda (10 μ M)	0,1
Aigua milliQ	2
Vector diluït (10^{-3} – 10^{-6} μ l)	2,5

La reacció de qPCR TaqMan es va dur a terme a les següents condicions de temps i temperatura: en primer lloc, la incubació inicial de 10 min a 95°C va permetre l'activació de la polimerasa i la desnaturalització de les càpsides virals per tal d'alliberar els genomes virals; en segon lloc, les 40 rondes d'amplificació van permetre la desnaturalització del DNA durant 30 s a 95°C, i l'*annealing* i elongació de la cadena de DNA durant 30s a 60°C. Les seqüències d'oligonucleòtids utilitzats en la quantificació dels genomes virals de les preparacions virals d'AAVs van hibridar a la zona comuna de la regió poliA (regió de l'intró de la β -globina), i van ser els següents:

Forward: *CTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAAT*

Reverse: *GGAGAGGAGGAAAAATCTGGCTAG*

Sonda: *6FAM- CCGAGTGAGAGACACAAAAATTCCAACAC -BHQ1*

El títol de la preparació viral es va calcular després de tres rondes de quantificació realitzades en tres dies diferents:

Vector Viral	Nº preparació viral	Títol (vg/ml)
AAV9-mSgsh	270	$2,4 \times 10^{13}$
	465	$9,8 \times 10^{13}$
AAV9-cSgsh	432	3×10^{13}
AAV9-hSgsh	289	$4,1 \times 10^{13}$
AAV9-Nul	330	$1,2 \times 10^{14}$
AAV9-GFP	234	$5,36 \times 10^{13}$
	314	$2,8 \times 10^{13}$

2.4.3. Quantificació de partícules virals per tinció de plata

L'anàlisi de les preparacions virals per electroforesi de proteïnes SDS-PAGE i la posterior tinció amb nitrat de plata va permetre la quantificació de les càpsides virals. La comparació del títol de genomes virals obtingut per tinció de plata amb el de qPCR (veure apartat 2.4.2) va permetre calcular el percentatge de càpsides buides de cada preparació (relació: partícules virals / genomes virals). A més, aquest mètode va permetre visualitzar el grau de contaminació per part de les proteïnes no virals, que podrien afectar a l'eficiència de la transducció *in vivo* (Ayuso, 2010a).

Breument, el volum apropiat del vector d'interès, el vector de referència (control utilitzat també en la quantificació de qPCR, veure apartat 2.4.2) i diferents dilucions del vector K208 (de concentració coneguda i utilitzat com a recta estàndard), es van barrejar amb el tampó *4x Novex® Tris-Glycine LDS Sample Buffer* (Invitrogen) i *10x NuPAGE Sample Reducing Agent* (Invitrogen) fins a un volum final de 20 µl. Després de 5 minuts d'ebullició, les mostres es van carregar en un gel del 10% Bis-Tris 1,5mm 15 pous (Invitrogen) i es van córrer a 120 V durant 2 h. Les proteïnes del gel es van fixar amb una barreja d'aigua milliQ/etanol/àcid acètic. A continuació, el gel es va sensibilitzar amb una barreja de Na₂S₂O₃/acetat de sodi/etanol/aigua milliQ. Posteriorment, el gel es va tenyir amb nitrat de plata i, finalment, les bandes es van revelar fent servir una barreja de Na₂CO₃ /Formaldehid/aigua milliQ. El títol de partícules virals es va obtenir per densitometria, a partir de la intensitat de la VP3 de les diferents dilucions del vector K208 utilitzat com a recta estàndard (Figura 2).

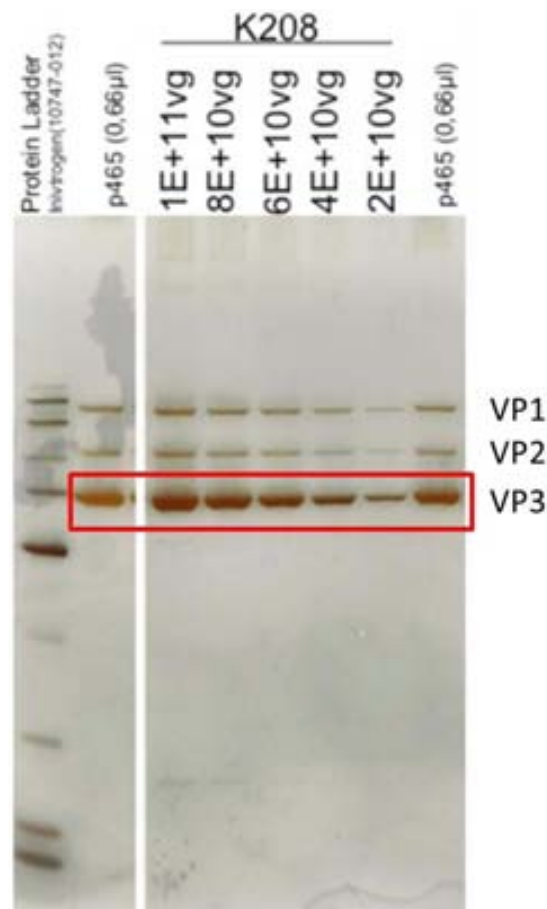


Figura 2. Imatge representativa de la quantificació de les partícules virals per tinció de plata del vector viral AAV9-cSgsh.

Les partícules virals de cada preparació viral estan resumides a la taula següent:

Vector Viral	Nº preparació viral	Títol (vg/ml)	Càpsides buides (relació pv/vg)
AAV9-mSgsh	270	3.3×10^{13}	~1
	465	1.1×10^{14}	~1
AAV9-cSgsh	432	4×10^{13}	~1
AAV9-hSgsh	289	5.2×10^{13}	~1
AAV9-Nul	330	6.9×10^{13}	~1
AAV9-GFP	234	7.5×10^{13}	~1
	314	2.6×10^{13}	~1

2.5. Administració *in vivo* del vector AAV9

2.5.1. Administració intracisternal en ratolins

Abans de l'administració intracisternal del vector AAV9, els ratolins es van anestesiar amb una injecció intraperitoneal de Ketamina (100 mg/Kg) (Merial) i Xilazina (10 mg/Kg) (Bayer). Una vegada anestesiats, es va rasurar la part posterior del cap, just per sota les orelles fins aproximadament entre les escàpules, i es va realitzar una incisió rostro-caudal de 2 mm. Els ratolins es van col·locar en posició decúbit supí, amb el cap lleugerament inclinat cap avall tot exposant la regió entre l'os occipital del crani i la vèrtebra C1, i es va introduir una agulla de 34G unida a una xeringa Hamilton (Hamilton Company; Reno, NE, EE.UU.) amb un angle de 45° a 55° a dins la cisterna magna. A continuació, es van administrar 5 µl de la dilució apropiada del vector viral. Com que el SNC és el compartiment diana principal del vector, es va administrar la mateixa dosi de genomes virals a tots els ratolins, independentment del sexe o pes corporal. Després de l'administració del vector viral, es va retirar l'agulla de la cisterna magna i es va tancar la incisió amb adhesiu tissular *Histoacryl*[®] (Aesculap Inc.)

2.5.2. Administració intracisternal en gossos

L'administració intracisternal en gossos es va realitzar amb un procediment experimental diferent al documentat prèviament en ratolins. Inicialment, es van premedicar els gossos amb l'administració intramuscular de Buprenorfina (0,02 mg/Kg) (*Buprex*[®], Schering-Plough). Aproximadament trenta minuts més tard, es va dur a terme la inducció anestèsica mitjançant l'administració intravenosa de 4 mg/Kg de Propofol (PropoVet; B. Braun) i 0,5 mg/Kg de Diazepam (Valium, Roche). Després de la intubació endotraqueal, es va mantenir l'anestèsia per inhalació d'isofluorà al 2% (IsoVet; B. Braun) en 100% d'oxigen. A continuació, es va rasurar la zona posterior del crani, es va desinfectar amb la solució antisèptica i es va col·locar el gos en posició decúbit lateral amb el cap formant un angle de 90° respecte al cos. Seguidament, es va introduir una agulla de 22G a dins la cisterna magna, entre l'os occipital i la vèrtebra C1, que es va connectar a una xeringa unida a un catèter de fluid amb una clau de 3 vies (*Discofix*[®], B. Braun) per tal d'enviar 1 ml de la solució viral, diluïda a la dosi

apropiada. La velocitat d'infusió de la solució viral va ser ràpida (bolus, <15 s), o lenta (10 min) per mitjà d'una bomba d'infusió (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EE.UU.) que administrava el vector a una velocitat de 100 µl/min. Durant tot el procediment quirúrgic, es va monitoritzar la temperatura, la freqüència respiratòria i cardíaca, capnografia, la pressió arterial, el pols i l'electrocardiograma mitjançant un monitor veterinari multifuncional de les funcions vitals (*VetCare*, B. Braun).

2.5.3. Administració intracerebroventricular en gossos

Per a la injecció intracerebroventricular, els gossos es van premedicar i anestesiari tal com s'ha descrit a l'apartat 2.5.2.. Un cop anestesiats, es va practicar una ressonància magnètica d'imatge prequirúrgica per tal d'establir les coordenades del ventricle lateral de cada gos. Seguidament, es van traslladar els animals al quiròfan per tal de realitzar la l'administració intracerebroventricular. Es va rasurar i desinfectar la zona del crani, i es va perforar l'os parietal a les coordenades indicades per la ressonància magnètica nuclear. Per mitjà d'un sistema de neuronavegador basat en imatge (Stealthstation AxiEM; Medtronic, Minneapolis, MN, EE.UU.), es va guiar el catèter de Teflon de 2.5 mm de diàmetre cap a l'interior del ventricle lateral, a través del petit forat realitzat a l'os parietal. A continuació, es va realitzar una extracció de LCR a través del catèter, on a continuació s'hi va connectar una xeringa amb 1 ml de la solució viral, diluïda a la dosi apropiada, administrada en bolus (>15 s). Posteriorment, es va administrar un volum de solució salina per tal de netejar i eliminar les restes de solució viral presents al catèter. Durant tot el procediment quirúrgic, es va monitoritzar la temperatura, la freqüència respiratòria i cardíaca, la capnografia, la pressió arterial, el pols i l'electrocardiograma mitjançant un monitor veterinari multifuncional de les funcions vitals (*VetCare*, B. Braun).

2.5.4. Administració intravenosa en gossos

El procediment d'immunització dels gossos es va dur a terme mitjançant l'administració intravenosa del vector viral AAV9-Nul a través de la vena cefàlica, sota els efectes de sedació. La zona de l'avantbraç es va rasurar i, seguidament, es va

desinfectar amb etanol 70% i una solució antisèptica. A continuació, es va administrar la preparació viral, diluïda a la dosi apropiada, a través de la vena cefàlica utilitzant una xeringa de 2 ml connectada a un tub amb una clau de 3 vies (*Discofix*[®], B. Braun).

2.6. Prova de camp obert (o *Open Field Test*)

La prova de camp obert es va dur a terme en ratolins de 6 o 10 mesos d'edat entre les 9h del matí i les 14h del migdia. Els animals es van col·locar al centre de l'arena (41 x 41 x 30 cm), delimitada per 2 marcs de feixos emissors d'infraroigs col·locats un sobre l'altre (LE 8811; Panlab, Cornellà, Barcelona, Espanya), els quals van ser connectats a un sistema de vídeo-càmera capaç d'enregistrar tots els moviments dels animals. L'activitat exploratòria i motora dels ratolins es va avaluar durant els 3 primers minuts de test. El número total de *rearings* es va enregistrar pel trencament dels feixos de llum infraroig, i es va processar posteriorment amb el programa SedaCom 32 (Panlab). El número total de línies creuades i la distància total recorreguda es va analitzar amb el programa Smart Junior o Smart v3.0 (Panlab), el qual va permetre el processament de les imatges captades pel sistema de vídeo seguiment. Per tal de realitzar aquest últim anàlisi dels moviments dels animals, es van delimitar tres àrees quadrades concèntriques a dins de l'arena: centre (14 x 14 cm), perifèria (27 x 27 cm) i vora (41 x 41 cm).

2.7. Obtenció de mostres de sèrum i LCR *in vivo*

2.7.1. Obtenció de mostres de sèrum de ratolins

Després de l'administració intracisternal als ratolins, es van extreure periòdicament mostres de sang de la cua de l'animal. El mètode utilitzat va consistir en tallar un petit fragment de cua i recollir ~200-300 µl de sang en un capil·lar. La sang es va mantenir en fred fins al moment de la centrifugació a 12.000 g durant 10 min. Finalment, es va recuperar el sèrum i es va guardar al congelador -80°C fins al dia de processament de les mostres.

2.7.2. Obtenció de mostres de sèrum de gossos

Previ a qualsevol procediment experimental amb gossos, es va recollir 10 ml de sang de la vena cefàlica o la jugular sota els efectes de l'anestèsia (procediment anestèsic descrit a l'apartat 2.5.2.). La sang extreta es va transferir a tubs amb heparina o EDTA, actuant com a anticoagulants, fins a la posterior determinació bioquímica i hematològica corresponent. Per altra banda, la sang també es va mantenir en tubs eppendorfs, i es va centrifugar a 12.000 g durant 10 min per tal de recuperar el sèrum per a anàlisis posteriors.

2.7.3. Obtenció de mostres de LCR de gossos

Previ a qualsevol procediment experimental amb gossos, es van recollir aproximadament 2 ml de LCR a través d'una punció directa a la cisterna magna. Abans de l'extracció de LCR, els gossos es van premedicar i anestesiar tal com es descriu a l'apartat 2.5.2. de Materials i mètodes. Després de rasurar i desinfectar la zona posterior del crani, es va introduir una agulla de 22G a la cisterna magna i es va recollir el degoteig de LCR en tubs eppendorfs. Previ a l'administració intracerebroventricular, se'ls va recollir el LCR mitjançant el degoteig natural del LCR des del ventricle lateral cap a l'exterior a través del catèter de Teflon de 2,5 mm de diàmetre. Les mostres de LCR es van guardar al congelador -80°C fins al dia del seu anàlisi.

2.8. Determinació de paràmetres bioquímics i hematològics

La determinació de paràmetres bioquímics i hematològics en plasma i LCR de gossos es va dur a terme al Servei d'Hematologia i al Servei de Bioquímica Clínica Veterinària de la UAB. La determinació de cèl·lules blanques al LCR es va realitzar al Servei de Neurologia i Neurocirurgia de l'Hospital Clínic Veterinari.

2.9. Obtenció de mostres biològiques *postmortem*

2.9.1. Obtenció de mostres biològiques *postmortem* de ratolins

Per a l'extracció de mostres biològiques de ratolins, els animals es van anestesiar amb una injecció intraperitoneal de Ketamina (100 mg/Kg) (Merial) i Xilazina (10 mg/Kg) (Bayer). Seguidament, es va obtenir sang per punció cardíaca del ventricle esquerre. Inmediatament, els ratolins es van perfondre amb 10 ml de PBS per tal d'eliminar la sang dels vasos sanguinis, i conseqüentment, la sulfamidasa circulant que podria interferir en la futura mesura d'activitat de cervell i fetge. A continuació, es va procedir a la dissecció dels teixits d'interès dels animals. En el cas del cervell, es va dividir longitudinalment en dues regions (dreta i esquerra), i cada una de les seccions es va subdividir en 5 regions coronals més, essent la secció I la més frontal i la secció V la més caudal (Figura 3). Tots els teixits es van mantenir al congelador -80°C fins al dia de processament de mostres, i una part de cada teixit es va guardar durant tota la nit en paraformaldehid al 2% per tal de realitzar la inclusió en blocs de parafina.

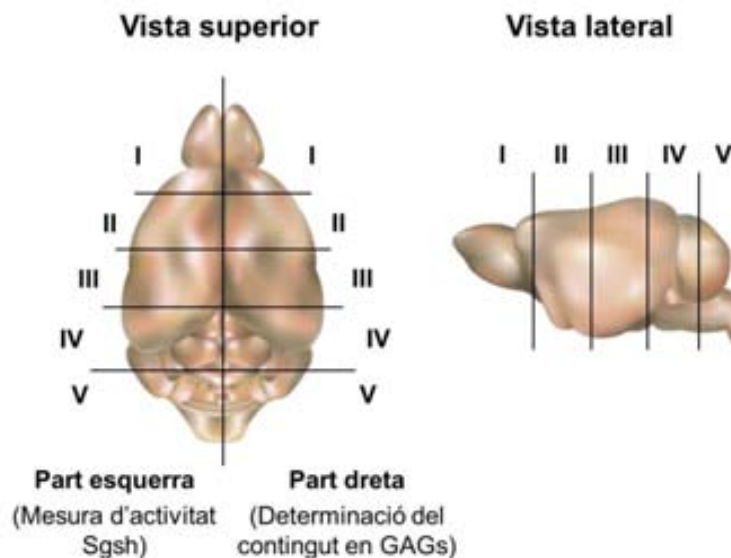


Figura 3. Subdivisió del cervell murí en diferents parts per a posteriors determinacions analítiques.

2.9.2. Obtenció de mostres biològiques postmortem de gossos

Per a l'extracció de mostres de teixits dels gossos utilitzats en aquest estudi, els animals van ser premedicats amb 0,02 mg/kg de Buprenorfina (0.02 mg/Kg) (*Buprex*[®], Schering-Plough). Trenta minuts més tard, es va rasurar i desinfectar la pota esquerra de l'animal amb una solució antisèptica per tal de col·locar un catèter a la vena cefàlica. A continuació, es va administrar 100 mg/kg de Pentobarbital (*Dolethal*[®], Vetoquinol) per tal de procedir a l'eutanàsia de l'animal. Finalment, es va realitzar la dissecció dels teixits d'interès, els quals es van guardar durant tota la nit en paraformaldehid al 2%, per a la posterior inclusió en blocs de parafina, o es van mantenir al congelador -80°C fins al dia de processament de mostres.

2.10. Quantificació de proteïna pel mètode de Bradford

L'assaig de proteïna de Bradford és un procediment analític espectroscòpic utilitzat per a la quantificació del contingut proteic d'una mostra. Aquest mètode es basa en el canvi de color del *Coomassie brilliant blue* després de formar complexos amb proteïnes. Aquest canvi de color provoca un canvi del punt d'absorbància màxim de 495 nm cap a 595 nm.

Per tal d'obtenir extractes proteics, les diferents seccions del cervell o ~50 mg de fetge es van homogeneïtzar en 250-500 µl d'aigua milliQ mitjançant un sonicador a 30-40 V (*Ultrasonic Processor*, Sonics & Materials Inc., CT, EE.UU.). Les restes cel·lulars presents a l'extracte proteic es van eliminar per centrifugació a 12.000 g durant 10 minuts a 4°C. En primer lloc, els extractes proteics es van diluir apropiadament en 800 µl d'aigua milliQ i es van afegir 200 µl del reactiu de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*, Bio-Rad). El mateix tipus de preparació es va dur a terme amb diferents quantitats (0-20 µg) de BSA per tal d'obtenir la recta patró per a l'extrapolació de la quantitat de proteïna. Després d'afegir el reactiu de Bradford, les mostres es van agitar vigorosament i es van incubar durant 5 minuts a temperatura ambient. Finalment, 200 µl de la mescla es van transferir a una placa transparent de 96 pous i es va realitzar la mesura de l'absorbància a 595 nm mitjançant l'espectrofotòmetre *Power wave HT microplate* (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, EE.UU.)

2.11. Determinació d'activitat sulfamidasa

La determinació d'activitat sulfamidasa es va dur a terme en extractes de teixit utilitzant un protocol basat en dues incubacions i un substrat fluorogènic derivat de la metilumbelliferona anomenat *4M-alpha-N-sulpho-D-glucosaminide* (4-MU- α GlcNS), seguint les instruccions del fabricant (Moscerdam Substrates o Enantia) (Karpova, 1996).

Breument, el primer pas del protocol va consistir en una incubació de 17h a 47°C de 30 μ g de l'extracte proteic o 10 μ l de sèrum o LCR amb 10 μ l de 4-MU- α GlcNS (10 mM) i 10 μ l d'inhibidor de proteases (*Complete EDTA-free*[®], Roche), on 1 pastilla de *Complete EDTA-free*[®] es va dissoldre en 25 ml de tampó substrat (Na-barbital / Na-acetate buffer + 0,7% NaCl, pH 6,5 + 0,02 % (w/p) Na-azida). Per tal d'evitar l'evaporació, les mostres es van preparar en tubs de PCR de 200 μ l de volum final. L'objectiu principal del primer pas era l'eliminació del grup sulfat del substrat fluorogènic per part de la sulfamidasa present a l'extracte proteic. Com a blanc de la reacció enzimàtica, es va utilitzar BSA 0,2% inactivat tal com indicaven les instruccions del fabricant (Moscerdam Substrates). Transcorregudes les 17h, es va aturar la primera reacció enzimàtica mitjançant l'addició de 6 μ l de tampó fosfat / citrat (0,4 M Na-fosfat / 0,2 M tampó citrat, pH 6,7). Per a la segona reacció d'incubació, es va afegir 10 μ l d'una solució d' α -glucosidasa de 10 U/ml BSA 0,2 % (Sigma-Aldrich) per tal de permetre l'alliberació del compost fluorescent 4-MU procedent del substrat desulfatat. Aquesta segona incubació, es va realitzar durant 24 h a 37°C. A continuació, la reacció enzimàtica es va aturar mitjançant l'addició de 200 μ l de tampó d'aturada (0,5M NaHCO₃ / 0,5M Na₂CO₃, pH 10,7, 0,025 % Tritó X-100). Finalment, es va llegir la fluorescència emesa en una placa negra de 96 pous en el fluorímetre FLx800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE.UU.) utilitzant el filtre d'excitació de 360/40 nm i el filtre d'emissió de 460/40 nm. La quantificació d'activitat sulfamidasa de les mostres es va calcular per extrapolació de la fluorescència detectada a una recta patró formada per dilucions seriades de 4MU (la dilució inicial era 3 mg/ml). Totes les mostres d'un mateix experiment es van processar en paral·lel.

2.12. Quantificació del contingut de GAGs

Per a la quantificació del contingut de GAGs, es va utilitzar el kit comercial *Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan Assay* (Biocolor Life Science Assay), seguint les instruccions del fabricant. Aquest mètode es basa en la unió específica del colorant *1,9-dimethylmethylen blue* (DMB) amb els GAGs sulfats. Breument, 50-100 mg de teixit es van digerir durant tota la nit a 56°C en 800 µl de tampó fosfat ($\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$ 100 mM, pH 8) amb proteïnasa K (50 µg/ml). Després de 10 minuts a 90°C per a la inactivació de la proteïnasa K, els extractes es van centrifugar a 10.000 g durant 10 minuts per eliminar les restes cel·lulars. Tot seguit, els extractes es van clarificar per centrifugació i filtració (*Ultrafree MC*; Millipore) a 12.000 g durant 5 minuts. La dilució apropiada dels extractes filtrats es va mesclar amb 1 ml del reactiu colorant *Dye Reagent* (Biocolor), i es va incubar a temperatura ambient durant 30 min amb agitació per tal de permetre la unió del colorant amb els GAGs filtrats. Les mostres es van centrifugar a 12.000 g durant 10 min per tal d'obtenir el *pellet* de *Dye Reagent*-GAG. Tot seguit, es va resuspendre el *pellet* amb el *Dye Dissociation Reagent* (Biocolor) durant 15 min en agitació, per tal de facilitar la dissociació dels complexos *Dye Reagent*-GAG formats. Finalment, es va llegir l'absorbància a 656 nm en una placa transparent de 96 pous a l'espectrofotòmetre *Power wave HT microplate* (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, EE.UU.). La quantificació de GAGs es va calcular a partir de l'extrapolació dels valors d'absorbància obtinguts a 656 nm amb els valors de la recta patró realitzada amb dilucions seriades del *Glycosaminoglycan Standard* (Biocolor). Tots els resultats es van normalitzar per pes de teixit. A més, totes les mostres de cada teixit del mateix experiment es van analitzar i processar en paral·lel.

2.13. Immunohistoquímica en seccions de teixits

Tots els teixits dels diferents grups experimentals es van fixar durant 12-24h en paraformaldehid al 2%, es van incloure en blocs de parafina i es van realitzar les seccions amb un micròtom *LEICA RM2135* (Leica Biosystems, Barcelona, Espanya) per realitzar les immunohistoquímiques. Les seccions de teixit es van desparafinitzar i incubar durant tota la nit a 4°C amb l'anticòs primari corresponent per a la detecció de la proteïna d'interès (veure el llistat d'anticossos de la secció 1.3). A continuació, les seccions es van rentar 3 vegades amb PBS durant 5 min i es van incubar amb l'anticòs

secundari corresponent durant una hora a temperatura ambient. Per a les immunohistoquímiques dobles, es va realitzar el mateix procediment anterior per a cada anticòs primari. Les seccions en camp clar es van tenyir amb 3.3-diaminobenzidina (Sigma-Aldrich), i es van contrastar amb hematoxilina (Merck). Les imatges de les seccions en camp clar es van obtenir mitjançant un microscopi òptic Eclipse E800 (Nikon Instruments Inc., Tokio, Japó). Per a la detecció de la immunofluorescència, les seccions es van incubar amb l'anticòs secundari conjugat amb un fluorocrom, com l'Alexa 488 conjugat amb estreptavidina (Molecular Probes) o l'Alexa 568 conjugat amb estreptavidina (Molecular Probes), durant 1h a temperatura ambient. Els nuclis es van contrastar amb Hoescht (Sigma), i les imatges es van obtenir amb un microscopi confocal (Leica Microsystems).

2.14. Anàlisi morfològic

La senyal positiva de les immunohistoquímiques de seccions del cervell contra LIMP2, GFAP i BSI-B4 de ratolins es va quantificar en 3-5 imatges representatives (ampliació 20x) per cada regió del cervell de cada animal. La quantificació de la senyal positiva de les immunohistoquímiques de seccions del cervell contra GFP de gossos es va quantificar en 2 imatges representatives (ampliació 10x) per cada àrea de cada animal. En tots els casos es va utilitzar el programa *NIS Elements Advanced Research 2.20 Software*, amb el qual es va establir i mantenir el mateix llindar per a cada quantificació. El percentatge d'àrea positiva es va calcular com l'àrea amb senyal positiu (píxels) respecte el total de l'àrea de la imatge.

La quantificació del número d'hepatòcits transduïts dels gossos es va realitzar comptant el número de cèl·lules GFP positives respecte el número d'hepatòcits totals en 50 imatge (ampliació 20x). Dos observadors independents van realitzar el mateix comptatge obtenint un percentatge de transducció similar. La quantificació del percentatge de neurones LIMP2+ es va realitzar mitjançant la quantificació del número de cèl·lules doble positives pel marcador lisosòmic, LIMP2, i el marcador de neurones, NeuN, respecte el número total de cèl·lules LIMP2+ en 20 imatges del còrtex cerebral (ampliació 40x). En ambdós casos, també es va utilitzar el programa *NIS Elements Advanced Research 2.20 Software*.

2.15. Microscòpia electrònica de transmissió

Els ratolins es van sacrificar amb una sobredosi d'anestèsia, isofluorà inhalat (*Isofluo*, Esteve) i seguidament es van fixar per perfusió via vena cava inferior amb 1 ml de glutaraldehid al 2,5 % i amb una solució de paraformaldehid al 2% en tampó fosfat 0,1 M. El còrtex cerebral prefrontal i el lòbul lateral del fetge es van disseccionar en petites porcions (aproximadament 1 mm³) i es van incubar durant 2h a 4°C. Després de la incubació, els espècimens es van rentar quatre vegades en tampó fosfat 0,1 M durant 10 min a 4°C, i seguidament, es van fixar en 1% de tetròxid d'osmi i 0,8% de ferrocianur de potassi en tampó fosfat durant 1h a 4°C. Seguidament, es van realitzar 4 rentats amb aigua milliQ durant 10 minuts a 4°C, i es van deshidratar gradualment a través de solucions seriades d'etanol a 4°C. Les seccions es van fixar a 4°C en resina epoxídica durant 48-72 h a 60°C. A partir d'aquí, es van obtenir els talls semifins (500 nm) dels blocs de resina que es van tenyir amb blau de metilè (0,5% en una solució aquosa) durant 10 segons a 60°C. Finalment, es van obtenir les seccions ultrafines (65 nm) mitjançant un ultramicrotòtom Leica UM EC60, es van muntar a una reixeta i es van contrastar amb acetat d'uranil aquós durant 30 minuts i amb citrat de plom durant 10 minuts més. Les reixetes es van examinar al microscopi electrònic de transmissió Hitachi H-700 (Hitachi, Tokio, Japó).

2.16. Extracció i quantificació de còpies de genomes virals per qPCR

2.16.1. Extracció de genomes virals dels teixits

L'extracció del DNA total es va realitzar mitjançant el kit comercial *MasterPure™ DNA Purification Kit* (Epicentre), seguint les instruccions del fabricant. Aquest mètode es basa en la precipitació per sals per aconseguir una eficient purificació del DNA total de mostres biològiques.

2.16.2. Quantificació del nombre de còpies de genomes virals

El número de còpies de genomes virals es va determinar en 20 o 100 ng de DNA total procedent de diferents teixits de gossos per extrapolació d'una recta patró de referència, generada a partir de dilucions seriades d'un plasmidi linealitzat.

2.16.2.1. Generació de la recta patró de referència

La recta patró es va generar a partir del DNA plasmídic pAAV-CAG-GFP-WPRE linealitzat. Mitjançant la concentració coneguda de plasmidi i el nombre de parells de bases del constructe (7,7 Kb) es va obtenir el nombre de còpies del transgèn per μl . Aquest DNA plasmídic es va diluir de forma seriada de manera que es va obtenir una recta patró de dilucions logarítmiques $10^7 : 10^6 : 10^5 : 10^4 : 10^3 : 10^2$ còpies de 1 transgèn/ μl . A cada reacció de PCR es va combinar el DNA plasmídic amb 20 ng de DNA genòmic total irrellevant (sense el gen d'interès utilitzat per quantificar les còpies de genomes virals) de gos amb la finalitat d'igualar les condicions de PCR entre la recta patró i el DNA genòmic dels ratolins.

2.16.2.2. Quantificació del nombre de còpies de genomes virals per qPCR

Un cop es va generar la recta patró, es van diluir les mostres fins a 20 o 100 ng de DNA total per tal de realitzar la qPCR necessària pel càlcul del nombre de còpies de genomes virals. En un volum final de 20 μl , es va dur a terme la reacció de qPCR (*Light Cycler*[®] *Probe Master*, Roche) descrita a continuació:

Reactiu	Volum (μl)
Taqman Light Cycler [®] 480 Probe Master	10
Primers Forward (10 μM)	0,4
Primers Reverse (10 μM)	0,4
Sonda	0,2
Aigua milliQ	7
DNA total	2

La reacció de qPCR va consistir en una desnaturalització inicial de 5 minuts a 95°C, seguit de 45 cicles de 4 etapes: desnaturalització (10 segons a 95°C), *annealing* (10 segons a 60°C), amplificació (10 segons a 72°C).

La seqüència dels oligonucleòtids i la sonda específics pel WPRE del vector viral AAV9-CAG-GFP-WPRE utilitzats van ser els següents:

Forward, 5'-CGGCTGTTGGGCACTGA-3'

Reverse, 5'-GGAAGGTCCGTCGAATTGA-3'

Sonda: 5'-ATGGCTGCTC GCCTGTGTTGCC-3'

Els valors finals de còpies de genomes virals es van calcular a partir dels valors obtinguts de la qPCR per extrapolació de la recta patró generada normalitzant-ho per genoma diploide, és a dir, 20 ng de DNA genòmic corresponen a 3115.26 genomes diploides de ratolí.

2.17. Anàlisi d'expressió de mRNA

2.17.1. Aïllament de RNA Total

L'aïllament de RNA total es va dur a terme mitjançant la homogeneïtzació de mostres congelades en *TriPure Isolation Reagent* (Roche) amb un politró. L'extracció del RNA es basa en una extracció de fenol-cloroform de teixits homogeneïtzats utilitzant la tiocianat guanidina com a inhibidor de la ribonucleasa. La fracció corresponent al RNA es va extreure mitjançant l'addició de 0,3 ml de cloroform, i seguidament es van utilitzar les columnes d'adsorció per a la purificació del RNA, *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), seguint les instruccions del fabricant. Totes les mostres es van tractar amb DNasa I directament a la columna amb el kit comercial *RNase-Free DNase Set* (Qiagen), seguint les instruccions del fabricant. Després de realitzar un rentat a la columna amb el tampó corresponent, es va eluir el RNA total per mitjà de l'addició de 35 µl d'aigua destil·lada lliure de RNasa. Finalment, la concentració de les mostres de RNA es va determinar per la mesura de l'absorbància a 260 nm utilitzant

l'espectrofotòmetre NanoDrop ND-1000 (Termo Fischer Scientific Inc.; Waltham, MA, EE. UU.).

2.17.2. Síntesi de cDNA

Un µg de RNA total es va retrotranscriure a una cadena de cDNA utilitzant el *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit* (Roche), seguint les instruccions del fabricant. Es van utilitzar oligonucleòtids Oligo-dT i hexàmers aleatoris per a l'amplificació del cDNA amb la presència de *Protector RNase Inhibitor*, present al kit comercial (Roche).

2.17.3. Quantificació de l'expressió de mRNA per qPCR

Després de la retrotranscripció, el cDNA de les mostres es va diluir 1/10 per tal de dur a terme la qPCR. La qPCR es va dur a terme utilitzant el *Light Cycler[®] Probe Master* (Roche) seguint les instruccions del fabricant (veure apartat 2.16.2.2. de Materials i Mètodes).

Per a la detecció de l'expressió del mRNA de la GFP es van utilitzar els següents oligonucleòtids específics:

Forward: 5'-AGCTGGACGGCGACGTAA-3'

Reverse: 5'-GTGCAGATGAACTTCAGGGTCA-3'

Sonda: 5'-CGTGTCCGGCGAGGGCGA-3'

La qPCR quantitativa es va dur a terme utilitzant el *Light Cycler[®] 480 SybrGreen I Master* (Roche), seguint les instruccions del fabricant.

Reactiu	Volum (µl)
Light Cycler® 480 SybrGreen I Master	10
Primers Forward (10 µM)	0,4
Primers Reverse (10 µM)	0,4
Aigua milliQ	7,2
DNA total	2

Per a la detecció de l'expressió del mRNA de la hSgsh, es van utilitzar els següents oligonucleòtids específics, que van permetre diferenciar entre la sulfamidasa humana i la sulfamidasa canina pròpia de l'animal:

Forward: 5'-AGCTGCAGCCCTAGCAGAG-3'

Reverse: 5'-GCCGTACATGCCATTCTGAT-3'

Els resultats obtinguts per a l'avaluació de l'expressió del mRNA d'ambdós constructes es van normalitzar amb l'expressió del gen del gos *RPLP0*:

Forward: 5'-GCTGCTGGCCAATAAGGTT-3'

Reverse: 5'-GGGCTGGCACAGTGA CTT-3'.

2.18. Determinació d'anticossos neutralitzants.

Els títols d'anti-AAV2 i anti-AAV9 presents en les mostres humanes i de gossos de sèrum i LCR es van determinar amb un assaig de neutralització *in vitro*, tal com es va descriure prèviament (Manno, 2006). Durant l'assaig, es va utilitzar un vector *self-complementary* que expressava el gen marcador de la *Renilla* Luciferasa sota el control del promotor de la β -actina de pollastre. Per tal d'incrementar l'eficiència de transducció de l vector AAV *in vitro*, es van utilitzar les cèl·lules 2V6.11 (ATCC, Manassas, VA, EEUU), les quals expressaven el gen adenoviral *E4* sota el control d'un promotor induïble. Les cèl·lules es van sembrar en plaques de 96 pous a una densitat de $1,25 \times 10^4$ cèl·lules/pou, on es va afegir una dilució 1:1000 de Ponasterona A (Invitrogen) per tal d'induir l'expressió del gen adenoviral *E4*. El dia de l'assaig, dilucions seriades de sèrum o LCR, inactivats per calor, es van barrejar amb el medi que contenia el vector viral AAV2 o AAV9, en funció del test de neutralització. L'activitat residual de l'enzim Luciferasa es va mesurar per lum inometria. El títol d'anticossos neutralitzants anti-

AAV2 o anti-AAV9 es va expressar com la dilució de sèrum o LCR capaç de reduir a la meitat l'activitat Luciferasa, és a dir, inhibir el 50% de transducció cel·lular per part dels AAVs.

2.19. Anàlisi estadística

Tots els valors es van expressar com a mitjana \pm SEM (*Standard Error of the Mean*). Les comparacions estadístiques es van dur a terme utilitzant l'anàlisi de variància (ANOVA) i les comparacions múltiples entre els grup control i els diferents grups experimentals es van realitzar amb el posttest *Dunnet*. La significança estadística es va considerar si el valor de p era menor a 0,05. El mètode de Kaplan-Meier es va utilitzar per l'anàlisi de la supervivència, i el test de *log-rank* es va utilitzar per a les posteriors comparacions.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Aiuti A et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science*. 2013;341(6148):1233151.
- American Association of Neurological Surgeons. National Neurosurgical Procedural Statistics.2006 Survey, In: AANS, ed. Meadows, IL: American Association of Neurological Surgeons, 2006
- Anson DS et al. Lentiviral-mediated gene correction of mucopolysaccharidosis type IIIA. *Genetic vaccines and therapy*. 2007;5:1.
- Applegarth DA, Toone JR, Lowry RB. Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-1996. *Pediatrics*. 2000;105(1):e10.
- Arfi A, Richard M, Gandolphe C, Scherman D. Storage correction in cells of patients suffering from mucopolysaccharidoses types IIIA and VII after treatment with genistein and other isoflavones. *Journal of inherited metabolic disease*. 2010;33(1):61–67.
- Aronovich EL et al. Canine heparan sulfate sulfamidase and the molecular pathology underlying Sanfilippo syndrome type A in Dachshunds. *Genomics*. 2000;68(1):80–84.
- Ausseil J et al. Early neurodegeneration progresses independently of microglial activation by heparan sulfate in the brain of mucopolysaccharidosis IIIB mice. *PLoS one*. 2008;3(5):e2296.
- Avila JL, Convit J. Inhibition of leucocytic lysosomal enzymes by glycosaminoglycans in vitro. *The biochemical journal*. 1975;152(1):57–64.
- Aymami J, Barril X, Rodríguez-Pascau L, Martinell M. Pharmacological chaperones for enzyme enhancement therapy in genetic diseases. *Pharmaceutical patent analyst*. 2013;2(1):109–124.
- Ayuso E et al. High AAV vector purity results in serotype- and tissue-independent enhancement of transduction efficiency. *Gene therapy*. 2010a;17(4):503–510.
- Ayuso E, Mingozzi F, Bosch F. Production, purification and characterization of adeno-associated vectors. *Current gene therapy*. 2010b;10(6):423–436.
- Bach G, Friedman R, Weissmann B, Neufeld EF. The defect in the Hurler and Scheie syndromes: deficiency of -L-iduronidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1972;69(8):2048–2051.
- Baehner F et al. Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. *Journal of inherited metabolic disease*. 2005;28(6):1011–7.
- Bame KJ. Heparanases: endoglycosidases that degrade heparan sulfate proteoglycans. *Glycobiology*. 2001;11(6):91R–98R.
- Bax MC, Colville GA. Behaviour in mucopolysaccharide disorders. *Archives of disease in childhood*. 1995;73(1):77–81.
- Beesley CE et al. Discovery of a new biomarker for the mucopolysaccharidoses (MPS), dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV; CD26), by SELDI-TOF mass spectrometry. *Molecular genetics and metabolism*. 2009;96(4):218–224.

- Beesley CE, Young EP, Vellodi A, Winchester BG. Mutational analysis of Sanfilippo syndrome type A (MPS IIIA): identification of 13 novel mutations. *Journal of medical genetics*. 2000;37(9):704–717.
- Begley DJ, Pontikis CC, Scarpa M. Lysosomal storage diseases and the blood-brain barrier. *Current pharmaceutical design*. 2008;14(16):1566–1580.
- Bell CL et al. The AAV9 receptor and its modification to improve in vivo lung gene transfer in mice. *The journal of clinical investigation*. 2011;121(6):2427–2435.
- Bevan AK et al. Systemic gene delivery in large species for targeting spinal cord, brain, and peripheral tissues for pediatric disorders. *Molecular therapy*. 2011;19(11):1971–1980.
- Bhattacharyya R, Gliddon B, Beccari T, Hopwood JJ, Stanley P. A novel missense mutation in lysosomal sulfamidase is the basis of MPS III A in a spontaneous mouse mutant. *Glycobiology*. 2001;11(1):99–103.
- Bhaumik M et al. A mouse model for mucopolysaccharidosis type III A (Sanfilippo syndrome). *Glycobiology*. 1999;9(12):1389–1396.
- Bielicki J, Freeman C, Clements PR, Hopwood JJ. Human liver iduronate-2-sulphatase. Purification, characterization and catalytic properties. *The biochemical journal*. 1990;271(1):75–86.
- Bielicki J, Hopwood J, Anson D. Correction of Sanfilippo A skin fibroblasts by retroviral vector-mediated gene transfer. *Human gene therapy*. 1996;7(16):1965–1970.
- Bielicki J, Hopwood JJ, Melville EL, Anson DS. Recombinant human sulphamidase : expression, amplification, purification and characterization. *The biochemical journal*. 1998;329(Pt 1):145–150.
- Biffi A et al. Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficits in mice. *The journal of clinical investigation*. 2006;116(11):3070–3082.
- Biffi A et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science*. 2013;341(6148):1233–1238.
- Binny C et al. AAV-mediated gene transfer in the perinatal period results in expression of FVII at levels that protect against fatal spontaneous hemorrhage. *Blood*. 2012;119(4):957–966.
- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*. 1979;7(6):1513–23.
- Bond CS et al. Structure of a human lysosomal sulfatase. *Structure*. 1997;5(2):277–289.
- Boutin S et al. Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population : implications for gene therapy using AAV vectors. *Human Gene Therapy*. 2010;21(6):704–712.
- Brain Development Cooperative Group. Total and regional brain volumes in a population-based normative sample from 4 to 18 years: the NIH MRI Study of Normal Brain Development. *Cerebral cortex*. 2012;22(1):1–12.

- Bredt DS, Nicoll RA. AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron*. 2003;40(2):361–379.
- Brodbelt A, Stoodley M. CSF pathways: a review. *British journal of neurosurgery*. 2007;21(5):510–20.
- Bucher T et al. Intracisternal delivery of AAV9 results in oligodendrocyte and motor neuron transduction in the whole central nervous system of cats. *Gene therapy*. 2014;21(5):522–528.
- Buchlis G et al. Factor IX expression in skeletal muscle of a severe hemophilia B patient 10 years after AAV-mediated gene transfer. *Blood*. 2012;119(13):3038–3041.
- Bunge S et al. Identification of 16 sulfamidase gene mutations including the common R74C in patients with mucopolysaccharidosis type IIIA (Sanfilippo A). *Human mutation*. 1997;10(6):479–485.
- Büning H, Perabo L, Coutelle O, Quadt-Humme S, Hallek M. Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *The journal of gene medicine*. 2008;10(7):717–733.
- Calcedo R et al. Adeno-associated virus antibody profiles in newborns, children, and adolescents. *Clinical and vaccine immunology*. 2011;18(9):1586–1588.
- Calcedo R, Vandenberghe LH, Gao G, Lin J, Wilson JM. Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *The journal of infectious diseases*. 2009;199(3):381–390.
- Canuel M, Korkidakis A, Konnyu K, Morales CR. Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;373(2):292–297.
- Capila I, Linhardt RJ. Heparin-protein interactions. *Angewandte Chemie (International ed in English)*. 2002;41(3):391–412.
- Carter PJ, Samulski RJ. Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles. *International journal of molecular medicine*. 2000;6(1):17–27.
- Cearley CN, Wolfe JH. Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. *Molecular therapy*. 2006;13(3):528–537.
- Cheng SH. Gene therapy for the neurological manifestations in lysosomal storage disorders. *Journal of lipid research*. [published online ahead of print: March 29, 2014]; doi:10.1194/jlr.R047175
- Christine CW et al. Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology*. 2009;73(20):1662–1669.
- Ciron C et al. AAV1-, AAV2- and AAV5-mediated human alpha-Iduronidase gene transfer in the brain of nonhuman primate: vector diffusion and biodistribution. *Human gene therapy*. 2009; 20:350-60.

- Ciron C et al. Gene therapy of the brain in the dog model of Hurler's syndrome. *Annals of neurology*. 2006;60(2):204–213.
- Civallero G et al. Reliable detection of mucopolysacchariduria in dried-urine filter paper samples. *Clinica chimica acta*. 2013a;415:334–336.
- Civallero G, de Mari J, Viapiana Camelier M, Burin M, Giugliani R. Assay of heparan-N-sulfamidase in dried leukocytes impregnated in filter paper: a new tool for the identification of mucopolisaccharidosis IIIA and potentially other lysosomal disorders. *Molecular genetics and metabolism*. 2013b;108(4):267–268.
- Clarke LA et al. Long-term efficacy and safety of laronidase in the treatment of mucopolysaccharidosis I. *Pediatrics*. 2009;123(1):229–240.
- Cleary MA, Wraith JE. Management of mucopolysaccharidosis type III. *Archives of disease in childhood*. 1993;69(3):403–406.
- Coelho JC, Wajner M, Burin MG, Vargas CR, Giugliani R. Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *European journal of pediatrics*. 1997;156(8):650–654.
- Colle MA et al. Efficient intracerebral delivery of AAV5 vector encoding human ARSA in non-human primate. *Human molecular genetics*. 2010;19(1):147–158.
- Colpan ME, Slavin K V. Subthalamic and red nucleus volumes in patients with Parkinson's disease: do they change with disease progression?. *Parkinsonism & related disorders*. 2010;16(6):398–403.
- Constantopoulos G, Iqbal K, Dekaban AS. Mucopolysaccharidosis types IH, IS, II, and IIIA: glycosaminoglycans and lipids of isolated brain cells and other fractions from autopsied tissues. *Journal of neurochemistry*. 1980;34(6):1399–1411.
- Cook AM, Mieure KD, Owen RD, Pesaturo AB, Hatton J. Intracerebroventricular administration of drugs. *Pharmacotherapy*. 2009;29(7):832–845.
- Cosma MP et al. The multiple sulfatase deficiency gene encodes an essential and limiting factor for the activity of sulfatases. *Cell*. 2003;113(4):445–456.
- Costanzi E et al. Gene encoding the mouse sulphamidase: cDNA cloning, structure, and chromosomal mapping. *Mammalian genome*. 2000;11(6):436–439.
- Crawley AC et al. Characterization of a C57BL/6 congenic mouse strain of mucopolysaccharidosis type IIIA. *Brain research*. 2006;1104(1):1–17.
- Crawley AC et al. Enzyme replacement reduces neuropathology in MPS IIIA dogs. *Neurobiology of disease*. 2011;43(2):422–434.
- Cressant A et al. Improved behavior and neuropathology in the mouse model of Sanfilippo type IIIB disease after adeno-associated virus-mediated gene transfer in the striatum. *The Journal of neuroscience*. 2004;24(45):10229–10239.

Davidoff AM, Ng CY, Zhou J, Spence Y, Nathwani AC. Sex significantly influences transduction of murine liver by recombinant adeno-associated viral vectors through an androgen-dependent pathway. *Blood*. 2003;102(2):480–488.

Davidson BL, McCray PB. Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nature reviews. Genetics*. 2011;12(5):329–340.

Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clinical microbiology reviews*. 2008;21(4):583–593.

de Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *The biochemical journal*. 1955;60(4):604–617.

de Jong JG, Wevers RA, Laarakkers C, Poorthuis BJ. Dimethylmethylene blue-based spectrophotometry of glycosaminoglycans in untreated urine: a rapid screening procedure for mucopolysaccharidoses. *Clinical chemistry*. 1989;35(7):1472–1477.

de Ruijter J et al. Genistein in Sanfilippo disease: a randomized controlled crossover trial. *Annals of neurology*. 2012b;71(1):110–120.

de Ruijter J et al. Heparan sulfate and dermatan sulfate derived disaccharides are sensitive markers for newborn screening for mucopolysaccharidoses types I, II and III. *Molecular genetics and metabolism*. 2012a;107(4):705–710.

Delgadillo V, O'Callaghan M del M, Artuch R, Montero R, Pineda M. Genistein supplementation in patients affected by Sanfilippo disease. *Journal of inherited metabolic disease*. 2011;34(5):1039–1044.

Delgadillo V, O'Callaghan M del M, Gort L, Coll MJ, Pineda M. Natural history of Sanfilippo syndrome in Spain. *Orphanet journal of rare diseases*. 2013;8:189.

Di Domenico C et al. Intracranial gene delivery of LV-NAGLU vector corrects neuropathology in murine MPS IIIB. *American journal of medical genetics*. 2009;149A(6):1209–1218.

Di Natale P et al. Treatment of the mouse model of mucopolysaccharidosis type IIIB with lentiviral-NAGLU vector. *The biochemical journal*. 2005;388(Pt 2):639–646.

Di Natale P, Balzano N, Esposito S, Villani GR. Identification of molecular defects in Italian Sanfilippo A patients including 13 novel mutations. *Human mutation*. 1998;11(4):313–320.

Di Natale P, Vanacore B, Daniele A, Esposito S. Heparan N-sulfatase: in vitro mutagenesis of potential N-glycosylation sites. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;280(5):1251–1257.

Di Natale P, Villani G. Analysis of Sanfilippo A gene mutations in a large pedigree. *Clinical genetics*. 2003;63(4):314–318.

Donsante A, Levy B, Vogler C, Sands MS. Clinical response to persistent, low-level beta-glucuronidase expression in the murine model of mucopolysaccharidosis type VII. *Journal of inherited metabolic disease*. 2007;30(2):227–238.

- Dreyfuss JL et al. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2009;81(3):409–429.
- Duque S et al. Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Molecular therapy*. 2009;17(7):1187–1196.
- Ellinwood NM et al. Safe, efficient, and reproducible gene therapy of the brain in the dog models of Sanfilippo and Hurler Syndromes. *Molecular therapy*. 2011;19(2):251–259.
- Elstein D et al. Sustained therapeutic effects of oral miglustat (Zavesca, N-butyldeoxynojirimycin, OGT 918) in type I Gaucher disease. *Journal of inherited metabolic disease*. 2004;27(6):757–766.
- Emre S et al. Sanfilippo syndrome in Turkey: Identification of novel mutations in subtypes A and B. *Human mutation*. 2002;19(2):184–185.
- Enns GM, Huhn SL. Central nervous system therapy for lysosomal storage disorders. *Neurosurgical focus*. 2008;24(3-4):1–12.
- Federici T et al. Robust spinal motor neuron transduction following intrathecal delivery of AAV9 in pigs. *Gene therapy*. 2012;19(8):852–859.
- Feldhammer M, Durand S, Pshezhetsky A V. Protein misfolding as an underlying molecular defect in mucopolysaccharidosis III type C. *PloS one*. 2009;4(10):e7434.
- Ferla R et al. Gene therapy for mucopolysaccharidosis type VI is effective in cats without pre-existing immunity to AAV8. *Human gene therapy*. 2013;24(2):163–169.
- Fischer A et al. Sulfamidase deficiency in a family of Dachshunds: a canine model of mucopolysaccharidosis IIIA (Sanfilippo A). *Pediatric research*. 1998;44(1):74–82.
- Foust KD et al. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nature biotechnology*. 2009;27(1):59–65.
- Foust KD et al. Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nature biotechnology*. 2010;28(3):271–274.
- Fraldi A et al. Functional correction of CNS lesions in an MPS-IIIa mouse model by intracerebral AAV-mediated delivery of sulfamidase and SUMF1 genes. *Human molecular genetics*. 2007b;16(22):2693–2702.
- Fraldi A et al. SUMF1 enhances sulfatase activities in vivo in five sulfatase deficiencies. *The Biochemical journal*. 2007a;403(2):305–312.
- Fraser J, Gason AA, Wraith JE, Delatycki MB. Sleep disturbance in Sanfilippo syndrome: a parental questionnaire study. *Archives of disease in childhood*. 2005;90(12):1239–1242.
- Fu H et al. Significantly increased lifespan and improved behavioral performances by rAAV gene delivery in adult mucopolysaccharidosis IIIB mice. *Gene therapy*. 2007;14(14):1065–1077.

- Fu H, DiRosario J, Kang L, Muenzer J, McCarty DM. Restoration of central nervous system alpha-N-acetylglucosaminidase activity and therapeutic benefits in mucopolysaccharidosis IIIB mice by a single intracisternal recombinant adeno-associated viral type 2 vector delivery. *The journal of gene medicine*. 2010;12(7):624–633.
- Fu H, Dirosario J, Killedar S, Zaraspe K, McCarty DM. Correction of neurological disease of mucopolysaccharidosis IIIB in adult mice by rAAV9 trans-blood-brain barrier gene delivery. *Molecular therapy*. 2011;19(6):1025–1033.
- Fuller M, Meikle PJ, Hopwood JJ. Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford PharmaGenesis; 2006. Chapter 2
- Fuller M, Rozaklis T, Ramsay SL, Hopwood JJ, Meikle PJ. Disease-specific markers for the mucopolysaccharidoses. *Pediatric research*. 2004;56(5):733–738.
- Futerman AH, van Meer G. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004;5(7):554–565.
- Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? *Trends in immunology*. 2007;28(1):12–18.
- Garbuzova-Davis S et al. Blood-brain barrier impairment in MPS III patients. *BMC Neurology*. 2013;13:174.
- Garcia AR, DaCosta JM, Pan J, Muenzer J, Lamsa JC. Preclinical dose ranging studies for enzyme replacement therapy with idursulfase in a knock-out mouse model of MPS II. *Molecular genetics and metabolism*. 2007;91(2):183–190.
- Gliddon BL, Hopwood JJ. Enzyme-replacement therapy from birth delays the development of behavior and learning problems in mucopolysaccharidosis type IIIA mice. *Pediatric research*. 2004;56(1):65–72.
- Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, Schneider WJ. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annual review of cell biology*. 1985;1(1):1–39.
- Gonzalez-Noriega A, Grubb JH, Talkad V, Sly WS. Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling. *The journal of cell biology*. 1980;85(3):839–852.
- Gray SJ et al. Preclinical differences of intravascular AAV9 delivery to neurons and glia: a comparative study of adult mice and nonhuman primates. *Molecular therapy*. 2011;19(6):1058–1069.
- Gray SJ, Nagabhushan Kalburgi S, McCown TJ, Samulski RJ. Global CNS gene delivery and evasion of anti-AAV-neutralizing antibodies by intrathecal AAV administration in non-human primates. *Gene therapy*. 2013;20(4):450–459.
- Griffiths G, Hoflack B, Simons K, Mellman I, Kornfeld S. The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell*. 1988;52(3):329–341.

Guerrero JM, Pozo D, Diaz-Rodriguez JL, Martinez-Cruz F, Vela-Campos F. Impairment of the melatonin rhythm in children with Sanfilippo syndrome. *Journal of pineal research*. 2006;40(2):192–193.

Guffon N et al. Evaluation of miglustat treatment in patients with type III mucopolysaccharidosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *The journal of pediatrics*. 2011;159(5):838–844.e1.

Häcker U, Nybakken K, Perrimon N. Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(7):530–541.

Hamano K, Hayashi M, Shioda K, Fukatsu R, Mizutani S. Mechanisms of neurodegeneration in mucopolysaccharidoses II and IIIB: analysis of human brain tissue. *Acta neuropathologica*. 2008;115(5):547–559.

Harmatz P et al. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: a phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled, multinational study of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase (recombinant human arylsulfatase B or rhASB) and follow-on, open-l. *The journal of pediatrics*. 2006;148(4):533–539.

Harmatz P et al. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: evaluation of long-term pulmonary function in patients treated with recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. *Journal of inherited metabolic disease*. 2010;33(1):51–60.

He W et al. Prenatal diagnosis of Sanfilippo disease type C using a simple fluorometric enzyme assay. *Prenatal diagnosis*. 1994;14(1):17–22.

He W, Voznyi YaV, Boer AM, Kleijer WJ, van Diggelen OP. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Sanfilippo disease type D (MPS IIID). *Journal of inherited metabolic disease*. 1993;16(6):935–941.

Heldermon CD et al. Disease correction by combined neonatal intracranial AAV and systemic lentiviral gene therapy in Sanfilippo Syndrome type B mice. *Gene therapy*. 2013;20(9):913–921.

Heldermon CD et al. Therapeutic efficacy of bone marrow transplant, intracranial AAV-mediated gene therapy, or both in the mouse model of MPS IIIB. *Molecular therapy*. 2010;18(5):873–880.

Hemsley KM et al. Effect of cisternal sulfamidase delivery in MPS IIIA Huntaway dogs--a proof of principle study. *Molecular genetics and metabolism*. 2009b;98(4):383–392.

Hemsley KM et al. Examination of intravenous and intra-CSF protein delivery for treatment of neurological disease. *The European journal of neuroscience*. 2009a;29(6):1197–1214.

Hemsley KM, Beard H, King BM, Hopwood JJ. Effect of high dose, repeated intra-CSF injection of sulphamidase on neuropathology in MPS IIIA mice. *Genes, brain and behavior*. 2008;7(7):740–753.

- Hemsley KM, Hopwood JJ. Development of motor deficits in a murine model of mucopolysaccharidosis type IIIA (MPS-III A). *Behavioural brain research*. 2005;158(2):191–199.
- Hemsley KM, Hopwood JJ. Lessons learnt from animal models: pathophysiology of neuropathic lysosomal storage disorders. *Journal of inherited metabolic disease*. 2010;33(4):363–371.
- Hermann DS. Anatomy of the globe, Basic and Clinical Science Course. AAO, 2009: 43-92.
- Héron B et al. Incidence and natural history of mucopolysaccharidosis type III in France and comparison with United Kingdom and Greece. *American journal of medical genetics*. 2011;155A(1):58–68.
- Hers H. α -Glucosidase deficiency in generalized glycogen-storage disease (Pompe's Disease). *Biochemical journal*. 1963;86(1):11–16.
- Hickman S, Neufeld EF. A hypothesis for I-cell disease: defective hydrolases that do not enter lysosomes. *Biochemical and biophysical research communications*. 1972;49(4):992–999.
- Hopwood JJ. Prenatal diagnosis of Sanfilippo syndrome. *Prenatal diagnosis*. 2005;25(2):148–150.
- Hua CT, Hopwood JJ, Carlsson SR, Harris RJ, Meikle PJ. Evaluation of the lysosome-associated membrane protein LAMP-2 as a marker for lysosomal storage disorders. *Clinical chemistry*. 1998;44(10):2094–2102.
- Inagaki K et al. Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Molecular therapy*. 2006;14(1):45–53.
- Jeyakumar M et al. Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis. *Brain*. 2003;126(Pt 4):974–987.
- Jiang H et al. Effects of transient immunosuppression on adenoassociated, virus-mediated, liver-directed gene transfer in rhesus macaques and implications for human gene therapy. *Blood*. 2006;108(10):3321–3328.
- Jolly RD et al. Mucopolysaccharidosis IIIA (Sanfilippo syndrome) in a New Zealand Huntaway dog with ataxia. *New Zealand veterinary journal*. 2000;48(5):144–148.
- Jolly RD, Johnstone AC, Norman EJ, Hopwood JJ, Walkley SU. Pathology of mucopolysaccharidosis IIIA in Huntaway dogs. *Veterinary pathology*. 2007;44(5):569–578.
- Kaludov N, Brown KE, Walters RW, Zabner J, Chiorini JA. Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity. *Journal of virology*. 2001;75(15):6884–6893.
- Kaplitt MG et al. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet*. 2007;369(9579):2097–2105.

- Karageorgos LE et al. Structure and sequence of the human sulphamidase gene. *DNA research*. 1996;3(4):269–71.
- Karpova EA et al. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Sanfilippo disease type A (MPS IIIA). *Journal of inherited metabolic disease*. 1996;19(3):278–285.
- Kay MA. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nature reviews Genetics*. 2011;12(5):316–328.
- King B, Savas P, Fuller M, Hopwood J, Hemsley K. Validation of a heparan sulfate-derived disaccharide as a marker of accumulation in murine mucopolysaccharidosis type IIIA. *Molecular genetics and metabolism*. 2006;87(2):107–112.
- King JA, Dubielzig R, Grimm D, Kleinschmidt JA. DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *The EMBO journal*. 2001;20(12):3282–3291.
- Kint JA, Dacremont G, Carton D, Orye E, Hooft C. Mucopolysaccharidosis: secondarily induced abnormal distribution of lysosomal isoenzymes. *Science*. 1973;181(4097):352–354.
- Kjellén L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annual review of biochemistry*. 1991;60:443–475.
- Klein RL, Dayton RD, Tatom JB, Henderson KM, Henning PP. AAV8, 9, Rh10, Rh43 vector gene transfer in the rat brain: effects of serotype, promoter and purification method. *Molecular therapy*. 2008;16(1):89–96.
- Klein U, Kresse H, von Figura K. Sanfilippo syndrome type C: deficiency of acetyl-CoA:alpha-glucosaminide N-acetyltransferase in skin fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1978;75(10):5185–5189.
- Kloska A, Jakóbkiewicz-Banecka J, Narajczyk M, Banecka-Majkutewicz Z, Węgrzyn G. Effects of flavonoids on glycosaminoglycan synthesis: implications for substrate reduction therapy in Sanfilippo disease and other mucopolysaccharidoses. *Metabolic brain disease*. 2011;26(1):1–8.
- Kotin RM et al. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(6):2211–2215.
- Kowalewski B et al. Arylsulfatase G inactivation causes loss of heparan sulfate 3-O-sulfatase activity and mucopolysaccharidosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(26):10310–10315.
- Kresse H, Neufeld EF. The Sanfilippo A corrective factor. Purification and mode of action. *The journal of biological chemistry*. 1972;247(7):2164–2170.
- Kresse H, Paschke E, von Figura K, Gilberg W, Fuchs W. Sanfilippo disease type D: deficiency of N-acetylglucosamine-6-sulfate sulfatase required for heparan sulfate degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980;77(11):6822–6826.

- Kresse H, Wiesmann U, Cantz M, Hall CW, Neufeld EF. Biochemical heterogeneity of the Sanfilippo syndrome: preliminary characterization of two deficient factors. *Biochemical and biophysical research communications*. 1971;42(5):892–898.
- Krivit W, Sung JH, Shapiro EG, Lockman LA. Microglia: the effector cell for reconstitution of the central nervous system following bone marrow transplantation for lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Cell transplantation*. 4(4):385–92.
- Kurihara M, Kumagai K, Yagishita S. Sanfilippo syndrome type C: a clinicopathological autopsy study of a long-term survivor. *Pediatric neurology*. 1996;14(4):317–321.
- Langford-Smith A et al. Hematopoietic stem cell and gene therapy corrects primary neuropathology and behavior in mucopolysaccharidosis IIIA mice. *Molecular therapy*. 2012;20(8):1610–1621.
- Lau AA, Crawley AC, Hopwood JJ, Hemsley KM. Open field locomotor activity and anxiety-related behaviors in mucopolysaccharidosis type IIIA mice. *Behavioural brain research*. 2008;191(1):130–136.
- Lawrence R et al. Disease-specific non-reducing end carbohydrate biomarkers for mucopolysaccharidoses. *Nature Chemical Biology*. 2012;8(2):197–204.
- Lawrence R et al. Glycan-based biomarkers for mucopolysaccharidoses. *Molecular genetics and metabolism*. 2014;111(2):73–83.
- Lefrancois S, Zeng J, Hassan AJ, Canuel M, Morales CR. The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *The EMBO journal*. 2003;22(24):6430–6437.
- Leone P et al. Long-term follow-up after gene therapy for canavan disease. *Science translational medicine*. 2012;4(165):165ra163.
- LeWitt PA et al. AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet neurology*. 2011;10(4):309–319.
- Li C et al. Neutralizing antibodies against adeno-associated virus examined prospectively in pediatric patients with hemophilia. *Gene therapy*. 2012;19(3):288–294.
- Li HH, Zhao H-Z, Neufeld EF, Cai Y, Gómez-Pinilla F. Attenuated plasticity in neurons and astrocytes in the mouse model of Sanfilippo syndrome type B. *Journal of neuroscience research*. 2002;69(1):30–38.
- Liu G, Martins I, Wemmie JA, Chiorini JA, Davidson BL. Functional correction of CNS phenotypes in a lysosomal storage disease model using adeno-associated virus type 4 vectors. *Journal of neuroscience*. 2005;25(41):9321–9327.
- Lock M et al. Characterization of a recombinant adeno-associated virus type 2 Reference Standard Material. *Human gene therapy*. 2010;21(10):1273–1285.
- Lowry RB, Applegarth DA, Toone JR, MacDonald E, Thunem NY. An update on the frequency of mucopolysaccharide syndromes in British Columbia. *Human genetics*. 1990;85(3):389–390.

- Maguire AM et al. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2009;374(9701):1597–1605.
- Malinová V, Wegrzyn G, Narajczyk M. The use of elevated doses of genistein-rich soy extract in the gene expression-targeted isoflavone therapy for Sanfilippo disease patients. *JIMD Reports*. 2012;5:21–25.
- Malm G, Lund AM, Månsson J-E, Heiberg A. Mucopolysaccharidoses in the Scandinavian countries: incidence and prevalence. *Acta paediatrica*. 2008;97(11):1577–1581.
- Malm G, Månsson JE. Mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo disease) in Sweden: clinical presentation of 22 children diagnosed during a 30-year period. *Acta paediatrica*. 2010;99(8):1253–1257.
- Manno CS et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nature medicine*. 2006;12(3):342–347.
- Marks WJ et al. Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet neurology*. 2010;9(12):1164–1172.
- Marsh J, Fensom AH. 4-Methylumbelliferyl alpha-N-acetylglucosaminidase activity for diagnosis of Sanfilippo B disease. *Clinical genetics*. 1985;27(3):258–262.
- Matsushita T et al. Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene therapy*. 1998;5(7):938–945.
- McCarty DM, DiRosario J, Gulaid K, Muenzer J, Fu H. Mannitol-facilitated CNS entry of rAAV2 vector significantly delayed the neurological disease progression in MPS IIIB mice. *Gene therapy*. 2009;16(11):1340–1352.
- McGlynn R, Dobrenis K, Walkley SU. Differential subcellular localization of cholesterol, gangliosides, and glycosaminoglycans in murine models of mucopolysaccharide storage disorders. *The journal of comparative neurology*. 2004;480(4):415–426.
- McIntyre C et al. Lentiviral-mediated gene therapy for murine mucopolysaccharidosis type IIIA. *Molecular genetics and metabolism*. 2008;93(4):411–418.
- McIntyre C, Byers S, Anson DS. Correction of mucopolysaccharidosis type IIIA somatic and central nervous system pathology by lentiviral-mediated gene transfer. *The journal of gene medicine*. 2010;12(9):717–728.
- Meikle PJ et al. Diagnosis of lysosomal storage disorders: evaluation of lysosome-associated membrane protein LAMP-1 as a diagnostic marker. *Clinical chemistry*. 1997;43(8 Pt 1):1325–1335.
- Meikle PJ, Hopwood J, Clague A, Carey W. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 1999;281(3):249–254.
- Meyer A et al. Scoring evaluation of the natural course of mucopolysaccharidosis type IIIA (Sanfilippo syndrome type A). *Pediatrics*. 2007;120(5):e1255–61.

- Meyer A et al. The mutation p.Ser298Pro in the sulphamidase gene (SGSH) is associated with a slowly progressive clinical phenotype in mucopolysaccharidosis type IIIA (Sanfilippo A syndrome). *Human mutation*. 2008;29(5):770.
- Michelakakis H et al. Lysosomal storage diseases in Greece. *Genetic counseling*. 1995;6(1):43–47.
- Mietzsch M, Broecker F, Reinhardt A, Seeberger PH, Heilbronn R. Differential adeno-associated virus serotype-specific interaction patterns with synthetic heparins and other glycans. *Journal of virology*. 2014;88(5):2991–3003.
- Mingozzi F et al. CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nature medicine*. 2007a;13(4):419–22.
- Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood*. 2013;122(1):23–36.
- Mingozzi F. Modulation of tolerance to the transgene product in a nonhuman primate model of AAV-mediated gene transfer to liver. *Blood*. 2007b;110(7):2334–2341.
- Monteilhet V et al. A 10 patient case report on the impact of plasmapheresis upon neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 6, and 8. *Molecular therapy*. 2011;19(11):2084–2091.
- Montfort M et al. Mutation 1091delC is highly prevalent in Spanish Sanfilippo syndrome type A patients. *Human mutation*. 1998;12(4):274–279.
- Muenzer J et al. Idursulfase treatment of Hunter syndrome in children younger than 6 years: results from the Hunter Outcome Survey. *Genetics in medicine*. 2011a;13(2):102–109.
- Muenzer J et al. Long-term, open-labeled extension study of idursulfase in the treatment of Hunter syndrome. *Genetics in medicine*. 2011b;13(2):95–101.
- Muenzer J, Guzsavas-Calikoglu M, McCandless SE, Schuetz TJ, Kimura A. A phase I/II clinical trial of enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Molecular genetics and metabolism*. 2007;90(3):329–337.
- Muenzer J. Mucopolysaccharidoses. *Advances in pediatrics*. 1986;33:269–302.
- Muenzer J. Overview of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology*. 2011c;50(5):v4–12.
- Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science*. 1993;260(5110):926–932.
- Murphy SL, Li H, Zhou S, Schlachterman A, High KA. Prolonged susceptibility to antibody-mediated neutralization for adeno-associated vectors targeted to the liver. *Molecular therapy*. 2008;16(1):138–145.
- Muschol N et al. Residual activity and proteasomal degradation of p.Ser298Pro sulfamidase identified in patients with a mild clinical phenotype of Sanfilippo A syndrome. *American journal of medical genetics*. 2011;155A(7):1634–1639.

- Muschol N et al. Transport, enzymatic activity, and stability of mutant sulfamidase (SGSH) identified in patients with mucopolysaccharidosis type III A. *Human Mutation*. 2004;23(6):559–566.
- Nathwani A et al. Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. *Blood*. 2006;107(7):2653–2661.
- Nathwani AC et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in Hemophilia B. *The new england journal of medicine*. 2011;365(25):2357–2365.
- Nelson J, Crowhurst J, Carey B, Greed L. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Western Australia. *American journal of medical genetics*. 2003;123A(3):310–313.
- Nelson J. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Northern Ireland. *Human genetics*. 1997;101(3):355–358.
- Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. In: Schriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D eds. *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill; 2001:3421–3452
- Niemeyer GP et al. Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood*. 2009;113(4):797–806.
- Nienhuis AW. Development of gene therapy for blood disorders: an update. *Blood*. 2013;122(9):1556–1564.
- Nixon RA, Yang D-S, Lee J-H. Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age. *Autophagy*. 2008;4(5):590–599.
- Noh H, Lee JI. Current and potential therapeutic strategies for mucopolysaccharidoses. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. 2014;39(3):215–224.
- Ohmi K et al. Sanfilippo syndrome type B, a lysosomal storage disease, is also a tauopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(20):8332–8337.
- Pañeda A et al. Effect of adeno-associated virus serotype and genomic structure on liver transduction and biodistribution in mice of both genders. *Human gene therapy*. 2009;20(8):908–917.
- Parenti G, Pignata C, Vajro P, Salerno M. New strategies for the treatment of lysosomal storage diseases (review). *International journal of molecular medicine*. 2013;31(1):11–20.
- Passini MA et al. Intraventricular brain injection of adeno-associated virus type 1 (AAV1) in neonatal mice results in complementary patterns of neuronal transduction to AAV2 and total long-term correction of β -glucuronidase-deficient mice. *Journal of virology*. 2003;77(12):7034–7040.
- Pereira DJ, McCarty DM, Muzyczka N. The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *Journal of virology*. 1997;71(2):1079–1088.

Perkins KJ, Byers S, Yogalingam G, Weber B, Hopwood JJ. Expression and characterization of wild type and mutant recombinant human sulfamidase. Implications for Sanfilippo (Mucopolysaccharidosis IIIA) syndrome. *The journal of biological chemistry*. 1999;274(52):37193–37199.

Peters C et al. Outcome of unrelated donor bone marrow transplantation in 40 children with Hurler syndrome. *Blood*. 1996;87(11):4894–4902.

Peters C, Steward CG. Hematopoietic cell transplantation for inherited metabolic diseases: an overview of outcomes and practice guidelines. *Bone marrow transplantation*. 2003;31(4):229–239.

Piatt JHBK. Technique of Ventriculostomy, In: Rengachary S WR, ed. *Neurosurgical Operative Atlas*. Chicago: The American Association of Neurological Surgeons, 1991: 171-175.

Pineda M et al. Clinical experience with miglustat therapy in pediatric patients with Niemann-Pick disease type C: a case series. *Molecular genetics and metabolism*. 2010;99(4):358–366.

Pinto R et al. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *European journal of human genetics*. 2004;12(2):87–92.

Piotrowska E et al. Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis as a basis for gene expression-targeted isoflavone therapy for mucopolysaccharidoses. *European journal of human genetics*. 2006;14(7):846–852.

Piotrowska E et al. Two-year follow-up of Sanfilippo Disease patients treated with a genistein-rich isoflavone extract: assessment of effects on cognitive functions and general status of patients. *Medical science monitor*. 2011;17(4):196–202.

Platt FM, Boland B, van der Spoel AC. The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *The journal of cell biology*. 2012;199(5):723–734.

Platt FM, Neises GR, Karlsson GB, Dwek RA, Butters TD. N-butyldeoxygalactonojirimycin inhibits glycolipid biosynthesis but does not affect N-linked oligosaccharide processing. *The journal of biological chemistry*. 1994;269(43):27108–27114.

Poorthuis BJ et al. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Human genetics*. 1999;105(1-2):151–156.

Poupetová H et al. The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations. *Journal of inherited metabolic disease*. 2010;33(4):387–396.

Prasad VK et al. Unrelated donor umbilical cord blood transplantation for inherited metabolic disorders in 159 pediatric patients from a single center: influence of cellular composition of the graft on transplantation outcomes. *Blood*. 2008;112(7):2979–2989.

Rabinowitz JE et al. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *Journal of virology*. 2002;76(2):791–801.

- Randall DR et al. Heparin cofactor II-thrombin complex: a biomarker of MPS disease. *Molecular genetics and metabolism*. 2008;94(4):456–461.
- Reczek D et al. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell*. 2007;131(4):770–783.
- Reitman ML, Kornfeld S. UDP-N-acetylglucosamine:glycoprotein N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. Proposed enzyme for the phosphorylation of the high mannose oligosaccharide units of lysosomal enzymes. *The journal of biological chemistry*. 1981;256(9):4275–4281.
- Roberts ALK, Fletcher JM, Moore L, Byers S. Trans-generational exposure to low levels of rhodamine B does not adversely affect litter size or liver function in murine mucopolysaccharidosis type IIIA. *Molecular genetics and metabolism*. 2010;101(2-3):208–213.
- Roberts ALK, Rees MH, Klebe S, Fletcher JM, Byers S. Improvement in behaviour after substrate deprivation therapy with rhodamine B in a mouse model of MPS IIIA. *Molecular genetics and metabolism*. 2007;92(1-2):115–121.
- Robertson SP, Klug GL, Rogers JG. Cerebrospinal fluid shunts in the management of behavioural problems in Sanfilippo syndrome (MPS III). *European journal of pediatrics*. 1998;157(8):653–655.
- Ruijter GJ et al. Clinical and genetic spectrum of Sanfilippo type C (MPS IIIC) disease in The Netherlands. *Molecular genetics and metabolism*. 2008;93(2):104–111.
- Ruzo A et al. Correction of pathological accumulation of glycosaminoglycans in central nervous system and peripheral tissues of MPSIIIA mice through systemic AAV9 gene transfer. *Human gene therapy*. 2012b;23(12):1237–1246.
- Ruzo A et al. Liver production of sulfamidase reverses peripheral and ameliorates CNS pathology in mucopolysaccharidosis IIIA mice. *Molecular therapy*. 2012a;20(2):254–266.
- Ruzo A. Gene therapies approaches for Mucopolysaccharidosis IIIA. Thesis. 2010.
- Samaranch L et al. Adeno-associated virus serotype 9 transduction in the central nervous system of nonhuman primates. *Human gene therapy*. 2012;23(4):382–389.
- Samaranch L et al. Strong cortical and spinal cord transduction after AAV7 and AAV9 delivery into the cerebrospinal fluid of nonhuman primates. *Human gene therapy*. 2013;24(5):526–532.
- Samulski RJ et al. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *The EMBO journal*. 1991;10(12):3941–3950.
- Sands MS, Davidson BL. Gene therapy for lysosomal storage diseases. *Molecular therapy*. 2006;13(5):839–849.
- Sarkar S, Ravikumar B, Floto RA, Rubinsztein DC. Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies. *Cell death and differentiation*. 2009;16(1):46–56.

- Savas PS, Hemsley KM, Hopwood JJ. Intracerebral injection of sulfamidase delays neuropathology in murine MPS-III A. *Molecular genetics and metabolism*. 2004;82(4):273–285.
- Scallan CD et al. Human immunoglobulin inhibits liver transduction by AAV vectors at low AAV2 neutralizing titers in SCID mice. *Blood*. 2006;107(5):1810–1817.
- Scott HS et al. Cloning of the sulphamidase gene and identification of mutations in Sanfilippo A syndrome. *Nature genetics*. 1995;11(4):465–467.
- Settembre C et al. A block of autophagy in lysosomal storage disorders. *Human molecular genetics*. 2008;17(1):119–129.
- Shaklee PN, Glaser JH, Conrad HE. A sulfatase specific for glucuronic acid 2-sulfate residues in glycosaminoglycans. *The journal of biological chemistry*. 1985;260(16):9146–9149.
- Shapiro BE, Logigian EL, Kolodny EH, Pastores GM. Late-onset Tay-Sachs disease: the spectrum of peripheral neuropathy in 30 affected patients. *Muscle & nerve*. 2008;38(2):1012–1015.
- Shen S et al. Glycan binding avidity determines the systemic fate of adeno-associated virus type 9. *Journal of virology*. 2012;86(19):10408–10417.
- Shen S, Bryant KD, Brown SM, Randell SH, Asokan A. Terminal N-linked galactose is the primary receptor for adeno-associated virus 9. *The journal of biological chemistry*. 2011;286(15):13532–13540.
- Sidhu NS et al. Structure of sulfamidase provides insight into the molecular pathology of mucopolysaccharidosis IIIA. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2014;70(Pt 5):1321–1335.
- Sivakumur P, Wraith JE. Bone marrow transplantation in mucopolysaccharidosis type IIIA: A comparison of an early treated patient with his untreated sibling. *Journal of inherited metabolic disease*. 1999;22(7):849–850.
- Skubis-Zegadło J, Stachurska A, Małecki M. Virology of adeno-associated viruses (AAV). *Medycyna wieku rozwojowego*. 2013;17(3):202–206.
- Sly WS, Quinton BA, McAlister WH, Rimoin DL. Beta glucuronidase deficiency: report of clinical, radiologic, and biochemical features of a new mucopolysaccharidosis. *The journal of pediatrics*. 1973;82(2):249–257.
- Snyder BR et al. Comparison of adeno-associated viral vector serotypes for spinal cord and motor neuron gene delivery. *Human gene therapy*. 2011;22(9):1129–1135.
- Sondhi D et al. Enhanced survival of the LINCL mouse following CLN2 gene transfer using the rh.10 rhesus macaque-derived adeno-associated virus vector. *Molecular therapy*. 2007;15(3):481–491.
- Sondhi D et al. Long-term expression and safety of administration of AAVrh.10hCLN2 to the brain of rats and nonhuman primates for the treatment of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Human gene therapy methods*. 2012;23(5):324–335.

- Sorrentino NC et al. A highly secreted sulphamidase engineered to cross the blood-brain barrier corrects brain lesions of mice with mucopolysaccharidoses type IIIA. *EMBO molecular medicine*. 2013;5(5):675–690.
- Souweidane MM et al. Gene therapy for late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: neurosurgical considerations. *Journal of neurosurgery. Pediatrics*. 2010;6(2):115–122.
- Spada M et al. High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *American journal of human genetics*. 2006;79(1):31–40.
- Stenson PD et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Human mutation*. 2003;21(6):577–581.
- Summerford C, Samulski RJ. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *Journal of virology*. 1998;72(2):1438–1445.
- Swain GP et al. Adeno-associated virus serotypes 9 and rh10 mediate strong neuronal transduction of the dog brain. *Gene therapy*. 2014;21(1):28–36.
- Tamagawa K, Morimatsu Y, Fujisawa K, Hara A, Taketomi T. Neuropathological study and chemico-pathological correlation in sibling cases of Sanfilippo syndrome type B. *Brain & development*. 1985;7(6):599–609.
- Tardieu M et al. Intracerebral administration of Adeno-associated viral vector serotype rh.10 carrying human SGSH and SUMF1 cDNAs in children with Mucopolysaccharidosis type IIIA disease: results of a phase I/II trial. *Human Gene Therapy*. 2014;25:1–11.
- Terry K, Linker A. Distinction among four forms of Hurler's Syndrome. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine*. 1964;115:394–402.
- Treiber A, Morand O, Clozel M. The pharmacokinetics and tissue distribution of the glucosylceramide synthase inhibitor miglustat in the rat. *Xenobiotica*. 2007;37(3):298–314.
- Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature reviews Genetics*. 2010;11(9):636–646.
- Valenzano KJ et al. Identification and characterization of pharmacological chaperones to correct enzyme deficiencies in lysosomal storage disorders. *Assay and drug development technologies*. 2011;9(3):213–235.
- Valstar MJ et al. Mucopolysaccharidosis type IIIA: clinical spectrum and genotype-phenotype correlations. *Annals of neurology*. 2010a;68(6):876–887.
- Valstar MJ et al. Mucopolysaccharidosis type IIIB may predominantly present with an attenuated clinical phenotype. *Journal of inherited metabolic disease*. 2010b;33(6):759–767.
- Valstar MJ, Ruijter GJ, van Diggelen OP, Poorthuis BJ, Wijburg FA. Sanfilippo syndrome: A mini-review. *Journal of inherited metabolic disease*. 2008;31(2):240–252.

- van de Kamp JJ, Niermeijer MF, von Figura K, Giesberts MA. Genetic heterogeneity and clinical variability in the Sanfilippo syndrome (types A, B, and C). *Clinical genetics*. 1981;20(2):152–160.
- Varki A, Kornfeld S. Purification and characterization of rat liver alpha-N-acetylglucosaminyl phosphodiesterase. *The Journal of biological chemistry*. 1981;256(19):9937–9943.
- Vellodi A. Lysosomal storage disorders. *British journal of haematology*. 2005;128(4):413–431.
- von Figura K, Kresse H. The sanfilippo B corrective factor: a N-acetyl-alpha-D-glucosaminidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1972;48(2):262–269.
- Voznyi YaV et al. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Sanfilippo disease C (MPS III C). *Journal of inherited metabolic disease*. 1993;16(2):465–472.
- Waheedl A, Hasilik A, von Figura K. Processing of the phosphorylated recognition marker in lysosomal enzymes. Characterization and partial purification of a microsomal alpha-N-acetylglucosaminyl phosphodiesterase. *The Journal of biological chemistry*. 1981;256(11):5717–5721.
- Walkley S. Pathogenic cascades in lysosomal disease—Why so complex?. *Journal of inherited metabolic disease*. 2009;32(2):181–189.
- Walkley SU. Secondary accumulation of gangliosides in lysosomal storage disorders. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2004;15(4):433–444.
- Walters RW et al. Binding of adeno-associated virus type 5 to 2,3-linked sialic acid is required for gene transfer. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(23):20610–20616.
- Weber B et al. Identification of a common mutation (R245H) in Sanfilippo A patients from The Netherlands. *J Inherit Metab Dis*. 1998;21(4):416–422.
- Weber B et al. Novel mutations in Sanfilippo A syndrome: implications for enzyme function. *Human molecular genetics*. 1997;6(9):1573–1579.
- Weber B et al. Sanfilippo type B syndrome (mucopolysaccharidosis III B): allelic heterogeneity corresponds to the wide spectrum of clinical phenotypes. *European journal of human genetics*. 1999;7(1):34–44.
- Wijburg, F., De Ruijter, J., Breen, C., Heap, F., Baez, K., Nair, N., Jones, S., Haslett, P. (2013). Preliminary observations on the clinical and neuroimaging effects of intrathecal enzyme replacement therapy in patients with muco- polysaccharidosis type IIIA (MPSIIIA). Abstract Annual Clinical Genetic Meeting Phoenix, AZ. Available at <http://ww2.aievolution.com/acm1301/index.cfm?do=abs.viewAbs&abs=1513> (accès Mar. 21, 2013).
- Wilcox WR. Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *The Journal of pediatrics*. 2004;144(5 Suppl):S3–14.
- Wilkinson FL et al. Neuropathology in Mouse Models of Mucopolysaccharidosis Type I, IIIA and IIIB. *PloS one*. 2012;7(4):e35787.

Worgall S et al. Treatment of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis by CNS administration of a serotype 2 adeno-associated virus expressing CLN2 cDNA. *Human gene therapy*. 2008;19(5):463–474.

Wraith JE et al. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (laronidase). *The Journal of pediatrics*. 2004;144(5):581–588.

Wu Z, Miller E, Agbandje-McKenna M, Samulski RJ. Alpha2,3 and alpha2,6 N-linked sialic acids facilitate efficient binding and transduction by adeno-associated virus types 1 and 6. *Journal of virology*. 2006;80(18):9093–9103.

Xiao X, Li J, Samulski RJ. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *Journal of virology*. 1998;72(3):2224–2232.

Yamada Y et al. Treatment of MPS VII (Sly disease) by allogeneic BMT in a female with homozygous A619V mutation. *Bone marrow transplantation*. 1998;21(6):629–634.

Yang B et al. Global CNS Transduction of Adult Mice by Intravenously Delivered rAAVrh.8 and rAAVrh.10 and Nonhuman Primates by rAAVrh.10. *Molecular therapy*. 2014 [Epub ahead of print].

Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*. 1991;64(4):841–848.

Yogalingam G, Hopwood JJ. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type IIIA and IIIB: Diagnostic, clinical, and biological implications. *Human mutation*. 2001;18(4):264–281.

Yogalingam G, Pollard T, Gliddon B, Jolly RD, Hopwood JJ. Identification of a mutation causing mucopolysaccharidosis type IIIA in New Zealand Huntaway dogs. *Genomics*. 2002;79(2):150–153.

Zanta-Boussif M et al. Validation of a mutated PRE sequence allowing high and sustained transgene expression while abrogating WHV-X protein synthesis: application to the gene therapy of WAS. *Gene therapy*. 2009;16(5):605–619.

Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Molecular therapy*. 2008;16(6):1073–1080.

Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *Journal of virology*. 1999;73(4):2886–2892.