



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR**

**FACULTAT DE VETERINÀRIA**

**CENTRE DE BIOTECNOLOGIA ANIMAL I TERÀPIA GÈNICA**

**TERÀPIA GÈNICA AMB VECTORS VIRALS  
ADENOASSOCIATS PER AL TRACTAMENT DE  
LA PATOLOGIA NEUROLÒGICA I SOMÀTICA DE  
LA MUCOPOLISACARIDOSI TIPUS IIIB**

**ALBERT RIBERA SÁNCHEZ**



La present tesi doctoral s'ha dut a terme  
sota la direcció de la Dra. Fàtima Bosch i Tubert  
al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
de la Facultat de Veterinària i  
al Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica  
(CBATEG).

**ALBERT RIBERA SÁNCHEZ**

**FÀTIMA BOSCH I TUBERT**

**JULIOL 2014  
BELLATERRA**

*Al meu Avi,  
perquè mai vas deixar de creure en mi.*

*Al meu pare,  
perquè mai has deixat de creure en mi*

En primer lloc, voldria donar les gràcies a la Dra. Fàtima Bosch per haver-me donat l'oportunitat de realitzar la tesi doctoral al seu grup d'investigació. Moltíssimes gràcies també per tota la dedicació, entusiasme, esforç i per la inesgotable energia que et caracteritzen.

Aquest projecte mai hauria estat possible sense el Jordi, la Mercé i la Sofia. Gràcies també a vosaltres i a l'associació *MPS España* per ser una de les nostres principals motivacions per tirar endavant el projecte, tot i que no sempre tan de pressa com voldríem.

També vull agrair a tots els companys de laboratori amb qui he compartit aquest llarg camí, en el qual hi ha temporades que no aconsegueixes veure el final. Ara que sembla que ha arribat, en primer lloc voldria donar les gràcies especialment a la Vicky i a la Pilar, perquè va ser amb vosaltres amb qui vaig començar i les que em vàreu ensenyar que la ciència podia ser divertida i interessant. Amb vosaltres sempre ho ha estat. Gràcies pels consells, per les hores de feina i per ser com sou.

El projecte Sanfilippo, no només m'ha aportat la feina i dedicació reflectida en aquest treball, sinó que també m'ha permès conèixer i treballar amb grans companys. Voldria agrair a la Sara totes les hores que hem passat junts fent proves de comportament, mesurant GAGs i activitats; amb la Sara no tens temps d'avorrir-te. Donar les gràcies també al Miquel, per totes les hores a l'estabulari i a la sala de presa de mostres, que sense tu no haguessin estat el mateix! Gràcies pels consells i les hores dedicades. Agrair també molt especialment la dedicació del Carles i la perfecció de la Sandra amb tot el que fan. I tot i que la seva feina de vegades quedi en un segon terme, també m'agradaria donar les gràcies al Xavi León, al Luca, a la Maria, a la Marta, a la Jenny i a la Lúdia. Gràcies també a l'Edu i al Federico. I als últims d'incorporar-se al grup de MPS: el Cristian i sobretot al Víctor, gràcies per ser les meves mans durant aquesta recta final. Agrair també la feina i paciència de la Marisa amb els 4 cafès. Finalment, agrair també l'esforç del personal de l'Hospital Veterinari per les múltiples extraccions de líquid dels cafès; gràcies a la Sònia, al Xavi i a l'Anna.

A vosaltres, Alba, Laia, Cristina i Meritxell us deixo per més endavant :)

Amb els que no he passat tantes hores, però amb qui he dedicat bones estones, també donar-vos les gràcies. A tot el grup "d'adipós", que en algun moment m'heu fet participar de la vostra feina: Sergio, Vero i Estefania; i també als darrers en arribar: Clàudia, Víctor, Jordi, Joan i Ivan. Gràcies també Iveta, Tura, Sylvie i Efren. Als que ja

no hi sou però una vegada hi vàreu ser, també agrair-vos el temps compartit: Chris, Joel, Mercè, Anguela, Albert Ruzo, Judith, Callejas, Tami, Ariana i Antonio.

També voldria agrair la feina feta al grup del Jesús: Vero, Lorena, David i Àngel. Les imatges que ens doneu no reflecteixen ni de bon tros la quantitat de feina i hores que comporta obtenir-les.

Gràcies al Pedro, a la Mireia i a tot l'equip del SER per tenir tanta paciència, i a les *noies* de la Unitat d'Animals Transgènics (Anna A., Anna P. i Sandra), perquè sempre és un plaer baixar a la primera planta i trobar-vos allà. I a la Montse Bellido per donar-me sempre un cop de ma amb la paperassa.

Fora de l'àmbit laboral, també voldria donar les gràcies a totes les persones que heu estat al meu costat. Gràcies a la meva família, especialment als meus pares i al meu germà, per haver-me donat suport incondicional des del primer minut i per la paciència que heu tingut durant tots aquests anys, sobretot en aquest període final. Gràcies també a tota la família de Caldes pel seu recolzament.

M'agradaria també agrair a la Bibiana haver-me donat l'empenta i el coratge per iniciar aquesta etapa.

Em costarà ser breu en aquest punt, perquè tinc moltes coses a agrair-vos: un dels meus més sincers agraïments va per vosaltres, per la família galaicocatalana, perquè en els moments més difícils, sempre hi heu sigut. A mi hermano adoptivo Ricardo, gracias por tu acogida, por estar SIEMPRE ahí y por mantenernos undidos desde la distancia. Gràcies Alba pels teus consells, les teves abraçades i per ajudar-me sempre a no caure. Laia, no canviïs mai! Gràcies per venir-me a dir bon dia d'hora al matí; i una abraçada enorme també pel Gerard. Sou molt grans! En el vostre cas, al pot petit hi ha la millor confitura. Cristina... gràcies per apagar-me el llum del laboratori i deixar-me a les fosques, i per donar-nos el plaer d'haver conegut a l'Elies! L'*insecto palo* més simpàtic que he conegut mai! Meritxell, tot i que no facis gaire soroll, ha estat un plaer haver conegut a una *gran gran* persona com tu. Gràcies a tots! Sempre hi haurà un abans i un després de vosaltres.

I finalment, m'agradaria donar-te les gràcies a tu, Anna, per haver tingut tanta paciència, per escoltar-me i per donar-me la força necessària per poder arribar fins al final. Gràcies per compartir l'últim tram d'aquest camí. Tenir-te al costat m'ha donat la força necessària per no defallir. Gràcies de tot cor.

Aquesta tesi doctoral ha estat possible, en primer lloc, gràcies a una beca predoctoral FPU, atorgada pel *Ministerio de Educación y Ciencia*, de la qual n'he estat beneficiari durant 4 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.

<b>4MU</b>	4-metilumbeliferona
<b>µg</b>	Microgram
<b>µl</b>	Microlitre
<b>µm</b>	Micròmetre
<b>µM</b>	Micromolar
<b>AAV</b>	<i>Adeno-associated virus</i> ; Virus Adenoassociat.
<b>BHE</b>	Barrera Hematoencefàlica
<b>bp</b>	<i>Base pair</i> ; parell de bases
<b>CBATEG</b>	Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica
<b>cDNA</b>	DNA complementari
<b>CLN o NCL</b>	Neuronal <i>Ceroid Lipofuscinosis</i> ; Lipofuscinosi Neuronal Ceroidea
<b>cm</b>	Centímetre
<b>DNA</b>	Àcid Desoxiribonucleic
<b>dsDNA</b>	<i>Double-stranded DNA</i> ; DNA de cadena doble
<b>EGF</b>	<i>Epidermal Growth Fator</i> ; Factor de creixement epidèrmic
<b>EGFR</b>	Receptor del EGF
<b>ERT</b>	<i>Enzyme Replacement Therapy</i> ; Teràpia de reemplaçament enzimàtic
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FGF</b>	<i>Fibroblast Growth Factor</i> ; Factor de creixement de fibroblasts
<b>FGFR</b>	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i> ; Receptor del FGF
<b>GAG</b>	Glicosaminoglicà
<b>GalNac</b>	N-acetil-galactosamina
<b>GFAP</b>	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> ; Proteïna fibril·lar àcida de la glia
<b>GlcA</b>	Àcid glucurònic
<b>GlcNAc</b>	N-acetil-glucosamina
<b>GNS</b>	N-acetil-glucosamina-6-sulfatasa
<b>GUSB</b>	β-glucuronidasa
<b>vg</b>	<i>Viral genomes</i> ; genomes virals
<b>h</b>	Hora
<b>Het</b>	Heterozigot
<b>HEXB</b>	β-hexosaminidasa
<b>HGFR</b>	<i>Hepatocyte Growth Factor Receptor</i> ; Receptor del factor de creixement d'hepatòcits
<b>HGSNAT</b>	Heparan-α-glucosaminida N-acetiltransferasa



---

<b>HLA</b>	<i>Human Leukocyte Antigen</i> ; Antigen leucocitari humà
<b>HPβCD</b>	2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina
<b>HS</b>	Heparan Sulfat
<b>HSC</b>	<i>Hematopoietic Stem Cell</i> ; Cèl·lula mare hematopoètica
<b>HSPG</b>	<i>Heparan Sulfate Proteoglycans</i> ; Proteoglicans d'Heparan Sulfat
<b>hUCB</b>	<i>Human Umbilical Cord Blood</i> ; Cèlules humanes hematopoètiques de cordó umbilical
<b>I2S</b>	Iduronat-2-sulfatasa
<b>IdoA</b>	Àcid idurònic
<b>IDUA</b>	α-Iduronidasa
<b>IL1β</b>	Interleucina β
<b>ISRCTN</b>	<i>International Standard Randomised Controlled Trial Number</i>
<b>ITR</b>	<i>Inverted Terminal Repeat</i> ; Repetició terminal invertida
<b>kb</b>	Kilobase
<b>kDa</b>	Kilodàlton
<b>kg</b>	Kilogram
<b>KO</b>	<i>Knock-out</i>
<b>LAMP-1</b>	<i>Lysosomal-Associated Membrane Protein 1</i>
<b>LamR</b>	Receptor de laminina
<b>LCR</b>	Líquid Cefaloraquidi
<b>LIMP-2</b>	<i>Lysosomal-Integral Membrane Protein</i>
<b>LSD</b>	<i>Lysosomal storage disorder</i> ; Malaltia d'emmagatzemament lisosòmic
<b>M6P</b>	Manosa-6-fosfat
<b>MET</b>	Microscòpia Electrònica de Transmissió
<b>mg</b>	Mil·ligram
<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i> ; Complexe major d'histocompatibilitat
<b>ml</b>	Mil·lilitre
<b>ML</b>	Mucolipidosi
<b>mM</b>	Mil·limolar
<b>MPR</b>	Receptor de manosa-6-fosfat
<b>MPS</b>	Mucopolisacaridosi
<b>NAb</b>	<i>Neutralizing Antibody</i> ; Anticòs neutralitzant
<b>NAGLU</b>	α-N-acetilglucosaminidasa
<b>ng</b>	Nanògram

<b>nmol</b>	Nanomol
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>NPC</b>	Malaltia de Nieman-Pick tipus C
<b>ORF</b>	<i>Open Reading Frame</i> ; Marc obert de lectura
<b>o/n</b>	<i>Overnight</i> ; durant la nit
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reacció en cadena de la polimerasa
<b>PDGFR</b>	<i>Platelet –Derived Growth Factor</i> ; Receptor del factor de creixement derivat de plaquetes
<b>qPCR</b>	PCR quantitativa
<b>RNA</b>	Àcid Ribonucleic
<b>rpm</b>	Revolucions per minut
<b>s</b>	Segons
<b>scAAV</b>	<i>Self-complementary AAV</i>
<b>SEM</b>	<i>Standard Error of the Media</i> ; Error estàndard de la mitjana
<b>SGSH</b>	N-sulfoglucosamina sulfhidrolasa (Sulfamidasa)
<b>SNC</b>	Sistema Nerviós Central
<b>SNP</b>	Sistema Nerviós Perifèric
<b>ssDNA</b>	<i>Single-stranded DNA</i> ; DNA de cadena senzilla
<b>ssRNA</b>	<i>Single-stranded RNA</i> ; RNA de cadena senzilla
<b>TAE</b>	Tampó Tris-acetat
<b>TFEB</b>	Factor de Transcripció EB
<b>TG</b>	Teràpia Gènica
<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptor</i> ; Receptors de tipus Toll
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosi tumoral $\alpha$
<b>UE</b>	Unió Europea
<b>V</b>	Volt
<b>v/v</b>	Volum/volum
<b>w/v</b>	<i>Weight/volume</i> ; pes/volum
<b>WT</b>	<i>Wilde-type</i>

---

<b>I. PRESENTACIÓ .....</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>4</b>
<b>1. MALALTIES MINORITÀRIES.....</b>	<b>5</b>
<b>2. LISOSOMES I MALALTIES D'ACUMULACIÓ LISOSÒMICA .....</b>	<b>6</b>
2.1. Lisosomes i enzims lisosòmics.....	6
2.2. Malalties d'acumulació lisosòmica.....	9
2.2.1. Classificació.....	9
2.2.2. Simptomatologia .....	12
2.2.3. Diagnòstic.....	12
2.2.4. Tractament.....	12
2.3. Mucopolisacaridosis .....	14
<b>3. GLICOSAMINOGLICANS .....</b>	<b>16</b>
<b>4. MUCOPOLISACARIDOSI TIPUS IIIB.....</b>	<b>21</b>
4.1. Prevalença de la MPSIIIB .....	22
4.2. N-acetilglucosaminidasa, alfa (NAGLU) .....	24
4.2.1. Gen codificant per la proteïna NAGLU humana .....	24
4.2.2. Enzim NAGLU (EC 3.2.1.50).....	26
4.2.3. Mutacions en el gen <i>NAGLU</i> humà .....	26
4.3. Simptomatologia de la MPSIIIB.....	28
4.3.1. Síntomes inicials .....	28
4.3.2. Trastorns del comportament i alentiment del desenvolupament .....	28
4.3.3. Trastorns del son .....	29
4.3.4. Simptomatologia somàtica .....	29
4.3.5. Mort .....	30
4.4. Diagnòstic .....	30
4.4.1. Diagnòstic convencional .....	30
4.4.2. Diagnòstic postnatal.....	31

4.4.3. Diagnòstic prenatal .....	31
4.5. Correlació genotip-fenotip .....	32
4.6. Patofisiologia de la MPSIIIB .....	33
4.7. Tractament convencional .....	34
4.8. Models animals de la MPSIIIB.....	35
4.8.1. Model animal murí.....	35
4.8.2. Model animal caní .....	37
4.8.3. Model animal aviari .....	38
4.9. Teràpies en desenvolupament .....	38
4.9.1. Transplantament de cèl·lules mare hematopoètiques .....	38
4.9.2. Transplantament de cèl·lules de cordó umbilical .....	39
4.9.3. Teràpies de reemplaçament enzimàtic (ERT) .....	40
4.9.3.1. ERT intravenosa .....	40
4.9.3.2. ERT intratecal .....	40
4.9.3.3. ERT intranassal .....	41
4.9.4. Teràpies de reducció de substrat .....	42
4.9.4.1. Genisteïna .....	42
4.9.4.2. Rodamina B .....	43
4.9.4.3. Miglustat .....	43
4.9.5. Teràpies d'augment d'activitat enzimàtica .....	44
4.9.6. Teràpies basades en l'augment de l'excreció lisosòmica .....	45
<b>5. TERÀPIA GÈNICA .....</b>	<b>46</b>
5.1. Classificació de la Teràpia Gènica .....	46
5.2. Vectors virals .....	47
5.3. Vectors virals adenoassociats .....	50
5.3.1. Biologia dels virus adenoassociat .....	50
5.3.2. Característiques dels vectors AAV .....	53
5.3.3. Teràpia gènica amb vectors AAV per malalties del SNC .....	54

<b>6. ESTAT ACTUAL DE LA TERÀPIA GÈNICA PER A LA MPSIIIB .....</b>	<b>56</b>
6.1. Teràpia gènica amb vectors lentivirals .....	56
6.2. Teràpia gènica amb vectors AAV .....	57
6.3. Administració de vectors AAV9 al LCR per al tractament de MPS amb afectació del SNC .....	59

<b>III. OBJECTIUS .....</b>	<b>62</b>
-----------------------------	-----------

<b>IV. RESULTATS .....</b>	<b>64</b>
----------------------------	-----------

### **Part 1. Caracterització del model murí de MPSIIIB a 2 mesos d'edat**

<b>1. PATOLOGIA DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL .....</b>	<b>66</b>
1.1. Determinació d'activitat NAGLU i contingut de GAGs al cervell.....	66
1.2. Avaluació de la neuroinflamació.....	69
<b>2. PATOLOGIA SOMÀTICA.....</b>	<b>73</b>
<b>3. AVALUACIÓ DEL COMPORTEMENT .....</b>	<b>77</b>
3.1. Alteracions del comportament a 2 mesos d'edat .....	77
3.2. Evolució del comportament de ratolins WT i MPSIIIB amb l'edat .....	82

### **Part 2. Tractament del model animal murí de MPSIIIB amb AAV9-mNAGLU**

<b>1. CONSTRUCCIÓ D'UN VECTOR VIRAL ADENOASSOCIAT CODIFICANT PER LA PROTEÏNA NAGLU MURINA.....</b>	<b>87</b>
<b>2. BIODISTRIBUCIÓ DEL VECTOR VIRAL AAV9-mNAGLU ADMINISTRAT AL LCR PER VIA INTRACISTERNA MAGNA .....</b>	<b>88</b>
<b>3. EFECTE TERAPÈUTIC DE L'ADMINISTRACIÓ INTRACISTERNA MAGNA DEL VECTOR VIRAL AAV9-mNAGLU AL SNC .....</b>	<b>91</b>
3.1. Correcció de l'activitat NAGLU i del contingut de GAGs al cervell.....	92
3.2. Correcció de la neuroinflamació.....	99

3.3. Normalització de l'activitat enzimàtica d'altres enzims lisosòmics .....	104
3.4. Avaluació del tractament amb el vector viral AAV9-mNAGLU sobre el perfil d'expressió gènica .....	105
<b>4. EFECTE TERAPÈUTIC DE L'ADMINISTRACIÓ INTRACISTERNA MAGNA DEL VECTOR VIRAL AAV9-mNAGLU ALS TEIXITS SOMÀTICS .....</b>	<b>111</b>
4.1. Restabliment de l'activitat NAGLU i correcció de la distensió lisosòmica ....	111
4.2. Correcció d'organomegàlies .....	118
4.3. Normalització de l'activitat enzimàtica d'altres enzims lisosòmics .....	119
4.4. Efecte del tractament intracisterna sobre el comportament .....	120
4.5. Supervivència .....	123

**Part 3. Translacionabilitat de l'aproximació de teràpia gènica cap a models animals grans**

<b>1. CONSTRUCCIÓ D'UN VECTOR VIRAL ADENOASSOCIAT CODIFICANT PER LA PROTEÏNA NAGLU CANINA .....</b>	<b>126</b>
<b>2. ADMINISTRACIÓ INTRACISTERNA MAGNA DEL VECTOR VIRAL AAV9-cNAGLU EN GOSSOS ADULTS .....</b>	<b>128</b>
2.1. Detecció d'anticossos neutralitzants contra AAV9 circulants i al LCR .....	130
2.2. Efecte de la immunitat preexistent sobre l'activitat NAGLU del LCR .....	131
2.3. Efecte de l'administració intracisterna de AAV9-cNAGLU a nivell somàtic ..	133
<b>V. DISCUSSIÓ .....</b>	<b>135</b>
<b>VI. CONCLUSIONS .....</b>	<b>151</b>

---

<b>VII. MATERIALS I MÈTODES.....</b>	<b>154</b>
<b>1. MATERIALS.....</b>	<b>155</b>
1.1. Animals.....	155
1.2. Soques bacterianes.....	156
1.3. Anticossos.....	156
1.4. Plasmidis.....	156
1.5. Reactius.....	157
<b>2. MÈTODES.....</b>	<b>158</b>
2.1. Tècniques de manipulació del DNA.....	158
2.1.1. Preparació de DNA plasmídic.....	158
2.1.2. Digestió del DNA amb enzims de restricció.....	158
2.1.3. Lligació de fragments de DNA.....	158
2.1.4. Purificació i resolució del DNA.....	159
2.1.5. Transformació de cèl·lules competents.....	159
2.2. Tècniques d'obtenció i manipulació del RNA.....	160
2.2.1. Aïllament i purificació de RNA total.....	160
2.2.2. Microxips d'expressió.....	160
2.3. Construcció de plasmidis.....	161
2.3.1. Optimització de seqüències de DNA.....	161
2.3.2. Construcció del plasmidi pAAV-CAG-mNAGLU.....	161
2.3.3. Construcció del plasmidi pAAV-CAG-cNAGLU.....	162
2.4. Transfecció de cultius cel·lulars HEK-293 amb DNA plasmídic.....	162
2.5. Producció, purificació i titulació de vectors virals adenoassociat.....	162
2.5.1. Producció i purificació.....	162
2.5.2. Titulació de genomes virals.....	164
2.5.3. Quantificació de les partícules virals per tinció de plata.....	166
2.6. Determinació de genomes virals en teixits per qPCR.....	167

---

2.6.1. Generació de la recta patró de referència .....	167
2.6.2. Quantificació del nombre de còpies del transgèn per qPCR.....	168
2.7. Genotipat de ratolins .....	168
2.7.1. Purificació de DNA genòmic.....	169
2.7.2. Genotipat per PCR.....	169
2.8. Administració <i>in vivo</i> de vectors AAV .....	171
2.8.1. Administració intracisterna magna de vectors AAV9 en ratolins .....	171
2.8.2. Administració intravenosa de vectors AAV9 en gossos .....	171
2.8.3. Administració intracisterna magna de vectors AAV9 en gossos .....	172
2.9. Realització de l'Actímetre .....	173
2.10. Obtenció de mostres de sèrum i LCR <i>in vivo</i> .....	173
2.10.1. Obtenció de mostres de sèrum de ratolins .....	173
2.10.2. Obtenció de mostres de sèrum de gossos .....	174
2.10.3. Obtenció de mostres de LCR de gossos .....	174
2.11. Determinació de paràmetres bioquímics i hematològics .....	174
2.12. Eutanàsia i obtenció de mostres biològiques <i>post mortem</i> de ratolins .....	175
2.13. Quantificació de proteïna total pel mètode de Bradford.....	176
2.14. Determinació del contingut de GAGs en òrgans i teixits.....	176
2.15. Determinació d'activitats enzimàtiques .....	177
2.15.1. Determinació d'activitat NAGLU .....	177
2.15.2. Determinació d'altres activitats enzimàtiques .....	178
2.16. Immunohistoquímica de seccions tissulars en blocs de parafina.....	178
2.17. Determinació de l'àrea positiva en immunohistoquímiques en camp clar..	179
2.18. Microscòpia electrònica de transmissió.....	179
2.19. Determinació d'anticossos neutralitzants al sèrum i al LCR .....	179
2.20. Anàlisi estadística .....	180
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>181</b>



## ***I. Presentació***

La Mucopolisacaridosi tipus IIIB (MPSIIIB) és una malaltia minoritària d'acumulació lisosòmica causada per la deficiència de l'enzim  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa (NAGLU), implicat en la via de degradació del glicosaminoglicà (GAG) Heparan Sulfat (HS). Aquesta pèrdua d'activitat comporta una acumulació patològica de HS intralisosòmic que dona lloc a la disfunció i mort cel·lular. La MPSIIIB és una malaltia neurodegenerativa amb una lleu afectació somàtica. Després d'un primer període asimptomàtic durant els primers mesos de vida, la malaltia es caracteritza per una fase inicial durant la infantesa amb alentiment del desenvolupament mental, alteracions en el comportament i deteriorament intel·lectual. Amb l'aparició de demència severa, els problemes de comportament desapareixen i les funcions motores inicien un deteriorament progressiu, que finalment resulta en una pèrdua total de locomoció, disfàgia i lesions en el sistema piramidal. La mort se sol produir entre la segona i tercera dècada de vida, tot i que formes més lleus de la malaltia presenten una evolució més lenta amb esperances de vida més llargues.

Actualment, no hi ha cap tractament específic per la MPSIIIB. Totes les teràpies i tractaments actuals estan basats en el control simptomàtic i en la millora de la qualitat de vida. Per aquesta raó, es fa necessari el desenvolupament de noves estratègies terapèutiques. La teràpia gènica *in vivo* basada en l'administració de vectors virals derivats dels virus adenoassociats (AAV) ofereix una alternativa atractiva per al tractament de malalties minoritàries d'origen genètic com la MPSIIIB. Entre tots els vectors AAV identificats i caracteritzats, els derivats del serotip 9 (AAV9) es presenten un ampli tropisme al Sistema Nerviós Central (SNC).

Per tant, en la present tesi doctoral s'ha desenvolupat una estratègia de teràpia gènica centrada en l'administració al Líquid Cefaloraquídi (LCR) d'un vector AAV9 codificant per la proteïna NAGLU murina (AAV9-mNAGLU), amb la finalitat de tractar la patologia neurològica i somàtica de la MPSIIIB.

Una única administració del vector viral AAV9-mNAGLU a la cisterna magna de ratolins models de la malaltia, va donar lloc a una àmplia transducció del SNC i del fetge, que es va traduir en un augment en els nivells d'activitat NAGLU en aquests òrgans. A nivell del SNC, l'augment d'activitat NAGLU en els ratolins MPSIIIB tractats va permetre normalitzar el contingut de GAGs del cervell i corregir els signes de neuroinflamació. També es va dur a terme un estudi d'expressió gènica del cervell, el qual va permetre observar una desregulació de l'expressió gènica de gens característics de cèl·lules de la micròglia, d'immunitat innata i d'estrès oxidatiu en els

ratolins MPSIIIB no tractats. Aquesta expressió gènica alterada va ser corregida amb el tractament amb AAV9-mNAGLU.

L'augment d'activitat NAGLU hepàtica va comportar un increment de l'activitat circulant, que alhora va permetre normalitzar el contingut de GAGs de la majoria d'òrgans i teixits analitzats. El tractament amb AAV9-mNAGLU també va comportar una normalització de les alteracions de comportament i un augment significatiu de la supervivència dels ratolins MPSIIIB d'ambdós sexes.

Posteriorment, es va avaluar la translacionabilitat de l'aproximació terapèutica en models animals més grans. Gossos *Beagle* adults van ser utilitzats per a aquesta finalitat, als quals se'ls va administrar el vector viral AAV9 codificant per la proteïna NAGLU canina (AAV9-cNAGLU) al LCR. Es va observar una producció i secreció elevada i estable de l'enzim NAGLU actiu al LCR. També es va utilitzar el model caní per avaluar l'efecte de la immunitat preexistent sobre els nivells d'activitat NAGLU al LCR. Els resultats van mostrar com després de l'administració del vector AAV9-cNAGLU, els nivells d'activitat al LCR es mantenien elevats i constants a llarg termini independentment de la presència d'elevats títols circulants de NAbs.

Conjuntament, els resultats van mostrar l'eficàcia terapèutica de l'administració al LCR de vectors AAV9 codificants per la proteïna NAGLU i la translacionabilitat d'aquesta aproximació cap a models animals grans, així com també la persistència d'activitat al LCR independentment de la presència de NAbs circulants contra la càpsida del vector viral. Per tant, l'aproximació de teràpia gènica descrita en aquest treball pot esdevenir un possible tractament, no només per a la MPSIIIB, sinó que també per a altres malalties d'acumulació lisosòmica amb afectació del SNC.

## ***II. Introducció***

## 1. MALALTIES MINORITÀRIES

Les *Malalties minoritàries*, altrament conegudes com a *Malalties rares* degut a la seva traducció literal del terme anglès *Rare diseases*, comprenen un grup d'entre 6.000 y 8.000 malalties amb baixa prevalença i que afecten entre un 6 y un 8% de la població mundial. Tot i considerar-se de baixa prevalença, col·lectivament les malalties minoritàries afecten a 1 de cada 20 individus. El 80% d'aquestes malalties són d'origen genètic, mentre que el 20% restant fa referència a trastorns adquirits, ja siguin degeneratius i proliferatius o ocasionats com a conseqüència d'infeccions víriques o bacterianes o deguts a al·lèrgies i d'altres causes ambientals. El 75% de malalties minoritàries afecten a nens i d'aquests, el 30% solen morir abans dels 5 anys d'edat. En general, es tracta de malalties cròniques, progressives, degeneratives i incapacitants amb pèrdua progressiva de la qualitat de vida i d'autonomia.

No hi ha un consens clar, únic i acceptat per classificar una malaltia de baixa prevalença com a minoritària, ja que cada país en té la seva pròpia definició. D'aquesta manera, als EEUU es considera una malaltia com a minoritària aquella que presenta una prevalença igual o inferior a un entre cada 1.200 individus (*Rare Diseases Act of 2002, Public Law 107*).

A nivell Europeu, la Direcció General de Salut i Consumidors en Salut Pública de la Comissió Europea, estableix que les malalties minoritàries són totes aquelles "*malalties potencialment mortals o crònicament debilitants –moltes d'elles d'origen genètic–, la prevalença de les quals és tan baixa que es requereixen esforços combinats per tal de: (a) reduir-ne el nombre d'afectats, (b) prevenir-ne la mortalitat perinatal i infantil degudes a la seva causa, i (c) mantenir la qualitat de vida i el potencial socio-econòmic dels malalts.*" Així, la Comissió també estableix que a la Unió Europea (UE), una malaltia és considerada com a rara o minoritària quan afecta a 5 persones de cada 10.000, una prevalença d'una persona entre cada 2.000 (*Communication from the UE Commission, 2008*). A l'Estat Espanyol s'estima que hi ha al voltant de 3 milions de persones afectades d'alguna malaltia minoritària (*Estrategia en Enfermedades Raras del Sistema Nacional de Salud, 2009*), i a Catalunya el nombre de casos es calcula entre 300.000 i 400.000 persones.

## 2. LISOSOMES I MALALTIES D'ACUMULACIÓ LISOSÒMICA

Les malalties d'acumulació lisosòmica (LSDs: *Lysosomal Storage Disorders*) són un grup de malalties minoritàries que comprenen prop de 50 malalties genètiques causades per la deficiència d'un enzim lisosòmic concret o, en una minoria de casos, degudes a la deficiència d'enzims no lisosòmics però que es troben implicats en alguna de les seves funcions biològiques, de manera que la disfunció d'aquests enzims dóna lloc a la disfunció i a l'alteració de l'homeòstasi lisosòmica.

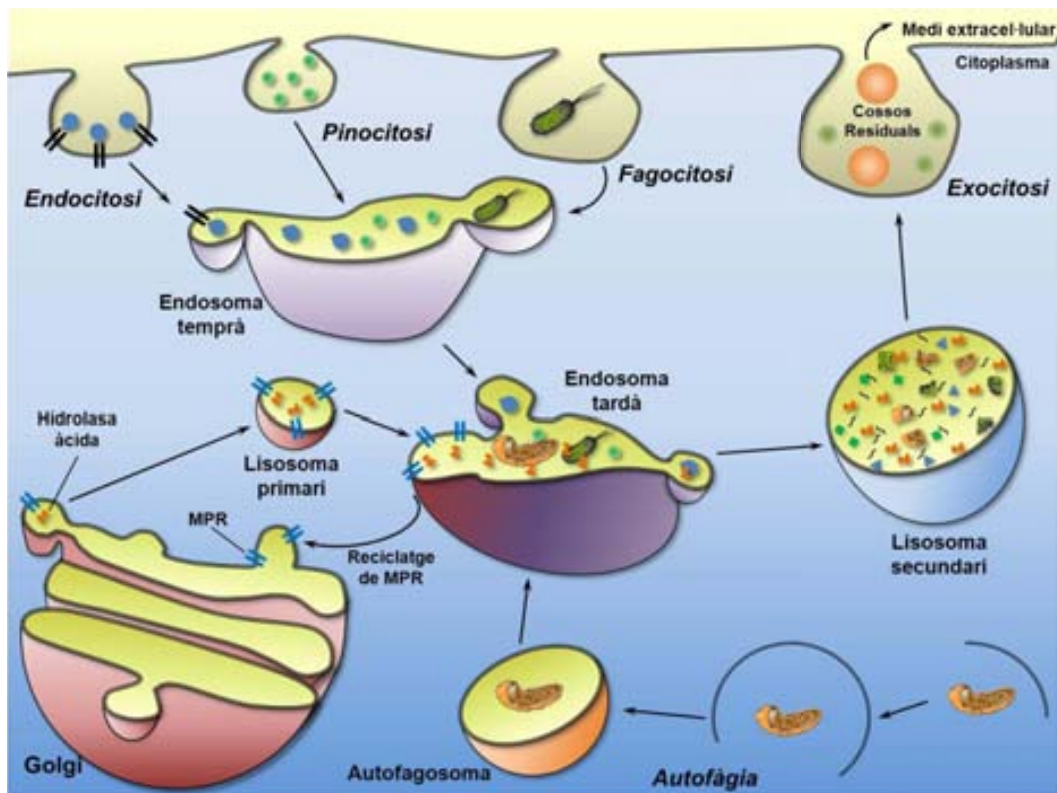
### 2.1. Lisosomes i enzims lisosòmics

Els lisosomes són orgànuls intracel·lulars encarregats principalment de la funció digestiva i de reciclatge cel·lular, tant dels productes propis de la cèl·lula (procés conegut com autofàgia) així com també de components extracel·lulars internalitzats pels processos d'endocitosi, pinocitosi i fagocitosi. A banda de la funció digestiva, també es troben implicats en altres funcions cel·lulars fonamentals com la secreció, el reciclatge i reparació de la membrana cel·lular, senyalització, autofàgia, immunitat i metabolisme energètic (Settembre, 2013).

Per a dur a terme la funció digestiva, els lisosomes disposen del voltant de 120 proteïnes lisosòmiques integrals de membrana i de prop de 50 enzims secretables capaços d'hidrolitzar polisacàrids, proteïnes, àcids nucleics i lípids, digestions que duen a terme a un pH àcid de 5,5. Per aquesta raó a aquests últims se'ls anomena també hidrolases àcides. Fora d'un estret rang de pH, les hidrolases àcides són inactives, fet que protegeix la cèl·lula d'una possible autodigestió incontrolada, per exemple per ruptura de la membrana lisosòmica i abocament del seu contingut al citosol, ja que el pH citosòlic és del voltant de 7,2 (Cooper, 2000). Els enzims integrals de membrana lisosòmica es troben implicats en processos d'acidificació del lumen lisosòmic, de transport de substàncies a través de la membrana lisosòmica i de fusió d'aquesta membrana amb d'altres estructures cel·lulars (Settembre, 2013).

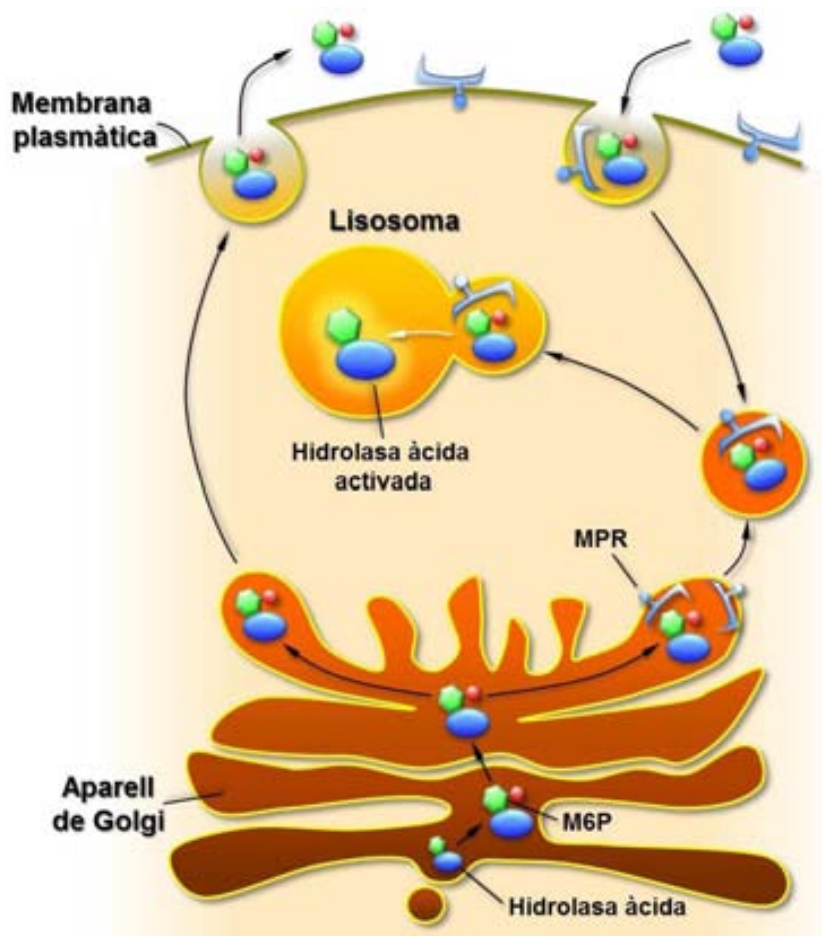
Les hidrolases àcides són sintetitzades al reticle endoplasmàtic rugós, del qual se'n desprenen vesícules que es fusionen amb l'Aparell de Golgi, on pateixen les pertinents glicosilacions post-transcripcionals, entre elles, l'addició de residus de manosa-6-fosfat (M6P) als extrems terminals de les cadenes d'oligosacàrids. Aquests residus són la marca distintiva d'aquests enzims, ja que és al *trans* Golgi on són reconeguts pels receptors de M6P (MPR) (Ghosh, 2003; Braulke, 2009). De l'Aparell

de Golgi se'n formen noves vesícules de pH lleugerament àcid: els lisosomes primaris, els quals tenen a la seva membrana la M6P unida al seu receptor. Aquests lisosomes primaris, es fusionen amb altres vesícules àcides: els endosomes tardans. L'acidificació del pH intravesicular, deguda a la presència de bombes de protons a la membrana dels lisosomes primaris (Ohkuma, 1982), és la responsable de la dissociació entre els enzims lisosòmics i els MPR un cop a l'endosoma tardà. És llavors quan els receptors poden ser reciclats, bé sigui de retorn cap a l'Aparell de Golgi o bé cap a la membrana plasmàtica cel·lular, on poden captar altres enzims lisosòmics secretats per les cèl·lules veïnes. Les vesícules que es desprenen dels endosomes tardans i que contenen macromolècules i altres productes que han de ser digerits s'anomenen lisosomes secundaris, amb un pH més àcid que permet l'activació de les hidrolases àcides (Figura 1).



**Figura 1. Hidrolases àcides i digestió lisosòmica.** A l'Aparell de Golgi les hidrolases àcides se'ls afegeix la M6P característica d'aquest tipus d'enzims lisosòmics, fet que els permet ser reconegudes pel seu receptor. Del Golgi se'n desprenen les vesícules que es van acidificant per formar els lisosomes primaris, els quals es fusionen amb els endosomes tardans procedents de les diferents vies de digestió cel·lular (fagocitosi, pinocitosi, exocitosi i processos autofàgics). La maduració dels endosomes tardans dona lloc als lisosomes secundaris, encarregats de la degradació macromolecular pròpiament dita. Els productes resultants de la digestió són reutilitzats per la cèl·lula o bé són eliminats en forma de cossos residuals. Adaptat de Desnick i Schuchman, 2002.

Les hidrolases àcides sintetitzades en una cèl·lula, no només duen a terme la seva funció en aquesta mateixa cèl·lula, sinó que també poden ser secretades al medi extracel·lular a partir de vesícules que es desprenen directament de l'Aparell de Golgi i viatgen fins a la membrana plasmàtica cel·lular. Aquestes vesícules es fusionen amb la membrana alliberant el seu contingut al medi extracel·lular i/o al torrent circulatori. D'aquesta manera, aquests enzims poden ser internalitzats mitjançant endocitosi mediada pel MPR de cèl·lules veïnes o distants que l'expressin a la seva membrana plasmàtica (Desnik i Schuchman, 2002; Enns i Huhn, 2008) (Figura 2).



**Figura 2. Mecanisme de correcció creuada.** Les hidrolases àcides produïdes en una cèl·lula determinada poden ser excretades al medi extracel·lular i al torrent circulatori, podent ser captades per cèl·lules veïnes o distants que expressin el MPR a la seva membrana, i exercir la seva funció digestiva en aquestes cèl·lules. L'eficàcia de la majoria d'aproximacions terapèutiques en estudis preclínic es basa en aquesta propietat.



## 2.2. Malalties d'acumulació lisosòmica

La majoria de LSDs de les que se'n té constància són malalties monogèniques d'herència autosòmica recessiva, a excepció d'algunes que són d'herència lligada al cromosoma X, com la malaltia de Hunter (o Mucopolisacaridosi tipus II), la malaltia de Danon o la malaltia de Fabry (Taula 1). En qualsevol cas, la majoria de les LSDs són causades per mutacions en gens que codifiquen per algun dels enzims lisosòmics (solubles o de membrana), mentre que una minoria són degudes a mutacions en enzims no lisosòmics però implicats en la biogènesi lisosòmica o en la maduració proteica d'enzims lisosòmics (Neufeld, 1991; Dierks, 2009). En aquest últim grup s'hi troben, per exemple, la Malaltia de Niemann-Pick C1, la Deficiència múltiple de sulfatases (o malaltia d'Austin) i les Mucopolisacaridosis tipus II i III (Taula 1).

Les LSDs són considerades malalties minoritàries ja que presenten una incidència global inferior a 1 de cada 2.000 naixements. No hi ha un consens clar per definir la incidència exacta per cadascuna d'elles, ja que depèn de l'àrea geogràfica estudiada així com també de l'eficiència en el seu diagnòstic.

Així, estudis retrospectius realitzats en diferents àrees geogràfiques estableixen incidències globals de les LSDs de 1 en 7.700 naixements a Austràlia (Meikle, 1999), 1 en 7.100 a Holanda (Poorthuis, 1999), 1 en 8.275 a Itàlia (Dionisi-Vici, 2002) o 1 en 4.000 a Portugal (Pinto, 2004). De tota manera, la incidència més elevada en una malaltia minoritària de la que se'n té constància és a la població Finesa, on la Aspartilglicosaminúria afecta a 1 de cada 18.500 naixements (Arvio, 1993).

### 2.2.1. Classificació

La falta d'activitat enzimàtica de qualsevol dels enzims deficitaris en les LSDs, dóna lloc a l'acumulació patològica de formes parcialment degradades de diferents substrats a l'interior dels lisosomes, la qual cosa resulta en la formació intracel·lular de grans cossos d'inclusió i en la conseqüent distensió lisosòmica a l'interior de les cèl·lules afectades. Finalment, l'acumulació d'aquests productes intermedis de degradació a l'interior de les cèl·lules té com a conseqüència la disfunció i la mort cel·lulars. Per aquesta raó, se solen classificar les LSDs en funció del substrat que s'acumula en cada cas, que alhora ve determinat per l'enzim deficitari (Taula 1).

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

Nom de la malaltia	Altres noms	Proteïna deficitària	Productes emmagatzemats
<b>Defectes en la degradació de Glicoproteïnes</b>			
Mucopolidiosi I (tipus I i II)	Sialidosi	$\alpha$ -N-acetilneuraminidasa	Sialil-oligosacàrids
Galactosialidosi		Catepsina A	Sialil-oligosacàrids
$\alpha$ -Manosidosi		$\alpha$ -manosidasa	Oligosacàrids amb manosa
$\beta$ -Manosidosi		$\beta$ -manosidasa	Oligosacàrids amb manosa
Aspartilglucosaminuria		Aspartilglucosaminidasa	Aspartilglucosamina
$\alpha$ -Fucosidosis		$\alpha$ -L-fucosidasa	Oligosacàrids amb fucosa
Malaltia de Schindler		$\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa	Oligosacàrids amb N-acetilgalactosamina
<b>Defectes en la degradació de Glicolípidis</b>			
GM1 Gangliosidosi (tipus I, II, III)		$\beta$ -galactosidasa	Gangliòsid GM1
GM2 Gangliosidosi - Tay-Sachs	Malaltia de Tay-Sachs	$\beta$ -hexosaminidasa (subunitat $\alpha$ )	Gangliòsid GM2
GM2 Gangliosidosi - Sandhoff	Malaltia de Sandhoff	$\beta$ -hexosaminidasa (subunitat $\beta$ )	Gangliòsid GM2
GM2 Gangliosidosi (variant AB)	Tay-Sachs (variant AB)	Proteïna activadora de GM2	Gangliòsid GM2
Malaltia de Gaucher (tipus I, II i III)		Glucocerebrosidasa	Glucosilceramides
Malaltia de Gaucher (variant)		Saponsin C	Glucosilceramides
Leucodistròfia Metacromàtica		Ariilsulfatasa A	Glicolípidis sulfatats
L. Metacromàtica (variant)		Saponsin B	GM1 i Glicolípidis sulfatats
Deficiència múltiple de Sulfatases	Malaltia d'Austin / Mucosulfatidosi	c- $\alpha$ -formylglycine-generating enzyme	Galactocerebròsids sulfatats
Leucodistrofia de cèl·lules globoïdes	Malaltia de Krabbe	$\beta$ -galactosilceramidasa	Galactosilceramides
Malaltia de Fabry		$\alpha$ -galactosidasa A	Globotriaosilceramida
Malaltia de Fabry (variant)		$\alpha$ -galactosidasa A	Globotriaosilceramida
<b>Defectes en la degradació de Mucopolisacàrids - Mucopolisacaridosis</b>			
MPS I	Malaltia de Hurler, Scheie i Hurler/Scheie	$\alpha$ -iduronidasa	Dermatan i Heparan sulfat
MPS II	Malaltia de Hunter	Iduronat sulfatasa	Dermatan i Heparan sulfat
MPS III	Síndrome de Sanfilippo		
MPS IIIA	Síndrome de Sanfilippo A	Heparan N-sulfatasa	Heparan sulfat
MPS IIIB	Síndrome de Sanfilippo B	$\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa	Heparan sulfat
MPS IIIC	Síndrome de Sanfilippo C	Acetil-CoA: $\alpha$ -glucosaminida N-acetiltransferasa	Heparan sulfat
MPC IIID	Síndrome de Sanfilippo D	N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa	Heparan sulfat
MPS IV	Malaltia de Morquio		
MPS IVA	Malaltia de Morquio A	Galactosamina-6-sulfatasa	Keratan i Condroitin sulfat
MPS IVB	Malaltia de Morquio B	$\beta$ -galactosidasa	Keratan sulfat
MPS VI	Síndrome de Morateaux-Lamy	Ariilsulfatasa B	Dermatan Sulfat
MPS VII	Síndrome de Sly	$\beta$ -glucuronidasa	Heparan, Dermatan i Condroitin sulfat
MPS IX		Hialuronidasa	Àcid hialurònic

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

Malaltia	Altres noms	Proteïna deficitària	Productes emmagatzemats
<b>Defectes en la degradació del Glicogen</b>			
Glucogenosis tipus II	Malaltia de Pompe	α-glucosidasa	
<b>Defectes en la degradació o transport de Lípids</b>			
Malaltia de Niemann-Pick A i B		Esfingomielinasa	Esfingomielina
Malaltia de Niemann-Pick C1		NPC1	Colesterol i Esfingolípid
Malaltia de Niemann-Pick C2		NPC2	Colesterol i Esfingolípid
Lipogranulomatosi de Farber	Malaltia de Farber	Ceramidasa àcida	Ceramida
Malaltia de Wolman		Lipasa àcida lisosòmica	Triglicèrids i Èsters de colesterol
Lipofuscinosi neuronal ceroïda (CLN)			
CLN1		Palmitoil-proteïna tioesterasa	Lipofuscina
CLN2	Malaltia de Jansky-Bielschowsky	Tripeptidil peptidasa 1	Lipofuscina
CLN3	Malaltia de Batten	Batenina	Lipofuscina
CLN4		DNAJC5	Lipofuscina
CLN5		CLN5	Lipofuscina
CLN6		CLN6	Lipofuscina
CLN7		MFSD8	Lipofuscina
CLN8		CLN8	Lipofuscina
<b>Defectes en la degradació de Polipèptids</b>			
Picnodisostosi	Síndrome de Toulouse-Lautrec	Catepsina K	Proteïnes òssies
<b>Defectes en Transportadors Lisosòmics</b>			
Malaltia de Salla	Sialúria	Sialina	Sialil-oligosacàrids
Cistinosis		Cistinosis (Transportador lisosomal de cistina)	Cistina
<b>Defectes en proteïnes implicades en el tràfic lisosòmic</b>			
AMRS	Arthrogryposis, mental retardation, seizures	Transportador UDP-N-acetilglucosamina	N-Glicans ramificats
Mucopolidiosi II - III			
Mucopolidiosi II - III α/β	Polidistròfia pseudo-Hurler	N-Acetilglucosamina-1-Fosfat Transferasa	Oligosacàrids, Mucopolisacàrids, Lípids
Mucopolidiosi II - III γ		N-Acetilglucosamina-1-Fosfat Transferasa	Oligosacàrids, Mucopolisacàrids, Lípids
Mucopolidiosi IV	Sialolipidiosi	Mucopolidina-1	Mucopolisacàrids i Lípids
Malaltia de Danon	Pseudoglicogenosi tipus II	LAMP-2	Glucogen i debrís citoplasmàtic
Síndrome de Chédiak-Higashi		LYST	Varis productes
Síndrome de Griscelli			
Síndrome de Griscelli tipus 1		MYO5A	Varis productes
Síndrome de Griscelli tipus 2	Síndrome de Paid	RAB27A	Varis productes
Síndrome de Griscelli tipus 3		Melanofilina	Varis productes
Síndrome de Hermansky-Pudlak		HPS1	Lipofuscina

Adaptat de Wilcox, 2004, Futerman i van Meer, 2004 i de Greiner-Tollersrud i Berg, 2005.

### **2.2.2. Simptomatologia**

Les LSDs presenten un ampli espectre de fenotips clínics, de manera que l'edat d'inici, la severitat dels símptomes i el grau d'afectació del Sistema Nerviós Central (SNC) poden variar dins una mateixa malaltia. Per tant, LSDs com la malaltia de Pompe o la malaltia de Gaucher presenten formes d'aparició infantil, juvenil i adulta (Greiner-Tollersrud i Berg, 2005). En general, la simptomatologia de les formes més greus apareix durant la primera dècada de vida i els de les formes lleus i moderades solen iniciar-se durant la segona o la tercera dècada. A nivell d'anormalitats físiques, moltes LSDs solen presentar organomegàlies, macroglòssia, trets facials toscos i progressius així com també d'altres malformacions esquelètiques. A banda, de les alteracions a nivell somàtic, en moltes LSDs també s'hi troba afectat el SNC. Així, les formes més greus, presenten neurodegeneració, neuropatia perifèrica, retard mental progressiu, anormalitats del comportament i hiperactivitat. Molts d'aquests símptomes i signes solen anar acompanyats d'alteracions a nivell oftalmològic, cardíac, gastrointestinal, renal o cutani (Wilcox, 2004; Vellodi, 2004).

### **2.2.3. Diagnòstic**

Degut a la seva baixa incidència, el diagnòstic de les LSDs normalment no és immediat i en la majoria de casos no s'hi arriba fins passats uns anys després d'haver-se descartat altres malalties més comuns o quan els símptomes són molt clars i la malaltia ja està establerta. En els casos de formes lleus, el diagnòstic final pot no establir-se fins a l'adolescència o fins a l'edat adulta. Les proves diagnòstiques específiques per a una determinada LSD només es duen a terme com a primer *screening* quan hi ha antecedents familiars. Generalment, la primera prova diagnòstica quan hi ha sospita d'una LSDs consisteix en avaluar els nivells d'un determinat producte d'acumulació lisosòmica en orina, tot i que una de les proves definitives que permeten el diagnòstic final és la disminució o absència d'una activitat enzimàtica lisosòmica concreta, ja sigui en leucòcits sanguinis o en biòpsies de pell.

### **2.2.4. Tractament**

Fins a data d'avui, no hi ha cap tractament definitiu per a la majoria de LSDs. Els tractaments disponibles són pal·liatius i basats principalment en el tractament simptomàtic. En tractar-se de malalties degeneratives, tant a nivell del SNC com a

nivell somàtic, és imprescindible un diagnòstic ràpid per començar el tractament simptomàtic el més aviat possible, ja que aquest és més efectiu quan abans s'inicia.

La majoria de LSDs són causades per deficiències en els enzims lisosòmics solubles o hidrolases àcides. Un cop al medi extracel·lular, aquests enzims poden ser captats per les cèl·lules veïnes gràcies al seu reconeixement i posterior endocitosi mediada pel receptor de la M6P (Figura 2). Aquest fet distintiu de la majoria d'enzims lisosòmics permet el desenvolupament d'estratègies basades en l'administració intravenosa de la versió corregida de l'enzim deficitari, conegudes com Teràpies de Reemplaçament Enzimàtic (ERT: *Enzyme Replacement Therapy*).

Al 1991, la Malaltia de Gaucher va ser la primera LSD en ésser tractada amb èxit amb ERT. Des d'aleshores, la ERT es troba comercialment disponible per a algunes LSDs com les malalties de Fabry, Pompe i per algunes Mucopolisacaridosis. Tot i la seva disponibilitat per aquestes LSDs, la producció d'enzim recombinant suposa un gran cost, que es calcula que pot arribar a ser entre 250 mil i 1 milió de dòlars per pacient i any (Rohrbach i Clarke, 2007).

Lluny de representar una cura definitiva, la ERT únicament sol comportar una regressió poc significativa de les manifestacions sistèmiques i una millora lleu de la qualitat de vida. A més, l'enzim administrat per via intravenosa és eliminat ràpidament de la circulació i el seu efecte terapèutic és transitori, per la qual cosa es requereix d'administracions periòdiques (Desnick i Schuchman, 2012). La ERT tampoc dona lloc a canvis significatius en la funció cognitiva dels pacients degut a que la principal limitació d'aquesta teràpia resideix en la incapacitat de l'enzim recombinant administrat per via intravenosa de travessar la Barrera Hematoencefàlica (BHE) i corregir l'afectació del SNC (Futerman i van Meer, 2004). Per tal de superar aquest inconvenient i que l'enzim arribi al SNC, l'administració intratecal directa al líquid cefaloraquídi (LCR) representa una millora tot i els riscos d'infecció associats que comporta la persistència d'un catèter permanentment connectat (Felice, 2011). Aquesta aproximació ha demostrat ser efectiva en models animals de MPS IIIA (Hemsley, 2009) i de MPS I (Kakkis, 2004), i actualment hi ha assajos clínics basats en l'administració intratecal d'enzim recombinant en pacients d'aquestes malalties (NCT00215527, NCT 01155778, clinicaltrials.gov).

Altres teràpies alternatives estan essent desenvolupades per tal de superar l'inconvenient que suposa la BHE. Entre elles, el trasplantament al·logènic de medul·la òssia, de Cèl·lules Mare Hematopoètiques (HSCs: *Hematopoietic Stem Cells*), o de

Cèl·lules Mare de Cordó Umbilical, han demostrat ser efectives només en el tractament d'algunes LSDs (Whitley, 1993; Krivit, 1999; Staba, 2004).

També s'estan desenvolupant les Teràpies de Reducció de Substrat, basades en l'administració de petites molècules amb la capacitat de travessar lliurement la BHE i d'inhibir parcialment els enzims encarregats de la biosíntesi de les macromolècules que es degraden als lisosomes i reduir-ne així la seva acumulació. Aquestes teràpies han demostrat certa efectivitat en estudis clínics amb pacients de les malalties de Niemann Pick (Pineda, 2010), Tay-Sachs (Enns i Huhn, 2008) i també en alguns subtipus de MPS (de Ruijter, 2012).

Una altra teràpia experimental es coneix com *Chemical Chaperoning* o *Enzyme Enhancement Therapies*, consistents en l'administració de petites molècules amb la capacitat de creuar la BHE i d'estabilitzar el plegament proteic. D'aquesta manera, i sobretot en pacients amb LSDs amb una activitat enzimàtica residual, s'afavoreix el correcte plegament proteic de l'enzim augmentant-ne així la seva activitat residual. Aquesta aproximació ha demostrat ser efectiva en fibroblasts de pacients de les malalties de Gaucher (Sawkar, 2006), Fabry (Fan, 2007) o Pompe (Okumiya, 2007).

Del conjunt de tractaments experimentals actuals, la teràpia gènica *in vivo* es postula com la teràpia d'elecció per al tractament, no només de la majoria de les LSDs, sinó també de moltes malalties genètiques hereditàries monogèniques, ja que permet la possibilitat d'un únic tractament efectiu de per vida (Mingozi i High, 2011). Aproximacions de teràpia gènica basades en la utilització de vectors virals per al tractament de LSDs, estan demostrant la seva eficàcia en models animals (Ellinwood, 2011; Haurigot, 2013; Passini, 2014). Fins a data d'avui però, no hi ha cap protocol basat en vectors virals aprovat per al tractament de LSDs.

### 2.3. Mucopolisacaridosis

Les Mucopolisacaridosis (MPS) són un grup de LSDs caracteritzades per mutacions en els gens codificants per enzims lisosòmics que participen en la degradació de diferents tipus de Mucopolisacàrids, també anomenats Glicosaminoglicans (GAGs), la qual cosa comporta la seva acumulació patològica a l'interior dels lisosomes de les cèl·lules afectades (Muenzer, 2011; Coutinho, 2012). L'acumulació sostinguda en el temps de GAGs dona lloc a un dany cel·lular progressiu que afecta múltiples teixits i pot conduir a discapacitat cognitiva, fallada orgànica i

reducció significativa de l'esperança de vida. Degut a la seva baixa prevalença i incidència, les MPS s'inclouen dins el grup de malalties minoritàries (Taula 2).

**Taula 2. Incidència dels diferents tipus de MPS**

Malaltia	Incidència (casos per 100.000 naixements)	
	Global <sup>1</sup>	UE <sup>2</sup>
<b>MPS I</b> - Hurler, Scheie, Hurler/Scheie	0,69–1,66	1
<b>MPS II</b> -Hunter	0,30–0,71	0,6
<b>MPS III</b> - Sanfilippo		0,87 <sup>a</sup>
<b>MPS IIIA</b> - Sanfilippo A	0,29–1,89	
<b>MPS IIIB</b> - Sanfilippo B	0,42–0,72	
<b>MPS IIIC</b> - Sanfilippo C	0,07–0,21	
<b>MPC IIID</b> - Sanfilippo D	0,1	
<b>MPS IV</b> - Morquio		0,4 <sup>b</sup>
<b>MPS IVA</b> - Morquio A	0,22–1,3	
<b>MPS IVB</b> - Morquio B	0,02–0,14	
<b>MPS VI</b> - Morateaux-Lamy	0,36–1,30	0,16
<b>MPS VII</b> - Sly	0,05–0,29	0,01
<b>MPS IX</b>	4 casos descrits	-

Incidència dels diferents tipus de MPS en estudis bibliogràfics a la UE i arreu del món. <sup>1</sup>Adaptat de Muenzer, 2011; <sup>2</sup>Adaptat de *Prevalence of Rare Diseases: Bibliographic Data. Orphanet Report Series*, Novembre 2013; <sup>a</sup>Prevalença global per a la MPS III; <sup>b</sup>Prevalença global per a la MPS IV.

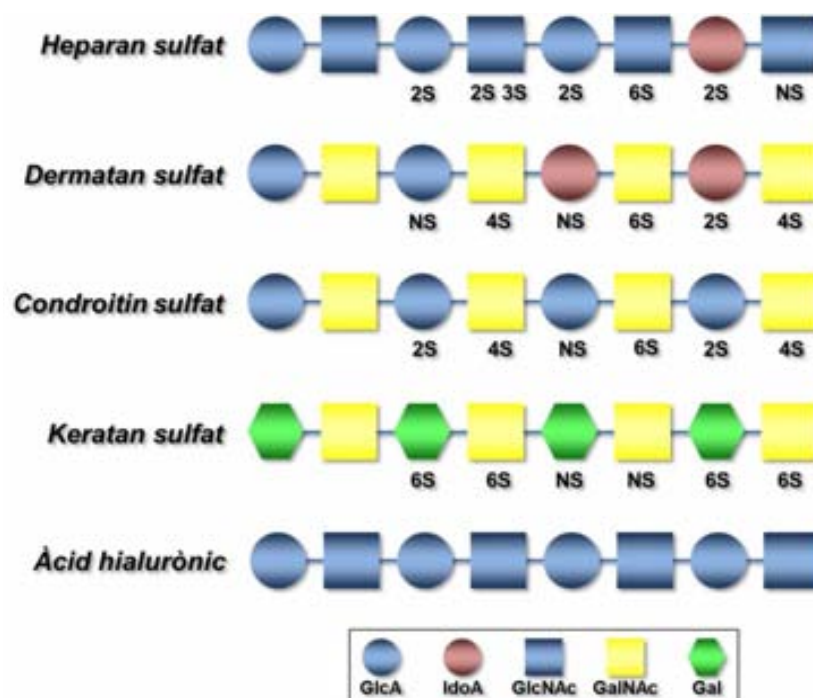
S'han identificat diferents tipus de MPS en funció de l'enzim deficitari i en conseqüència, del GAG acumulat. Totes elles són d'herència autosòmica recessiva, excepte la MPSII, que és d'herència lligada al sexe (Taula 1).

La MPSII o Malaltia de Hunter va ser la primera MPS de la qual se'n té constància científica documentada. Al 1917 el Dr. Charles Hunter, el qual va donar nom a la malaltia (Hunter, 1917), la va descriure per primera vegada en 2 bessons canadencs. Des d'aleshores, 7 subtipus diferents de MPS han estat identificats (Taula 2).

### 3. GLICOSAMINOGLICANS

Els Glicosaminoglicans, també anomenats Mucopolisacàrids, es troben formant part dels proteoglicans estructurals o bé de les membranes cel·lulars. Són precisament les formes parcialment degradades d'aquests GAGs les que s'acumulen de manera patològica a l'interior dels lisosomes en els diferents tipus de MPS.

Els GAGs estan formats per llargues cadenes no ramificades de polisacàrids, les quals presenten repeticions de disacàrids com a unitat bàsica. Aquesta unitat bàsica consta d'una hexosamina (N-acetil-D-glucosamina o N-acetil-D-galactosamina) unida a un àcid urònic (àcid glucurònic o àcid idurònic), a excepció del Keratan sulfat, on l'àcid urònic és substituït per una galactosa (Taylor i Gallo, 2006). Per tant, en funció de la seva estructura bàsica repetitiva, els GAGs es classifiquen en 4 famílies: (1) Heparan Sulfat, (2) Dermatan sulfat/Condroitin sulfat, (3) Keratan sulfat i (4) Àcid hialurònic (Figura 3). Durant la seva síntesi, els GAGs –a excepció de l'àcid hialurònic– pateixen gran nombre de modificacions, com acetilacions, epimeritzacions i sulfatacions, essent aquestes últimes essencials per a la seva funció específica.



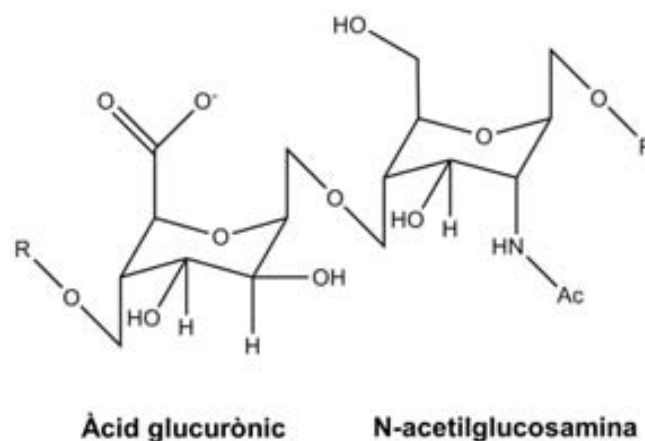
**Figura 3. Tipus i composició dels GAGs.** Esquematzació de la seqüència de carbohidrats dels diferents tipus de GAGs. GlcA: Àcid glucurònic; IdoA: Àcid idurònic; GlcNAc: N-acetil-D-glucosamina; GalNAc: N-acetil-D-galactosamina; Gal: Galactosa. XS indica el nombre de possibles sulfatacions per a cada carbohidrat; NS: No sulfatat. Adaptat de Taylor i Gallo, 2006.



Històricament s'havia considerat que els GAGs només tenien una funció estructural formant part dels proteoglicans de la matriu extracel·lular, però estudis posteriors han demostrat que també participen en processos inflamatoris, no únicament en la seva forma habitual formant part dels proteoglicans de matriu o de les membranes cel·lulars sinó també en les seves formes solubles.

A banda del seu paper en la resposta immunitària, els GAGs també actuen com a coreceptors de multitud de molècules, entre elles factors de creixement, participant així en la modulació de processos fonamentals per la cèl·lula, com la supervivència, la divisió, la migració o la diferenciació cel·lular (Kreuger, 2005; Ashikari-Hada, 2005).

L'*Heparan Sulfat* (HS) és un tipus de GAG present de forma ubiqua a la superfície de cèl·lules animals i vegetals, formant part dels proteoglicans de membrana i de la matriu extracel·lular. La seva unitat bàsica estructural més comú és la formada per un àcid glucurònic (GlcA) unit a una N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) per mitjà d'un enllaç O-glicosídic  $\beta(1\rightarrow4)$  (Figures 3 i 4). Alhora, els disacàrids formats per la unió del l'àcid glucurònic i la N-acetilglucosamina s'uneixen entre ells per enllaços  $\alpha(1\rightarrow4)$ . Aquest disacàrid o unitat bàsica estructural pateix diferents modificacions durant la síntesi del HS, com són N-deacetilacions i N-sulfatacions de la glucosamina, epimeritzacions de l'àcid glucurònic per donar lloc a subunitats d'àcid urònic, i sulfatacions tant de l'àcid urònic com de la glucosamina en diferents posicions (Sugahara i Kitagawa, 2002). El conjunt d'aquestes modificacions és el que acaba donant la funció específica al HS (Gallagher, 2006).



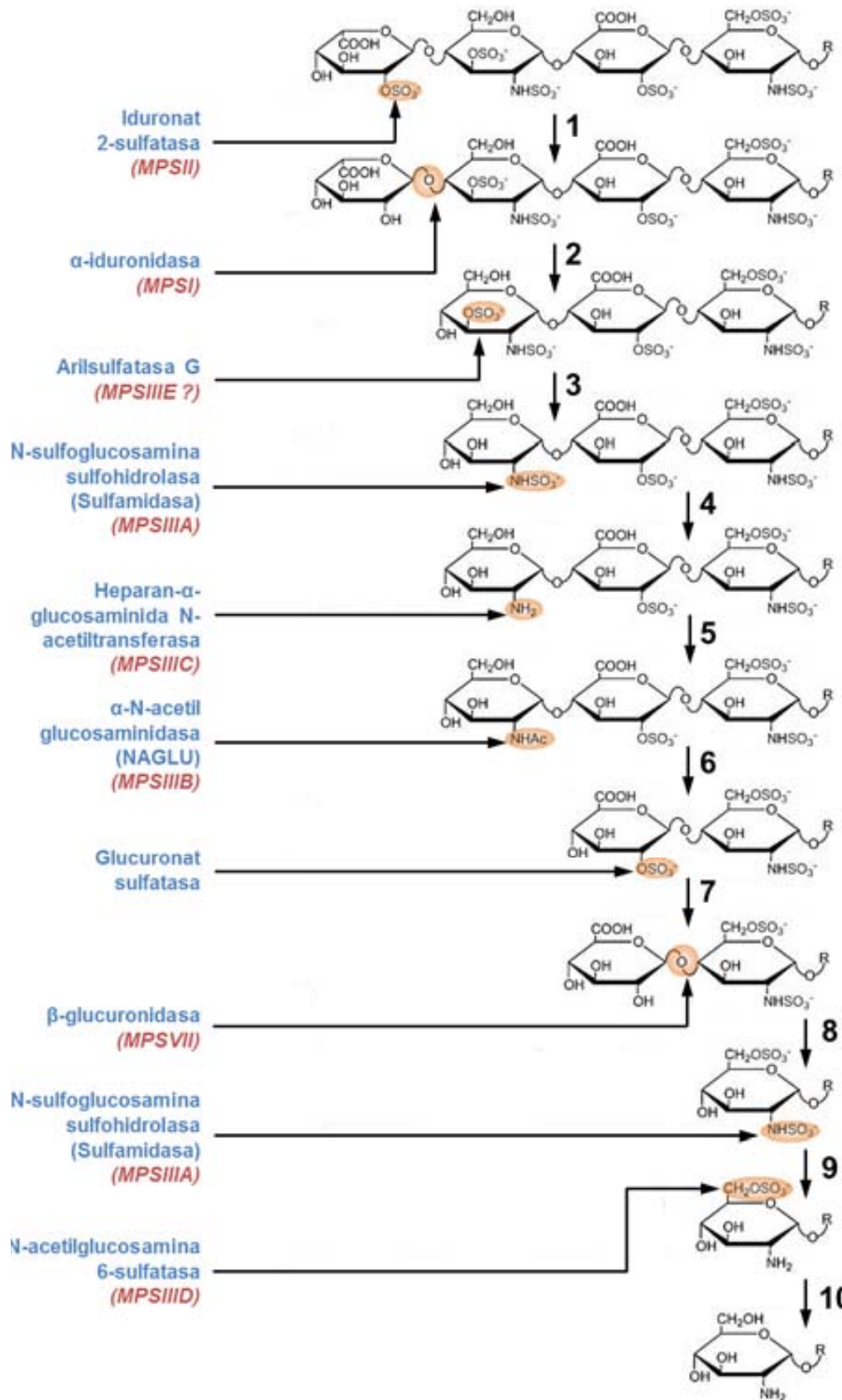
**Figura 4. Estructura de l'Heparan Sulfat.** La unitat bàsica repetitiva principal que dona lloc a la formació del HS és el disacàrid format per un àcid glucurònic i una N-acetilglucosamina.

El HS s'uneix a una gran varietat de factors de creixement, quimioquines i proteïnes de la matriu extracel·lular, i moltes d'aquestes interaccions són indispensables per tal que aquestes proteïnes puguin dur a terme la seva funció. Així, els proteoglicans formats per HS (HSPG: *Heparan Sulphate Proteoglycans*) actuen com a coreceptors de gran varietat de molècules i participen en gran varietat de processos: migració, proliferació, adhesió i diferenciació cel·lulars, angiogènesi i inflamació, entre d'altres (Dreyfuss, 2009).

En el cas de processos inflamatoris i en algunes malalties neurodegeneratives s'han observat nivells elevats tant de HSPG com de HS i dels seus productes de degradació. Després d'una lesió o en determinats estats patològics, el HS pot ser alliberat dels HSPG, i aquestes formes solubles poden ser posteriorment modificades alterant la seva llargada o revelant dominis específics que en la forma original no es trobaven exposats. Aquests GAGs solubles poden també actuar com a quimioattractants de leucòcits i cèl·lules glials en diversos processos inflamatoris (Gotte, 2003; Ausseil, 2008).

El HS també s'ha vist que pot intervenir en la senyalització nuclear, ja que diferents estudis n'han observat la seva presència al nucli cel·lular (Stewart i Sanderson, 2013).

Els enzims implicats en la degradació del HS que actuen en primer lloc, les heparanases, ho fan directament sobre els HSPG per alliberar-ne les cadenes de HS (Bame, 2001). És llavors quan aquestes cadenes de HS són transportades cap als lisosomes on té lloc la seva degradació. La degradació lisosòmica del HS és un procés multienzimàtic on tradicionalment s'ha descrit que hi participen de manera seqüencial 8 enzims, la deficiència d'algun dels quals és la causant d'algun dels subtipus de MPS (Figura 5). D'aquests 8 enzims, 4 són exclusius de la degradació del HS i la seva deficiència és la causant dels 4 subtipus de la Síndrome de Sanfilippo o MPSIII. Els enzims  $\alpha$ -iduronidasa, iduronat 2-sulfatasa i  $\beta$ -glucuronidasa estan implicats també en la degradació del GAG *Dermatan Sulfat*, i la seva deficiència dóna lloc a les MPSI, II i VI, respectivament (Taula 1). No es coneix cap defecte de la glucuronat sulfatasa, per la qual cosa no s'ha associat a cap malaltia.



**Figura 5. Degradació de l'Heparan Sulfat.** La degradació del HS és un procés multienzimàtic on hi participen 3 exoglicosidases (reaccions 2, 6 i 8), 5 sulfatases (reaccions 1, 3, 4, 7, 9 i 10) i una transferasa (reacció 5). En vermell s'indica la malaltia provocada per la deficiència de cadascun d'aquests enzims. Adaptat de Neufeld i Muenzer, 2001 i de Kowalewski, 2012.

Estudis recents proposen l'existència d'un nou pas essencial en la degradació del HS, no descrit encara, catalitzat per la sulfatasa lisosòmica Arilsulfatasa G (Frese, 2008). Ratolins *Knockout* (KO) per aquesta sulfatasa presenten un marcat fenotip molt similar a l'observat en la MPSIII, incloent acumulació de GAGs tant a cervell com a teixits somàtics, així com també alteracions de comportament, entre d'altres. Per aquesta raó, es va proposar anomenar la malaltia causada per la deficiència d'aquest enzim com a MPSIIIE (Kowalewski, 2012). Tot i no haver-hi cap cas descrit de MPSIIIE en humans, existeixen MPS de les quals no se'n coneix l'enzim deficitari i podrien respondre a una deficiència de l'Arilsulfatasa G. Així, caldria afegir una sulfatasa més en la via de degradació clàssica del HS, per la qual cosa, enlloc de 8 enzims n'hi participarien 9. L'Arilsulfatasa G actua també a nivell dels extrems no reductors del HS de-sulfatant residus de N-sulfoglucosamina-3-O-sulfat (Figura 5).

#### 4. MUCOPOLISACARIDOSI TIPUS IIIB

La Mucopolisacaridosi tipus III (MPSIII), també anomenada *Síndrome de Sanfilippo* en honor al metge que la va descriure per primera vegada (Sanfilippo, 1963), és una malaltia hereditària d'herència autosòmica recessiva caracteritzada per l'acumulació lisosòmica del GAG Heparan Sulfat. Al 1963, el Dr. Sylvester Sanfilippo va descriure una malaltia molt similar a les malalties de Hurler i Hunter (MPSI i MPSII, respectivament) caracteritzada per retard mental i per l'excreció anormalment elevada en orina de HS. Posteriorment, aquesta malaltia es va anomenar MPSIII i es va subdividir en 4 subtipus: A, B, C i D, en funció de l'enzim lisosòmic deficitari. Degut al fet que cada subtipus de MPSIII és causat per la deficiència d'un enzim lisosòmic específic (Taula1, Figura 5), els pacients mostren molta heterogeneïtat en la presentació de la clínica, fins i tot entre germans (Valstar, 2008), raó per la qual la predicció de l'evolució clínica d'un pacient esdevé gairebé impossible. De tota manera, s'assumeix que els 4 subtipus són clínicament molt similars, tot i que el subtipus A ha demostrat ser el que es presenta amb una major severitat, un inici més primerenc, una progressió més ràpida i una supervivència més curta (van de Kamp, 1981; Meyer, 2007; Valstar, 2010a).

L'enzim deficitari en la MPSIIIB és la N-acetilglucosaminidasa, alfa (NAGLU), una hidrolasa àcida que actua com a exoglicosidasa degradant els extrems no reductors dels residus de N-acetilglucosamina del HS (Figura 5), i és un dels quatre enzims lisosòmics implicats exclusivament en la degradació d'aquest GAG. Com a conseqüència, la pèrdua d'activitat enzimàtica NAGLU resulta en l'acumulació de HS, i la malaltia resultant es caracteritza clínicament per un inici durant la infantesa amb neuropatia progressiva del SNC. L'evolució clínica de la malaltia es pot subdividir en 3 fases. En la primera, després d'un període asimptomàtic durant els primers mesos de vida, es comença a fer aparent un alentiment del desenvolupament intel·lectual. En la segona fase s'observa l'aparició d'alteracions greus en el comportament així com també un empitjorament intel·lectual progressiu. Finalment, amb l'inici d'una demència severa, les alteracions en el comportament comencen a desaparèixer lentament i la majoria de funcions motores comencen a empitjorar, donant lloc a la pèrdua total de locomoció, disfàgia i lesions en el sistema piramidal. Els pacients solen morir cap a la fi de la segona o a l'inici de la tercera dècada de vida (Neufeld i Muenzer, 2001; Valstar, 2010b).

A banda d'aquesta forma més severa, una segona forma de progressió més lenta, d'inici en edats més tardanes i amb una supervivència més perllongada, coneguda

com MPSIIIB de fenotip atenuat, s'ha descrit en subgrups de pacients alemanys (Moog, 2007) i holandesos (Valstar, 2010b).

#### 4.1. Prevalença de la MPSIIIB

Tot i que la prevalença combinada dels quatre subtipus de MPSIII varia en funció de l'àrea geogràfica estudiada, gairebé totes les publicacions estan d'acord en el fet que la MPSIII és una malaltia minoritària degut a la seva baixa prevalença. Varis estudis epidemiològics s'han dut a terme per tal de valorar la prevalença i/o incidència de la MPSIIIB arreu del món, mostrant resultats amb molta variabilitat entre països. En general, es pot afirmar que d'entre els quatre subtipus de MPSIII, el subtipus A és el més comú al nord d'Europa i a Austràlia, mentre que el subtipus B és més prevalent a Brasil i al sud d'Europa (a excepció de l'Estat Espanyol, on el subtipus més freqüent és l'A) (Coelho, 1997; Emre, 2002; Meikle, 1999; Michelakakis, 1995, Delgado, 2013) (Taula 3.).

**Taula 3. Prevalences i incidències de la MPSIIIB**

<b>Grup d'estudi</b>	<b>Període d'estudi</b>	<b>Incidència o Prevalença (per 10.000)</b>	<b>Referència bibliogràfica</b>
Alemanya	1980 – 1995	0.036 (incidència)	Baehner, 2005
Austràlia	1980 – 1996	0.047 (prevalença al naixement)	Meikle, 1999
Dinamarca	1975 – 2004	0.009 (prevalença*)	Malm, 2008
França	1990 – 1994	0.010 (incidència)	Héron, 2010
Grècia	1990 – 1994	0.078 (incidència)	Héron, 2010
Holanda	1970 – 1996	0.042 (prevalença al naixement)	Poorthuis, 1999
Nord de Portugal	1966 – 1994	0.072 (prevalença al naixement)	Pinto, 2004
Nord d'Irlanda	1958 – 1985	0.012 (incidència al naixement)	Nelson, 1997
Noruega	1979 – 2004	0.009 (prevalença*)	Malm, 2008
Oest d'Austràlia	1969 – 1996	0.064 (incidència al naixement)	Nelson, 2003
Regne Unit	1990 – 1994	0.021 (incidència)	Héron, 2010
República Txeca	1975 – 2008	0.002 (prevalença al naixement)	Poupetová, 2010
Suècia	1975 – 2004	0.016 (prevalença*)	Malm, 2008
Taiwan	1984 – 2004	0.28 (incidència al naixement)	Lin, 2009

Recull d'incidències i prevalences de la MPSIIIB a la literatura científico-mèdica.

\*Prevalença conjunta dels subtipus A, B, C i D.

La recollida de dades vàlides per a l'estimació correcta de la prevalença i incidència de la MPSIIIB i altres malalties minoritàries, es fa difícil degut al fet que no estan subjectes a un registre obligatori. A més, com a conseqüència de la variabilitat clínica dels pacients i de la presència de formes lleus d'aparició adulta, el diagnòstic és sovint difícil fent que molts casos puguin ser passats per alt, donant lloc a una subestimació de la freqüència d'alguns subtipus.

Per tal de donar un únic valor per la prevalença de la MPSIIIB, no és aconsellable fer-ho a partir de les dades mostrades a la Taula 3, ja que són resultats molt variables entre ells, es refereixen a períodes de temps diferents i es basen en metodologies diferents. Un dels estudis més recents és el dut a terme per Héron i col·laboradors (Héron, 2011), en el qual es descriu la incidència combinada dels diferents subtipus de MPSIII a Europa, basat en l'estudi de més de la meitat de la població de la UE. En aquest estudi, la incidència extrapolada de la MPSIIIB a la UE s'estima de 14 naixements vius per any. Sota el supòsit d'una incidència estable al llarg del temps, es pot calcular la prevalença segons la fórmula  $P = I \times D$ , on  $P$  = prevalença,  $I$  = incidència i  $D$  = duració de la condició (en aquest cas, l'esperança de vida de la MPSIIIB). La duració de la condició per a la MPSIIIB es considera entre la segona i la tercera dècada de vida, i al voltant de la quarantena de vida per a les formes més atenuades (Valstar, 2010b). Prenent 30 anys de mitjana com a duració de la condició i estimant una població mitjana de 505.308.332 habitants a la UE (població mitjana de la UE entre els anys 2010 i 2013, segons la base de dades de l'*Eurostat*), es pot estimar la prevalença de la MPSIIIB segons:

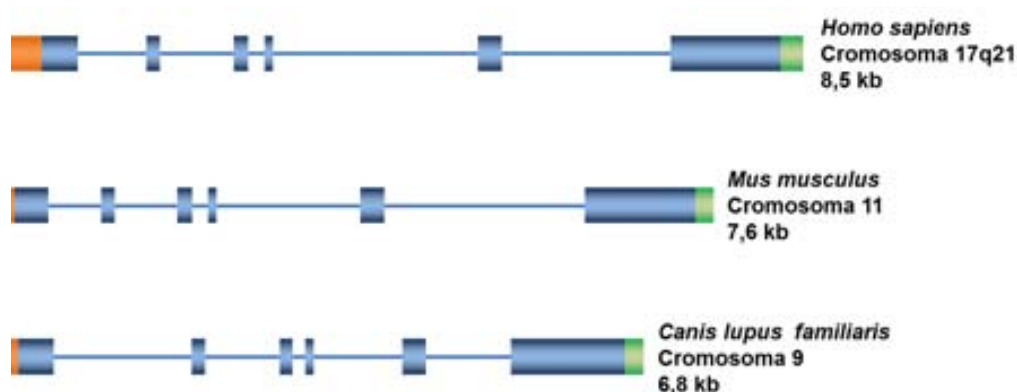
$$\text{Prevalença (P)} = \frac{14 \text{ casos/any}}{505.308.332 \text{ habitants}} \times 30 \text{ anys} = 0,008 \text{ en } 10.000$$

Per tant, el valor de prevalença estimat per a la Mucopolisacaridosi IIIB a la UE és de 0,008 en 10.000.

## 4.2. N-acetilglucosaminidasa, alfa (NAGLU)

### 4.2.1. Gen codificant per la proteïna NAGLU humana

El locus del gen *NAGLU* humà, identificat per primera vegada l'any 1996 (Zhao, 1996), es troba localitzat al cromosoma 17q21.1 i comprèn una regió d'aproximadament 8,3 kb des del lloc d'inici de traducció fins al lloc de poliadenilació, amb 6 exons de llargada variable, des de 86 bp fins a 1452 bp (Figura 6) (Weber, 2001; Yogalingam i Hopwood, 2001).



**Figura 6. Organització i localització cromosòmica dels gens codificants per la proteïna NAGLU humana, murina i canina.** Representació esquemàtica dels gens codificants per la N-acetilglucosaminidasa, alfa humana, murina i canina. Les caps de carabassa i verdes indiquen les regions no traduïdes en 5' i 3' respectivament. Les caps blaves indiquen els exons. La línia blava més prima indica els introns.

Mitjançant anàlisis d'expressió de mRNA s'ha determinat la presència de RNA d'aproximadament 2,7 kb corresponent al gen *NAGLU* humà, el qual es troba altament expressat en fetge i cor. Nivells més moderats del transcrit també s'han detectat a pràcticament la resta d'òrgans i teixits somàtics, així com també al SNC (Figura 7) (Weber, 1996; Su, 2004).



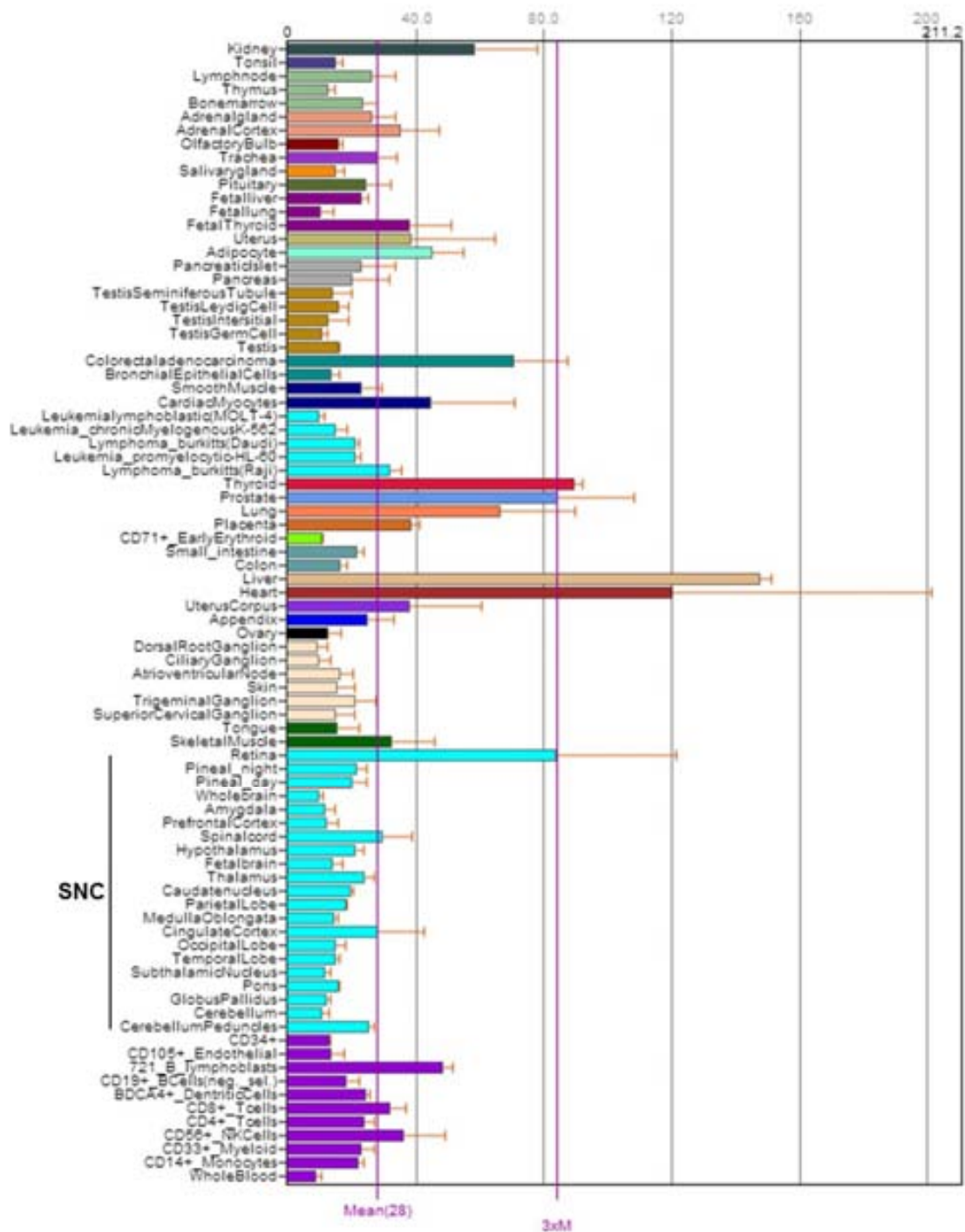


Figura 7. Expressió del gen *NAGLU* humà en diferents teixits. Els valors de l'eix superior fan referència a Unitats Arbitràries d'expressió. Extret de <http://biogps.org/#goto=genereport&id=4669>.

#### 4.2.2. Enzim NAGLU (EC 3.2.1.50)

L'enzim NAGLU actua hidrolitzant l'enllaç  $\alpha(1\rightarrow4)$  entre les N-acetilglucosamines terminals unides al corresponent àcid urònic, en les cadenes de HS. El cDNA de la NAGLU codifica per a una proteïna de 720 aminoàcids amb una seqüència inicial de 20 a 23 residus que formen el pèptid senyal. També presenta 6 llocs potencials per a N-glucosilacions als residus d'asparagina 261, 272, 435, 503, 526, i 532 (Zhao, 1996; Yogalingam i Hopwood, 2001). Com a mínim, un d'aquests residus permet l'addició de cadenes laterals amb carbohidrats fosforilats. (Weber, 2001; Beesley, 2005).

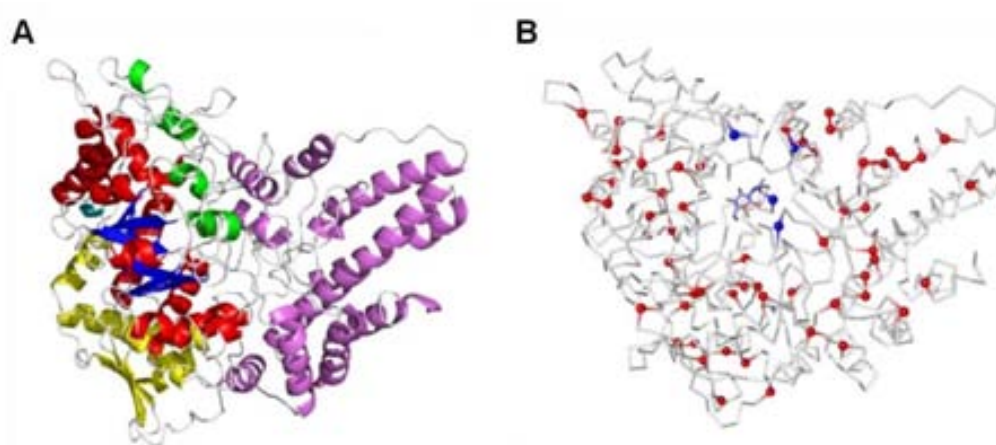
L'enzim NAGLU ha estat purificat i estudiat a partir de fetge (Sasaki, 1991), placenta (Weber, 1996) i orina (Weber, 2001); la seva biosíntesi i posterior maduració també s'ha avaluat en fibroblasts de pacients de MPSIIIB (von Figura, 1984; Ballabio, 1984) i en cèl·lules de carcinoma humà (Di Natale, 1985). El pes molecular de l'enzim varia entre 80 kDa i 86 kDa per la forma precursora immadura, 77 kDa per la forma intermèdia i 73 kDa per la forma madura (Beesley, 2005).

#### 4.2.3. Mutacions en el gen NAGLU humà

S'ha proposat un model estructural per la NAGLU humana basat en l'estructura de l'enzim *CpGH98*, un homòleg bacterià de la proteïna NAGLU (Ficko-Blean, 2008). Aquest estudi revela les bases estructurals del centre actiu de l'enzim i alhora ha permès mapar gran part de les mutacions descrites en els pacients afectats per la MPSIIIB, mutacions àmpliament distribuïdes al llarg de l'estructura proteica (Figura 8).

Fins a dia d'avui, més de 100 mutacions diferents en el gen *NAGLU* humà han estat associades amb la MPSIIIB, incloent-hi 68 mutacions amb canvi de sentit (*missense mutacions*), 9 mutacions sense sentit (*nonsense mutations*), 21 petites delecions, 10 insercions i 2 mutacions de *splice site* (Yogalingam i Hopwood, 2001; Champion, 2010). La majoria d'aquestes mutacions es troben confinades a famílies concretes i, per tant, es presenten amb baixes freqüències al·lèliques. De tota manera, un petit nombre de mutacions recurrents han estat descrites en diferents poblacions, com per exemple la mutació R626X, que afecta a un 16,7% dels al·lèls mutats en els pacients MPSIIIB grecs (Beesley, 2005). O la mutació P521L, observada en 3 de cada 4 al·lèls mutats en dues famílies de Hong Kong. Ambdues famílies són d'origen xinès però no estan relacionades, per la qual cosa s'especula que hi pot haver un efecte fundador de la mutació P521L en la població xinesa de Hong Kong (Beesley, 2005).

De la mateixa manera, en la població turca també s'han descrit altres mutacions que podrien tenir un efecte fundador (G79C, c.IVS5-2A>G, R482W) (Bunge, 1999; Emre, 2002).



**Figura 8. Estructura proteica predita per l'enzim  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa humana. (A)** Representació esquemàtica del plegament en 3D del model d'homologia de la proteïna NAGLU humana obtingut a partir de l'estructura de l'homòleg bacterià CpGH98 present en *Clostridium perfringens*. **(B)** Model estructural on s'hi mostra la localització de les mutacions conegudes causants de la MPSIIIB. Els residus mutats es mostren com esferes; les esferes blaves pertanyen a residus del centre actiu, mentre que les vermelles fan referència a residus no pertanyents al centre actiu. Adaptat de Ficko-Blean, 2008.

Les mutacions R482W, R565W, R565P i delTG2171– 2172 han estat descrites en pacients d'altres grups ètnics associades a fenotips severos de MPSIIIB (Weber, 1999; Bunge, 1999; Tanaka, 2002).

Posteriorment, en una anàlisi molecular dut a terme en pacients portuguesos es va concloure que la mutació R234C es trobava present en el 32% dels al·lels mutats. Estudis posteriors en pacients de l'Estat Espanyol, també han demostrat l'existència d'aquesta mateixa mutació en heterozigosi en pacients de MPSIIIB. El fet de compartir un haplotip ancestral entre la població portuguesa i l'espanyola de la Península Ibèrica suggereix un origen comú d'aquesta mutació dins la Península, fet que alhora explicaria l'elevada incidència d'aquesta mutació en els pacients de la Síndrome de Sanfilippo B en aquesta regió geogràfica (Mangas, 2008; Delgado, 2013).

Altres estudis també han permès identificar noves mutacions no descrites fins aquest moment: la mutació R565Q en homozigosi present en 3 de 4 germans afectats de MPSIIIB d'una família iraniana (Najmabadi, 2011); la deleció c.867delC i la mutació

W361R en un estudi realitzat en 3 famílies xineses no relacionades (Tang, 2013); o la mutació de *splicing* IVS2+5G>A identificada en pacients espanyols (Delgado, 2013). La identificació constant de noves mutacions permet enriquir el coneixement sobre l'espectre de mutacions del gen *NAGLU* i poder-ho així relacionar amb el fenotip observat per a una millor comprensió de la patogènesi de la MPSIIIB. La gran varietat de mutacions identificades reflexa doncs, la gran heterogeneïtat clínica observada en aquesta malaltia.

### **4.3. Simptomatologia de la MPSIIIB**

#### **4.3.1. Síntomes inicials**

Després d'un període inicial asimptomàtic, la malaltia se sol presentar entre el primer i quart any de vida de mitjana (rang entre 1 i 10 anys), essent el principal símptoma el retard en el desenvolupament en combinació amb problemes de comportament i retard en la parla (Beesley, 1998; Meyer, 2007; Valstar, 2010b).

#### **4.3.2. Trastorns del comportament i alentiment del desenvolupament**

L'alentiment en el desenvolupament i la disminució de les habilitats intel·lectuals que comporten les dificultats en l'aprenentatge, es presenten inicialment a l'edat de 4 anys. En aquest moment, els pacients mostren una pèrdua progressiva de funcions motores i mentals. La regressió de les habilitats intel·lectuals, en particular la pèrdua de la parla que se sol donar en fases inicials i en molts casos abans de fer-ne el diagnòstic, precedeix l'inici del retard de les funcions motores (Bax i Colville, 1995; Valstar, 2008; Valstar, 2010b). Els atacs epilèptics, així com la falta de coordinació en caminar són també freqüents.

Les alteracions del comportament solen aparèixer a l'edat dels 5 anys i se solen iniciar amb inquietud i agitació intenses. També és freqüent observar *temper tantrums* (rebequeries), atacs de plor i comportament agressiu, hiperactiu i destructiu (Beesley, 1998; Valstar, 2010b; Delgado, 2013). Els comportaments agressius poden esdevenir extremadament problemàtics en pacients adults, degut a la preservació de les funcions motores i de la força física (Moog, 2007; Valstar, 2010b). Amb la progressió de la malaltia, els problemes de comportament disminueixen i finalment desapareixen com a conseqüència del retard mental, donant lloc a la pèrdua completa d'iniciativa.

#### 4.3.3. *Trastorns del son*

Els pacients amb MPSIIIB sovint presenten un temps de son nocturn reduït, una pobre qualitat del son, un augment en els episodis de son durant el dia i una major dificultat per adormir-se (Moog, 2007; Valstar, 2010b). Aquestes alteracions poden ser episòdiques, combinades amb períodes de millora i fins i tot amb patrons normals del son. Aquests fets impliquen l'alteració del ritme circadiari normal, la qual cosa s'evidencia amb la presència d'alteracions en els nivells de melatonina (Mahon, 2014).

#### 4.3.4. *Simptomatologia somàtica*

Gairebé tots els pacients afectats de la Síndrome de Sanfilippo B són propensos a patir infeccions, principalment d'oïda i de vies altes i baixes del sistema respiratori (Cleary i Wraith, 1993). Són també usuals els trastorns del sistema digestiu manifestats com a episodis diarreïcs (Valstar, 2010b; Delgadillo, 2013).

En alguns casos, els pacients mostren degeneració articular progressiva que acaba interferint amb la mobilitat normal al voltant dels 10 anys (Cleary i Wraith, 1993; Neufeld i Muenzer, 2001). També s'observen problemes per mantenir l'equilibri i, en conseqüència, caigudes freqüents. En general, els pacients amb un fenotip més sever acaben depenent d'una cadira de rodes durant l'adolescència, mentre que els que presenten un fenotip més atenuat no solen necessitar-la fins a la quarta dècada de vida (Meyer, 2007; Valstar, 2010b).

Una lleu hepatomegàlia se sol observar en pacients joves, mentre que l'esplenomegàlia és menys freqüent (van de Kamp, 1981; Neufeld i Muenzer, 2001). D'altra banda, no hi sol haver afectació cardíaca fins a les fases finals de la malaltia, quan es poden observar alteracions valvulars, hipertròfia ventricular i/o arítmies (Cleary i Wraith, 1993; Valstar, 2010b).

Les anormalitats esquelètiques són també presents en la majoria de pacients, incloent *disostosis multiplex*, rigidesa articular, displàsia de maluc, hiperplàsia dels ossos facials, escoliosi i anormalitats que afecten les extremitats posteriors, com per exemple *hallux valgus*, *pes equinus*, *pes planovalgus* i escurçament del tendó de la corva (Moog, 2007). Els dimorfismes facials, tot i que generalment solen ser lleus, se solen detectar en la majoria de pacients. Amb la progressió de la malaltia, els trets facials toscos característics de les MPS tendeixen a fer-se més evidents: celles amples i prominents, cara allargada, front prominent i curt, i llavis gruixuts (Valstar, 2008). La

macrocefàlia és també freqüent en nens, mentre que els pacients amb formes lleus solen presentar una circumferència cranial normal (van de Kamp, 1981).

Amb l'evolució de la malaltia també apareixen les dificultats per menjar, que es van accentuant de manera progressiva degut a la impossibilitat per mastegar i empassar (Yogalingam i Hopwood, 2001). Les dificultats per empassar es troben presents en tots els pacients majors de 30 anys (pacients amb fenotip atenuat) (Moog, 2007).

La pèrdua d'audició se sol observar en etapes més avançades de la malaltia (Cleary i Wraith, 1993), i és més comú en pacients afectats per les formes més severes (Neufeld i Muenzer, 2001).

#### **4.3.5. Mort**

La neuropatia progressiva del SNC comporta la mort, generalment, entre la segona i la tercera dècada de vida (Bunge, 1999; Meyer, 2007), tot i que supervivències més elevades s'observen en pacients amb fenotips més atenuats, havent-t'hi constància de pacients majors de 50 anys (Moog, 2007; Valstar, 2010b).

Les causes de mort són principalment per infeccions respiratòries cròniques, generalment pneumònies, fet que complica la severa debilitat que pateixen aquests pacients (Neufeld i Muenzer, 2001; Meyer, 2007; Valstar, 2010b; Delgadillo, 2013).

### **4.4. Diagnòstic**

#### **4.4.1. Diagnòstic convencional**

La primera prova diagnòstica en realitzar-se quan hi ha sospita de MPS és la quantificació de GAGs excretats en orina. Els pacients amb Síndrome de Sanfilippo presenten una lleu excreció de GAGs en orina, per la qual cosa prèviament cal precipitar o separar els GAGs per mètodes electroforètics per tal de concentrar-los, identificar-ne el tipus i poder diagnosticar correctament els pacients (Gray, 2007). Per tant, uns nivells anormalment elevats de HS en orina, sense increment de cap altre GAG, és clarament suggestiu de la Síndrome de Sanfilippo. Alhora, els nivells plasmàtics i urinaris de GAGs poden ser marcadors de la severitat de la malaltia (de Ruijter, 2013). Un cop determinada l'heparan sulfatúria, es realitzen proves d'activitat

enzimàtica en leucòcits o fibroblasts per tal d'obtenir el diagnòstic definitiu i la classificació del subtipus en A, B, C o D. Per a la detecció d'activitat enzimàtica dels 4 subtipus s'utilitzen substrats sintètics conjugats amb el fluoròfor 4-Metilumbeliferona (Marsh i Fensom, 1985; He, 1993; Voznyi YaV, 1993; Karpova, 1996).

#### **4.4.2. Diagnòstic postnatal**

Degut a la necessitat de diagnosticar els pacients abans que s'estableixi una acumulació patològica de GAGs causant efectes irreversibles, actualment s'està investigant en el desenvolupament de noves proves diagnòstiques per a la detecció de totes les MPS i poder-les realitzar en recent nascuts. Aquestes proves es basen en la detecció de substàncies que mostren una clara acumulació en els pacients de totes les MPS, que generalment són proteïnes implicades amb l'estabilitat estructural dels lisosomes, com per exemple LAMP-1 (*Lysosomal-associated membrane protein-1*). En un estudi dut a terme per Meikle i col·laboradors es va avaluar els nivells plasmàtics de LAMP-1 en pacients diagnosticats de MPSIIIB, i es va poder observar que els nivells proteics de LAMP-1 es trobaven significativament augmentats la majoria dels pacients estudiats (Meikle, 1999). Tot i així, estudis posteriors on es mesurava també la presència de LAMP-1, no van mostrar canvis significatius (Meikle, 2004). Altres proteïnes lisosòmiques, com per exemple LAMP-2 o Chitotriosidasa (proteïna secretada per macròfags que s'ha trobat elevada en pacients amb la malaltia de Gaucher), s'han estudiat com a possibles biomarcadors, però també amb resultats poc concloents (Guo, 1995; Hua, 1998).

#### **4.4.3. Diagnòstic prenatal**

El diagnòstic prenatal es pot realitzar en embarassos de famílies que ja tenen un fill diagnosticat de MPSIIIB. Hi ha 3 formes de diagnòstic prenatal (Hendriksz, 2012):

- (a) *Biòpsia de les vellositats coriòniques*. Se sol dur a terme entre les setmanes 10 i 14 de l'embaràs. Si es desconeix la mutació causal de la malaltia, es pot realitzar un estudi d'activitat enzimàtica NAGLU, per la qual cosa cal dur a terme un cultiu cel·lular de les vellositats. Si, pel contrari, es coneix la mutació causal, directament es pot extreure DNA de les vellositats i fer-ne l'anàlisi per detectar-ne la mutació.

- (b) *Amniocentesi*. El coneixement de la mutació causal permet dur a terme el diagnòstic prenatal a partir de DNA extret d'amniòcits cultivats. Si es desconeix la mutació, es pot realitzar l'anàlisi d'activitat enzimàtica en també en amniòcits cultivats. A més, el líquid amniòtic permet la determinació de GAGs com a prova complementària al diagnòstic.
- (c) *Diagnòstic preimplantacional d'embrions*. Només pot tenir lloc si es coneix la mutació o mutacions específiques de la família afectada.

#### 4.5. Correlació genotip-fenotip

L'àmplia variabilitat clínica observada en pacients de MPSIIIB reflecteix l'elevat grau d'heterogeneïtat molecular descrit en les mutacions subjacents. A més a més, la interpretació del fenotip clínic derivat de les diferents mutacions és difícil en una malaltia on la característica principal és la degeneració del SNC, i gran part de l'avaluació clínica és el resultat d'observacions qualitatives independents que no sempre són comparables.

Es considera que les LSDs es caracteritzen per un "llindar clínic" d'activitat enzimàtica circulant per sobre de la qual l'enzim és capaç de degradar el seu substrat i disminuir-ne la seva acumulació, permetent així que no s'estableixi la malaltia (Conzelmann i Sandhoff, 1983; Leinekugel, 1992). Aquest llindar depèn de la malaltia, ja que és molt baix per exemple en la MPSI, que amb només el 0,1% d'activitat enzimàtica s'observa correcció de l'acumulació lisosòmica, mentre que el llindar per a la malaltia de Gaucher sembla situar-se entre l'11 i el 15% d'activitat (Schueler, 2004). Estudis preclínic basats en ERT o en aproximacions de teràpia gènica en altres formes de MPS han demostrat que nivells circulants baixos d'enzim (de només el 5% de l'activitat normal) donen lloc a la correcció de l'acumulació de GAGs en alguns teixits somàtics (Donsante, 2007; Garcia, 2007). En el cas particular de la Síndrome de Sanfilippo A, s'han identificat individus portadors de mutacions associades amb fenotip lleu i amb certa activitat enzimàtica residual, la qual cosa suggereix que els nivells baixos però constants d'activitat són suficients com per variar el curs de la malaltia (Meyer, 2007).

També s'han realitzat diferents estudis correlacionant la severitat del fenotip amb mutacions concretes. Així, les mutacions F48L, G69S, S612G, R643C i L497V s'han observat en fenotips lleus de MPSIIIB (Yogalingam i Hopwood, 2001; Valstar, 2010b).



Pel contrari, en un estudi realitzat per Weber i col·laboradors es va determinar que totes les mutacions que donaven lloc a la terminació prematura de la proteïna eren les que correlacionaven amb els fenotips més severos (Weber, 1999). D'altra banda, les mutacions sense sentit V334F i P521L en homozigosi així com també la pèrdua del codó stop en combinació amb la mutació R297X confereixen un fenotip sever (Weber, 1999).

La predicció de la correlació genotip-fenotip per a la MPSIIIB resulta també complicada degut a la presència de polimorfismes presents al gen *NAGLU* (Zhao, 1998; Weber, 1999). No queda clar, però, si la presència d'aquests polimorfismes modifica l'activitat residual de l'enzim *NAGLU* mutant en els pacients (Zhao, 1998; Yogalingam i Hopwood, 2001). Per tant, en la majoria de casos, és aquesta gran heterogeneïtat al·lèlica la que dificulta una precisa correlació genotip-fenotip.

#### 4.6. Patofisiologia de la MPSIIIB

Els GAGs, i el HS entre ells, formen part dels proteoglicans presents a la matriu extracel·lular i a la membrana cel·lular, de manera que es troben en gairebé tots els tipus cel·lulars. Aquests mucopolisacàrids juguen un paper determinant en el suport mecànic dels diferents teixits ja que són els responsables d'acumular grans volums d'aigua. A banda d'aquesta funció estructural, també es troben implicats en múltiples funcions cel·lulars com el creixement cel·lular, les interaccions intercel·lulars, la immunitat, la defensa contra infeccions virals, la coagulació i el metabolisme lipídic. Aquest ampli rang de funcions els ve determinat per la seva capacitat d'unió a diferents proteïnes, com proteases, factors de creixement o quimioquines (Capila i Linhardt, 2002). Per aquesta raó, és concebible que l'excés de formes parcialment degradades de HS així com d'oligosacàrids derivats del HS que s'acumulen als lisosomes i són alliberats a l'espai extracel·lular en pacients de la MPSIIIB, poden interferir amb els processos mencionats, agreujant la malaltia (Valstar, 2008). De tota manera, el conjunt d'esdeveniments patològics responsables de la disfunció i la mort cel·lular no es coneixen amb certesa.

El HS presenta funcions importants tant en el desenvolupament com en la plasticitat neuronal i se sap que pot actuar com a receptor de baixa afinitat pels membres de la família del Factor de creixement de fibroblasts (FGF: *Fibroblast Growth Factor*), com per exemple FGF-1, FGF-2 o el seu receptor FGFR (Yayon, 1991). Una de les funcions clau del complex FGF-2/HS és la de regular el creixement i la

proliferació d'astròcits, els quals tenen un paper crític en el manteniment de l'homeòstasi neuronal, en particular després d'una lesió o en processos patològics. A més, el FGF-2 que té també un paper neuroprotector i activador de la proliferació en neurones i en cèl·lules precursors neuronals, s'ha trobat disminuït al cervell del ratolí MPSIIIB, el què explicaria l'elevada taxa d'apoptosi i la reducció de la proliferació neuronal observades en aquesta malaltia (Li, 2002).

#### **4.7. Tractament convencional**

Per al correcte tractament dels pacients amb MPSIIIB es fan necessàries avaluacions periòdiques, cures de suport i un equip clínic multidisciplinari que pugui abordar la gran varietat de complicacions neurològiques i sistèmiques.

Actualment no es disposa de cap tractament específic aprovat ni eficaç per la MPSIIIB. Els tractaments disponibles són únicament simptomàtics i destinats a alleujar les alteracions derivades de la neurodegeneració i de les malformacions esquelètiques, així com també millorar tant la qualitat de vida dels pacients com la de les famílies. Degut al fet que l'afectació somàtica en la MPSIIIB no és gaire pronunciada en comparació amb d'altres MPS, els principals esforços es basen en el tractament dels signes i símptomes derivats de les alteracions del SNC.

L'engruiximent de les meninges com a conseqüència dels dipòsits de GAGs és la principal causa de l'augment de pressió intracranial del LCR, que en molts casos es correlaciona amb alteracions del comportament (Muenzer, 2009). Per aquesta raó, quan les alteracions en el comportament són refractàries a la medicació convencional, la col·locació d'un sistema de derivació pot ser útil per tal d'alleujar la pressió. Els símptomes neurològics van millorar en sis pacients afectats de la Síndrome de Sanfilippo mitjançant la col·locació d'aquests sistemes de derivació (Robertson, 1998).

D'altra banda, les auto-lesions i l'agressivitat reben tractament farmacològic amb benzodiazepines, antagonistes  $\beta$ -adrenèrgics, antipsicòtics o hormones sexuals com estrògens o progesterona (Kushner, 2005). Les alteracions en el patró del son es poden tractar amb l'administració de melatonina o benzodiazepines (Fraser, 2005). El tractament farmacològic amb antiepilèptics també s'aplica en aquells casos on els atacs epilèptics hi són presents.

Les infeccions recurrents d'oïda i de vies respiratòries es tracten amb antibiòtics, i els problemes auditius es poden millorar amb la utilització d'audiòfons. A nivell ossi, les

alteracions esquelètiques, tot i presentar-se amb menys severitat, poden requerir de fisioteràpia i controls radiogràfics periòdics. La cirurgia correctiva també és un tractament utilitzat en aquells casos més greus. Els problemes de disfàgia s'han de tractar amb la utilització de sondes nasogàstriques (Pineda, 2013).

#### **4.8. Models animals de la MPSIIIB**

Per a l'estudi de les bases genètiques i metabòliques d'una determinada malaltia, i per l'assaig de possibles teràpies extrapolables a la clínica humana, es fa necessari l'ús de models animals.

##### **4.8.1. Model animal murí**

El model animal més àmpliament utilitzat per a l'estudi de la MPSIIIB ha estat el model murí de la malaltia (Li, 1999); es tracta d'un ratolí *Knock-out* (KO) que presenta una disrupció de l'exó 6 del gen *Naglu*, on es localitzen gran part de les mutacions causants de la MPSIIIB en humans (Schmidtchen, 1998). El ratolí MPSIIIB ha estat utilitzat per a l'estudi de diverses aproximacions terapèutiques per a la MPSIIIB, ja que la disrupció introduïda a l'exó 6 fa que presenti una patologia molt semblant a la descrita en humans (Li, 1999; Ohmi, 2003; Villani, 2007; DiRosario, 2009).

El ratolí MPSIIIB acumula HS en molts teixits, incloent fetge, ronyó, melsa, pulmons i cervell (Li, 1999; Fu, 2007; McCarty, 2011; Fu, 2011), i la patologia causada per aquesta acumulació ja és fàcilment detectable en animals de menys d'un mes d'edat (DiRosario, 2009; Villani, 2009). El cervell del ratolí MPSIIIB es caracteritza per una accentuada neuroinflamació, descrita ja en animals joves (Ohmi, 2003; DiRosario, 2009), amb activació de cèl·lules de la micròglia i d'astròcits reactius amb capacitat reduïda per reaccionar a lesions posteriors (Li, 2002). L'augment progressiu en el temps d'aquests astròcits reactius suggereix que l'acumulació crònica de HS pot ser la responsable del procés d'activació i/o proliferació astrocitària. Aquests descobriments concorden amb les observacions fetes en autòpsies de pacients de MPSIIIB, en les quals també s'hi ha observat astròcits reactius (Tamagawa, 1985; Kurihara, 1996). A banda de la patologia del SNC, el ratolí MPSIIIB presenta afectació del Sistema Nerviós Perifèric (SNP) acompanyat d'una pèrdua sensorial progressiva, la qual cosa posa de manifest l'afectació total del sistema nerviós (Fu, 2012).

Hi ha evidències que el sistema immunitari innat pot ser activat pels oligosacàrids derivats del HS a través de la via de senyalització dels receptors TLR4 (*Toll-Like Receptor 4*) (Ausseil, 2008). Els TLRs són receptors activats per una gran varietat de Patrons Moleculars Associats a Patògens (PAMPs: *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), però també per lligands endògens implicats en dany tissular, com per exemple productes de la matriu extracel·lular (Carpentier, 2008). L'activació del les cèl·lules de la micròglia per part dels TLR4 inicia una cascada de senyalització que alhora porta a la producció de citoquines pro-inflamatòries, com TNF $\alpha$  o IL1 $\beta$ , les quals són tòxiques per les neurones (Ausseil, 2008). En conseqüència, el cervell del ratolí MPSIIIB i el dels pacients de MPSIIIB presenten un increment en cèl·lules de la micròglia activades (Ohmi, 2003; Tamagawa, 1985).

D'altra banda, l'estrès oxidatiu ha estat també avaluat al ratolí MPSIIIB, mesurant la producció de l'ió superòxid en diferents parts del cervell i del cerebel, i avaluant-ne el seu efecte sobre diferents macromolècules de teixits afectats. Els estudis van revelar que l'estrès oxidatiu es trobava ja present a una edat primerenca, produint oxidació proteica, peroxidació lipídica i oxidació del DNA al SNC (Villani, 2009). En aquest mateix estudi es van identificar gens amb expressió alterada i conseqüentment amb una possible associació amb la neuropatologia del ratolí. Entre els gens amb expressió alterada es van identificar gens sobreexpressats per cèl·lules T NK/citotòxiques, suggerint la implicació d'aquest tipus cel·lular en la patologia neuronal del ratolí MPSIIIB (Villani, 2009).

A banda del HS, les neurones dels pacients de Sanfilippo B també acumulen els gangliòsids GM2 i GM3, i en alguns casos, colesterol no esterificat. Aquesta acumulació secundària també juga un paper important en la patologia neurològica, ja que l'acumulació intraneuronal de GM2 ha estat associada amb la dendritogènesi ectòpica (Walkley, 1998) i amb la incapacitat per mantenir l'homeòstasi del calci degut a una disminució en la seva recaptació cap al reticle endoplasmàtic (Pelled, 2003). A més a més, el segrest lisosòmic de colesterol és sabut que interfereix amb la correcta funció endosoma-lisosoma (Walkley i Vanier, 2009), que alhora és una funció important per a la correcta funcionalitat neuronal. Aquestes acumulacions secundàries són probablement causades per la inhibició induïda pels GAGs de les hidrolases lisosòmiques, ja que els GAGs poden unir-se selectivament a diferents hidrolases reduint-ne així la seva activitat (Avila i Convit, 1975). No només l'acumulació de GAGs sinó també altres mecanismes, com per exemple alteracions de la síntesi i/o en el

tràfic intracel·lular de gangliòsids, poden estar implicats en aquesta acumulació secundària de GM2 i GM3 a les neurones (McGlynn, 2004).

En ratolins MPSIIIB joves s'ha observat, també com en humans, un comportament hiperactiu amb alteracions del ritme circadiari (Cressant, 2004). A mesura que avança la malaltia, la hiperactivitat es manté (Langford-Smith, 2011) i les alteracions del ritme circadiari s'accentuen, principalment degut a alteracions del Nucli Supraquiasmàtic, encarregat de regular els ritmes circadials mitjançant l'estimulació de la secreció de melatonina (Heldermon, 2007; Canal, 2010). En animals adults, s'observen altres alteracions somàtiques també observades en humans, com problemes d'audició i de visió deguts a alteracions de l'oïda o de la retina, respectivament (Heldermon, 2007).

Les alteracions motores solen aparèixer també en ratolins MPSIIIB de major edat (Heldermon, 2007; Fu, 2011), coincidint amb una disminució del nombre de cèl·lules de Purkinje del cerebel (Heldermon, 2007) i amb la neurodegeneració que també afecta al sistema nerviós perifèric (Fu, 2012).

Per tant, la patologia del model murí de la MPSIIIB presenta una sèrie de característiques tant bioquímiques com patofisiològiques que la fan molt similar a la patologia humana, fent-ne d'aquest un bon model per a l'estudi de la patologia així com també per a l'assaig de teràpies.

#### **4.8.2. Model animal caní**

La MPSIIIB també es dona de manera natural en altres animals, fet que permet disposar d'aquests com a possibles models de la malaltia en espècies animals grans. Fins a data d'avui, s'ha descrit la MPSIIIB d'aparició espontània en gos (Ellinwood, 2003) i en emú (Aronovich, 2001).

En el cas de l'espècie canina, la MPSIIIB és també d'herència autosòmica recessiva i es va descriure en gossos de la raça *Schipperke*. La manca quasi total d'activitat NAGLU al fetge, melsa i ronyó (entre un 2,8% i un 6,6% respecte a l'activitat en gossos sans) i nivells anormalment elevats de GAGs, van ser determinants per a diagnosticar els gossos (Ellinwood, 2003). La determinació d'activitat enzimàtica d'altres enzims lisosòmics implicats en la degradació del HS es trobava anormalment elevada. Aquesta elevació secundària de l'activitat enzimàtica ha estat també descrita en el ratolí MPSIIIB, fet atribuïble a un augment en el nombre i la mida dels lisosomes i/o a un augment en la biosíntesi d'aquests enzims en resposta a l'acumulació del HS

(Li, 1999). Com en el model murí, el gos MPSIIIB també presenta acumulació secundària dels gangliòsids GM1 i GM2 (Ellinwood, 2011).

Estudis *post mortem* dels animals van permetre determinar que les lesions del SNC observades en el gos MPSIIIB eren similars a les descrites en pacients humans, com per exemple la presència d'inclusions citoplasmàtiques en neurones i cèl·lules de la micròglia, i una quasi completa pèrdua de cèl·lules de Purkinje. L'afectació cerebel·losa, tot i estar poc documentada en pacients humans, presenta un ampli rang d'afectació, des d'una marcada disminució en el nombre de cèl·lules de Purkinje (Wallace, 1966), fins a un cas d'un pacient que a l'inici de l'edat adulta no presentava evidències clares de lesions cerebel·loses (Hadfield, 1980).

Degut doncs a la seva similitud amb la malaltia humana, el gos MPSIIIB pot esdevenir també un bon model animal no murí per a l'estudi de la patologia així com també per a l'assaig de teràpies (Ellinwood, 2011).

#### **4.8.3. Model animal aviari**

La MPSIIIB també afecta de manera natural i es presenta com una malaltia d'herència autosòmica recessiva en emús (*Dromaius novaehollandiae*). Similar a la patologia humana, murina i canina, la MPSIIIB en emús es presenta amb una neurodegeneració progressiva caracteritzada per atàxia, tremolors, inapetència i letargia. Les inclusions citoplasmàtiques al cervell, fetge i altres teixits també en són característiques, així com també alts nivells de GAGs al cervell i teixits perifèrics, heparan sulfatúria i una activitat NAGLU residual mitjana del 6%, respecte dels animals sans (Aronovich, 2001; Palmieri, 2014). De tota manera, degut a les diferències tant fisiològiques com anatòmiques pel fet de no tractar-se d'un mamífer així com també per l'existència d'un model animal més accessible com el gos, l'emú no es presenta com un model animal d'elecció per a l'estudi de la malaltia.

### **4.9. Teràpies en desenvolupament**

#### **4.9.1. Transplantament de cèl·lules mare hematopoètiques**

El transplantament de HSCs es basa en la capacitat que presenten les cèl·lules mieloides del donant de medul·la per migrar, creuar la BHE, entrar al parènquima

cerebral i diferenciar-se cap a cèl·lules de la micròglia amb capacitat de secreció de l'enzim lisosòmic deficitari i que aquest sigui recaptat per les neurones i cèl·lules veïnes.

El transplantament de HSCs ha demostrat ser efectiu en la reversió d'alteracions viscerals, esquelètiques i del SNC en diferents MPS, entre elles MPSI, MPS VI o MPSVII (Yamada, 1998; Peters i Steward, 2003). En canvi, aquesta teràpia no ha tingut èxit en la prevenció de la degeneració neuronal en pacients de MPSIII ni en concret, de la MPSIIIB (Vellodi, 1992; Hoogerbrugge, 1995; Güngör i Tunçbilek, 1995). Aquests transplantaments es van dur a terme en pacients amb la malaltia neurològica ja establerta, per la qual cosa la interpretació dels resultats resulta difícil, ja que en altres MPS s'ha demostrat que els nivells més elevats d'eficàcia terapèutica s'obtenen quan el transplantament es realitza just abans o a l'inici de l'aparició de la patologia neurològica. El transplantament de HSCs en un pacient de MPSIIIA en fase inicial de la malaltia no va demostrar millora en la preservació de la funció cognitiva en comparació amb un germà malalt no tractat (Sivakumur i Wraith, 1999). Estudis posteriors realitzats en el ratolí model de la MPSIIIA suggereixen que el nombre total de cèl·lules de la micròglia procedents de les HSCs del donant localitzades al cervell representen un molt baix percentatge, raó per la qual, l'enzim produït per aquestes no és suficient com per a revertir la malaltia (Lau, 2013). És per aquestes raons que el transplantament de HSCs s'ha deixat de considerar com una opció terapèutica en pacients humans de MPSIII.

#### **4.9.2. Transplantament de cèl·lules de cordó umbilical**

Les cèl·lules humanes hematopoètiques de cordó umbilical (hUCB: *human Umbilical Cord Blood*), a diferència de les HSCs, tenen la capacitat de diferenciar-se en cèl·lules no-hemàtiques com per exemple neurones. El transplantament de hUCB directament al LCR o l'administració endovenosa en ratolins MPSIIIB, han mostrat una distribució de les hUCB tant al cervell com en varis teixits perifèrics, així com també una millora en la cognició i una reducció de GAGs en teixits somàtics (Garbuzova-Davis, 2005 i 2009; Willing, 2013). El transplantament de hUCB en pacients de MPSIIIA i MPSIIIB s'ha realitzat tot i que els resultats obtinguts són molt similars als observats amb el transplantament de HSCs, sense indicis clars sobre la protecció de la neurodegeneració (Prasad i Kurtzberg, 2010; de Ruijter, 2011).

De tota manera, actualment s'estan duent a terme assajos clínics basats tant en el transplantament de HSCs com en la transfusió de hUCB en pacients amb malalties metabòliques hereditàries, en els quals, una de les malalties incloses en els assajos és la Síndrome de Sanfilippo (NCT00383448, NCT00654433, [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

#### **4.9.3. Teràpies de reemplaçament enzimàtic (ERT)**

##### **4.9.3.1. ERT intravenosa**

Actualment, la ERT intravenosa és la teràpia més eficient pel tractament de la patologia somàtica de moltes LSDs, tot i que la principal limitació és la d'assolir quantitats d'enzim suficientment elevades al SNC com per dur-hi a terme un efecte terapèutic. La BHE és doncs, un dels principals obstacles per aquest tipus de teràpia. Per superar-lo, s'han dissenyat diferents estratègies terapèutiques basades en fusionar l'enzim deficitari amb una altra proteïna que pugui ser reconeguda per receptors presents a l'endoteli vascular cerebral. Així es pot superar la limitació de la BHE i passar de la circulació sanguínia al SNC per un mecanisme de transport mediat per receptor (de Ruijter, 2011).

Fins a data d'avui, però, no hi ha cap teràpia aprovada per a la MPSIIIB basada en l'administració de NAGLU humana recombinant. Estudis en el model murí de la MPSIIIB han demostrat que la ERT amb NAGLU humana recombinant únicament ha funcionat en determinats llinatges cel·lulars (Yu, 2000). Aquest fet és en part degut a què la NAGLU recombinant sintetitzada no es fosforila correctament en els residus de manosa, i per tant, no pot ser correctament internalitzada via el receptor de la M6P (Zhao, 2000; Weber, 2001). Tot i així, l'empresa farmacèutica *Synageva BioPharma* està actualment desenvolupant assajos preclínics en el ratolí MPSIIIB amb NAGLU recombinant (producte farmacèutic SBC-130, [www.synageva.com](http://www.synageva.com)) administrada per via intravenosa, demostrant disminució del contingut de GAGs a nivell neurològic i somàtic.

##### **4.9.3.2. ERT intratecal**

L'alternativa terapèutica per tal de superar l'obstacle que suposa la BHE en la ERT consisteix en l'administració directa de l'enzim recombinant al parènquima cerebral o al LCR, que ha demostrat eficàcia terapèutica al SNC del model animal murí



de la MPSIIIA (Savas, 2004; Hemsley, 2009). Actualment, també hi ha diversos assajos clínics en pacients pediàtrics basats en la injecció intratecal dels enzims recombinants deficitaris en diverses MPS (NCT01155778 i NCT01299727; [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

A més, també s'està desenvolupant un programa basat en la ERT intratecal per al tractament de la patologia neurològica en pacients de MPSIIIB. El programa dut a terme per la farmacèutica *Shire* es troba encara en fase preclínica. Aquest assaig es basa en la propietat del receptor de la M6P, que a banda d'unir residus de M6P, també uneix de manera eficient el factor de creixement similar a la insulina de tipus 2 (IGF2). Per aquesta raó, una opció terapèutica per tal d'augmentar la captació de la NAGLU recombinant és la de sintetitzar una proteïna de fusió entre la NAGLU i IGF2 (número de patent: US20110318327 A1). Estudis recents mostren l'eficàcia *in vivo* d'aquesta proteïna de fusió quan és administrada directament al LCR per via intracerebroventricular en el ratolí MPSIIIB. El tractament ha permès la normalització dels nivells de HS i d'altres productes d'acumulació secundària al cervell (Kan, 2014). Per tant, l'estratègia d'administrar una proteïna de fusió entre la NAGLU i IGF2 podria suposar una millora en la internalització de la proteïna recombinant.

#### 4.9.3.3. ERT intranassal

La ruta d'administració intranassal d'enzims lisosòmics és una teràpia emergent no invasiva per a l'administració d'aquests directament des de la mucosa nasal fins al cervell i la medul·la espinal, amb l'objectiu de tractar principalment la patologia del SNC evitant la BHE (Dhuria, 2010).

Mentre que els mecanismes exactes pels quals un compost arriba al SNC després de ser administrat intranassal encara no són totalment coneguts, varis estudis demostren que altres compostos com drogues, cèl·lules, vectors virals o pèptids són distribuïts eficientment al SNC (Wolf, 2012). Hi ha indicis que els productes administrats per via intranassal accedeixen al SNC a través de la circulació sanguínia aprofitant els capil·lars presents a la mucosa nasal, i també a través de les terminacions nervioses presents en l'epiteli nasal, les quals connecten directament amb el bulb olfactori i amb l'espina dorsal (Dhuria, 2010).

En el cas concret de les MPS, la teràpia intranassal ha demostrat certa eficàcia en el model murí de la MPSI. Pocs minuts després de l'administració de l'enzim lisosòmic

$\alpha$ -Iduronidasa (IDUA), deficitari en aquesta patologia, la seva activitat es va veure augmentada al cervell. En el mateix estudi, l'administració intranassal d'un vector viral adenoassociat de serotip 8 codificant per l'enzim IDUA va donar lloc a l'augment d'activitat enzimàtica al cervell (Wolf, 2012). Aquesta aproximació podria ser extrapolada a la d'altres MPS, i suposar un possible tractament no invasiu per a la patologia del SNC, tot i que més estudis són necessaris.

#### **4.9.4. Teràpies de reducció de substrat**

En el context de la MPSIIIB, les teràpies de reducció o de privació de substrat són aquelles que tenen com a finalitat reduir la síntesi de HS disminuint-ne així la seva acumulació lisosòmica.

##### **4.9.4.1. Genisteïna**

La Genisteïna (*4',5,7-trihydroxyisoflavone*), un fitoestrogen pertanyent a la família de les isoflavones i present a la soja i als seus derivats alimentaris, es va veure que actuava inhibint la síntesi de HS, en fibroblasts en cultiu de pacients de MPSIIIB (Piotrowska, 2006). Posteriorment es va comprovar que aquesta inhibició era duta a terme a través de la via de senyalització depenent del Factor de Creixement Epidèrmic (EGF; *Epidermal Growth Factor*), via alhora implicada en la regulació de l'expressió de gens que participen en la biosíntesi de GAGs (Jakóbkiewicz-Banecka, 2009). Com la genisteïna, altres isoflavones presents en diferents aliments derivats de la soja també tenen un efecte d'inhibició de síntesi de GAGs, i totes elles d'una forma dosi-depenent (Piotrowska, 2010).

L'administració oral de genisteïna (subministrada amb la dieta) també ha mostrat la seva eficàcia en el ratolí MPSIIIB, disminuint el contingut lisosòmic en teixits perifèrics i al SNC, reduint la neuroinflamació, disminuint l'acumulació intracel·lular de metabòlits secundaris i millorant també el comportament patològic respecte dels ratolins MPSIIIB no tractats (Malinowska, 2009 i 2010). El fet d'observar reducció en la patologia del SNC és indicatiu que la genisteïna, degut al seu baix pes molecular, pot creuar la BHE (Tsai, 2005; Kloska, 2012).

Actualment, s'estan duent a terme diferents assajos clínics basats en l'administració oral de genisteïna a diferents dosis en pacients de MPSIIIB i d'altres

MPS. En aquests assajos es valoren els efectes de diferents dosis de genisteïna sobre els nivells de GAGs, avaluats principalment per la seva excreció urinària, i sobre el comportament i la funció cognitiva. Estudis realitzats en pacients polonesos mostren com el tractament amb genisteïna dóna lloc a una reducció i fins i tot a una lleugera disminució en l'excreció urinària de GAGs així com també una millora de la funció cognitiva (Piotrowska, 2008 i 2011). En canvi, altres estudis mostren poca millora en l'excreció urinària de GAGs sense efectes cognitius, la qual cosa suggereix la necessitat d'administrar dosis més elevades de genisteïna per tal d'observar una millora significativa (Delgado, 2011; de Ruijter, 2012). Estudis més recents utilitzant dosis encara més elevades de genisteïna mostren que aquestes són segures, sense aparició d'efectes secundaris greus (Kim, 2013).

Els resultats extrets d'aquests assajos clínics juntament amb la accessibilitat i disponibilitat del tractament (la majoria poden esdevenir productes nutricionals enriquits amb genisteïna i d'altres isoflavones), ha resultat en un augment de la utilització de la genisteïna per a la millora simptomàtica de pacients amb MPSIII en diferents països, tot i que amb limitada eficàcia terapèutica.

#### 4.9.4.2. Rodamina B

La Rodamina B, un colorant utilitzat en cosmètica i com a traçador de líquids, també ha demostrat una eficàcia similar a la de la genisteïna en reduir l'acumulació patològica de GAGs en estudis preclínic. Tot i no haver estat provada en pacients ni en ratolins afectats de MPSIIIB, la Rodamina B administrada per via intravenosa en el ratolí MPSIIIA sí que ha donat lloc a una reducció significativa en l'acumulació de GAGs i a una millora en les alteracions del comportament d'aquest model animal (Roberts, 2007). La Rodamina B actua suprimint la síntesi de GAGs inhibint la formació dels precursors glucídics i/o l'activitat de les glicosiltransferases, implicades en la síntesi de GAGs. Tot i mostrar certa eficàcia terapèutica en el tractament de la MPSIIIA en estudis preclínic, sembla que el seu perfil de toxicitat en humans no la faria acceptable de cara a la seva aplicació a la clínica humana (Giugliani, 2012).

#### 4.9.4.3. Miglustat

El Miglustat (*N-butyl-deoxyojirimycin*), un aminosucre aprovat per al tractament simptomàtic de les malalties de Gaucher tipus I i de Niemann-Pick tipus C, actua

limitant la síntesi dels glicosfingolípids per mitjà de la inhibició de l'enzim glucosilceramida sintasa. En aquestes malalties, el Miglustat ha demostrat certa eficàcia en l'estabilització de la patologia neurològica, tot i que amb limitats beneficis terapèutics (Pineda, 2009 i 2010).

Com la genisteïna, el Miglustat també és capaç de travessar la BHE disminuint els nivells cerebrals de gangliòsids en models animals de gangliosidosis (Platt, 1997). Per aquesta raó es va postular que el Miglustat podria utilitzar-se també com a tractament simptomàtic per a pacients amb la Síndrome de Sanfilippo amb acumulació secundària de gangliòsids GM2 i GM3. En un estudi clínic, l'administració oral de Miglustat en pacients de MPSIIIB, no va mostrar cap eficàcia ni en el comportament ni en la reducció dels nivells de GM2 en cap dels pacients tractats després de 6 mesos de tractament (Guffon, 2011). Per tant, i a l'espera d'un seguiment a més llarg termini d'aquests pacients, el Miglustat no es presenta com una alternativa a curt termini per al tractament simptomàtic de la MPSIIIB.

#### **4.9.5. Teràpies d'augment d'activitat enzimàtica**

Les teràpies d'augment de l'activitat enzimàtica (*Enzyme Enhancement Therapies*) ofereixen la possibilitat de noves estratègies terapèutiques destinades a augmentar l'activitat residual d'enzims lisosòmics mutats. Aquestes teràpies es basen en la utilització de "xaperones farmacològiques" amb la finalitat de reconèixer enzims amb plegament defectuós i afavorir-ne el correcte plegament, permetent d'aquesta manera que recuperin la seva estructura 3D i conseqüentment, la seva activitat enzimàtica. D'aquesta manera, s'incrementa l'activitat residual de l'enzim podent així assolir el llindar terapèutic d'activitat enzimàtica necessària per tal de disminuir el contingut lisosòmic en la majoria de LSDs (Schueler, 2004). A més, les xaperones són molècules petites també amb la capacitat de creuar la BHE, i per tant, de superar la principal limitació de la ERT intravenosa.

Per a la MPSIIIB s'han estudiat diferents molècules que a elevades concentracions tenen un efecte inhibitori sobre l'enzim NAGLU, però que a concentracions baixes actuen com a xaperones, augmentant l'activitat enzimàtica (Ficko-Blean, 2008). De totes maneres, no hi ha encara cap assaig clínic ni tractament aprovat per a la MPSIIIB basat en xaperones.

#### 4.9.6. Teràpies basades en l'augment de l'excreció lisosòmica

L'autofàgia és un procés de degradació lisosòmica de components propis de la cèl·lula. Per tant, es tracta d'un procés estretament lligat amb el sistema de digestió lisosòmica (Figura 1) i que alhora suposa un important mecanisme per a la supervivència cel·lular en circumstàncies de privació de nutrients (Settembre, 2013).

En moltes LSDs s'ha vist que el procés autofàgic també es troba alterat com a conseqüència de la disrupció de l'homeòstasi lisosòmica, la qual cosa comporta l'acumulació citoplasmàtica d'autofagosomes. En les LSDs, els autofagosomes no s'uneixen als lisosomes i, per tant, el seu contingut en proteïnes pròpies i/o en orgànuls cel·lulars no és degradat i també s'acumula a l'interior de la cèl·lula (Settembre, 2008). Aquest fet dóna lloc a dany i estrès cel·lular que alhora comporten l'inici d'una resposta inflamatòria i finalment, la mort cel·lular (Lieberman, 2012). Les neurones són particularment vulnerables a les alteracions del procés autofàgic, raó per la qual en malalties neurodegeneratives s'observa un elevat grau de mort neuronal relacionada amb alteracions de l'autofàgia (Nixon, 2013).

A nivell molecular, s'ha observat que el factor de transcripció EB (TFEB: *Transcription Factor EB*) és un regulador comú entre els processos de digestió lisosòmica i d'autofàgia, ja que regula l'expressió gènica de gens autofàgics i de gens codificants per proteïnes lisosòmiques (Sardiello, 2009; Settembre, 2011). A més, també s'ha vist que el TFEB augmenta el pool de lisosomes cap a les proximitats de la membrana plasmàtica cel·lular, promovent-ne la seva fusió i conseqüentment la inducció d'exocitosi i alliberament del seu contingut al medi extracel·lular (Medina, 2011). La sobreexpressió d'aquest factor de transcripció en fibroblasts derivats del model murí de la MPSIIIA ha permès observar una reversió en l'acumulació patològica de GAGs (Medina, 2011).

Recentment, s'ha observat que el compost 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD), un excipient aprovat per la FDA utilitzat com a potenciador de l'estabilitat i la biodisponibilitat de certs medicaments, actua a nivell cel·lular activant el TFEB. L'addició de HP $\beta$ CD en cultius cel·lulars derivats de pacients amb Lipofuscinosi neuronal ceroidea, un tipus de LSD, ha demostrat ser efectiva normalitzant l'acumulació lisosòmica per mitjà de l'activació de l'autofàgia (Song, 2014). Aquesta aproximació podria ser també extrapolada per al tractament de l'acumulació lisosòmica de la MPSIIIB.

## 5. TERÀPIA GÈNICA

Davant les limitacions que presenten els tractaments actuals per a la MPSIIIB, es fa necessari el desenvolupament de noves estratègies terapèutiques. Una de les alternatives que està prenent força en els últims anys en diferents estudis preclínic de LSDs és la Teràpia Gènica.

La teràpia gènica es basa en la utilització de seqüències de DNA específiques per al tractament de malalties o per a l'alleujament dels símptomes de les mateixes. En el cas de les LSDs i de la majoria de malalties monogèniques, la teràpia gènica es centra en administrar la còpia corregida del gen mutat amb la finalitat de recuperar la seva funció i de revertir el fenotip patològic observat als pacients afectats.

### 5.1. Classificació de la teràpia gènica

La teràpia gènica es divideix en dos grans grups en funció de la metodologia utilitzada: teràpia gènica *ex vivo* i teràpia gènica *in vivo*. La teràpia gènica *ex vivo* consisteix en obtenir cèl·lules de pacients o models animals d'una determinada malaltia, generalment HSCs, modificar-les genèticament *in vitro* utilitzant el vector més apropiat per a cada situació, i reinfondre-les al pacient o model animal en qüestió. La utilització de cèl·lules autòlogues o bé de donants amb alta compatibilitat HLA és essencial per tal d'evitar la resposta immunitària contra les cèl·lules trasplantades.

D'altra banda, la teràpia gènica *in vivo* consisteix en l'administració de la seqüència de DNA terapèutica directament al pacient o al model animal d'una determinada malaltia. Com que es tracta d'una administració directa, cal prèviament haver determinat la biodistribució així com també la farmacocinètica i la possible toxicitat del vector utilitzat per a l'administració del material genètic. En qualsevol cas, la teràpia gènica permet la manipulació del material genètic amb la finalitat de produir l'efecte desitjat en funció de les necessitats terapèutiques. Així, els vectors virals poden contenir material genètic que un cop a l'interior de la cèl·lula diana pugui donar lloc a l'expressió tant de gens funcionals amb la finalitat de suplir funcions defectives dins la pròpia cèl·lula, o de gens inhibidors amb la finalitat de silenciar o disminuir l'expressió de gens patològicament sobreexpressats.

En funció del vector utilitzat per l'administració del DNA, la teràpia gènica també es pot subdividir en *Viral* i *No viral*. Les estratègies de teràpia gènica no viral es basen en l'administració del DNA nu o bé per mitjà de diferents mètodes fisicoquímics –com

pot ser la seva encapsulació en liposomes o en polímers catiónics—, o l'electrotransferència de DNA. En qualsevol cas, són mètodes amb baixa especificitat d'alliberament del DNA als òrgans o teixits diana i d'expressió transitòria, per la qual cosa únicament han estat utilitzats en models animals i amb resultats variables, degut principalment a la transitorietat de l'expressió gènica assolida (Aronovich, 2009; Osborn, 2011; Baldo, 2012).

La teràpia gènica viral aprofita les propietats infectives dels vectors virals, derivats de virus salvatges, per a la introducció del material genètic a l'interior de les cèl·lules diana. A diferència dels vectors no virals, els vectors virals presenten especificitat d'unió a receptor (la qual cosa determina l'òrgan, teixit o cèl·lula diana), elevada eficiència de transducció i expressió gènica a llarg termini.

Concretament, l'expressió a llarg termini característica de la teràpia gènica viral així com també la possibilitat de la secreció del producte al torrent sanguini i la seva distribució a tot l'organisme permet que la teràpia gènica viral es postuli com la teràpia d'elecció per al desenvolupament d'un possible tractament no només per a les MPS, sinó que per gran part de les malalties hereditàries monogèniques. Actualment, la teràpia gènica viral s'està utilitzant per al desenvolupament de teràpies per a diferents patologies, tot i que fins a data d'avui únicament un producte de teràpia gènica ha estat aprovat per al tractament en la clínica humana. A l'Octubre del 2012, la Comissió Europea va autoritzar la comercialització del producte conegut com a *Glybera*<sup>®</sup>, basat en un vector viral adenoassociat de serotip 1 per al tractament de la Deficiència de la Lipoproteïna Lipasa (LPLD: *Lipoprotein Lipase Deficiency*) o Síndrome de Quilomicronèmia, una malaltia minoritària monogènica amb una incidència d'1 entre 1.000.000.

## 5.2. Vectors virals

Els virus han evolucionat especialitzant-se en introduir el seu material genètic a l'interior de les cèl·lules que infecten com a part del seu cicle reproductiu. El cicle vital dels virus es pot dividir en dues fases diferenciades en el temps: infecció i replicació. La primera comprèn tots els passos necessaris per a la introducció del material genètic a l'interior de les cèl·lules, i ve determinada i induïda per la unió específica a receptors de la superfície cel·lular. Un cop al citoplasma, el material genètic viral és transportat fins al nucli utilitzant els mecanismes de transport intracel·lulars, i un cop al nucli, el genoma viral aprofita la maquinària de replicació cel·lular per sintetitzar proteïnes virals

reguladores i iniciar la síntesi de nou DNA viral. La fase de replicació es caracteritza per l'expressió de gens estructurals amb la finalitat de sintetitzar les proteïnes de la càpsida necessàries per a la formació de noves partícules virals contenint el respectiu genoma.

Els vectors virals utilitzats en teràpia gènica són virus modificats de tal manera que únicament conserven les propietats infectives dels virus dels quals provenen. A diferència d'aquests, no es poden reproduir ni infectar noves cèl·lules, ja que se'ls ha eliminat el genoma viral i substituït pel *cassette* d'expressió pertinent. El procés que permet introduir informació genètica funcional continguda en els vectors virals a l'interior de les cèl·lules diana s'anomena transducció.

Els principals vectors virals utilitzats en aproximacions de teràpia gènica són els derivats de Retrovirus (entre ells els Lentivirus), Herpesvirus, Adenovirus i Virus Adenoassociats (Taula 4).

Els *vectors retrovirals* presenten una envolta lipídica i un genoma de RNA de cadena senzilla (ssRNA) que un cop al nucli de la cèl·lula hoste és retrotranscrit cap a DNA i posteriorment s'integra als cromosomes, donant lloc a l'expressió a llarg termini, però per contra, també a la possibilitat de produir mutacions insercionals. Un segon desavantatge recau en la seva capacitat per transduir únicament cèl·lules en divisió, fet que en limita el seu ús en determinats teixits (Taula 4).

Els *vectors lentivirals* són un subtipus de vectors retrovirals amb la capacitat de transduir també cèl·lules quiescents, propietat que els fa apropiats per al tractament de malalties que afecten al SNC. El principal avantatge tant dels retrovirus com dels lentivirus és la seva habilitat per incorporar el gen d'interès al genoma cel·lular de cèl·lules en divisió, la qual cosa assegura la seva transmissió a les cèl·lules de la seva progènie (Taula 4).

Els *vectors adenovirals* es caracteritzen per un genoma de dsDNA, però a diferència dels vectors derivats del HSV (*Herpes Simplex Virus*), presenten una capacitat menor d'encapsidació de DNA de 36kb. Tot i presentar un elevat tropisme neuronal, la seves aplicacions per al tractament del SNC són limitades degut a la seva alta toxicitat en aquesta part del sistema nerviós (Thomas, 2001; Lozier, 2002) (Taula 4).



Taula 4. Característiques dels principals vectors virals utilitzats en teràpia gènica

	Vectors derivats de Retrovirus	Vectors derivats del HSV	Vectors derivats d'Adenovirus	Vectors derivats de AAV
<b>Família</b>	<i>Retroviridae</i>	<i>Herpesviridae</i>	<i>Adenoviridae</i>	<i>Parvoviridae</i>
<b>Malaltia associada al virus salvatge</b>	Sí	Sí	Sí	No
<b>Capacitat d'encapsidació</b>	8 kb	150 kb	36 kb	4,7 kb ssAAV 2,2 kb scAAV
<b>Genoma</b>	ssRNA	dsDNA	dsDNA	ssDNA
<b>Inserció al DNA genòmic</b>	Sí	No	No	Inserció amb molt baixa eficiència
<b>Transducció de cèl·lules quiescents</b>	No (Sí els vectors Lentivirals)	Sí	Sí	Sí
<b>Immunitat innata</b>	Sí	Sí	Sí	Limitada
<b>Avantatges</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expressió estable en cèl·lules en divisió</li> <li>• Producció a títols elevats</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecten cèl·lules quiescents i en divisió</li> <li>• Es mantenen episomals</li> <li>• Elevada capacitat d'encapsidació</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecten cèl·lules quiescents i en divisió</li> <li>• Es mantenen episomals</li> <li>• Elevada capacitat d'encapsidació</li> <li>• Elevats nivells d'expressió del transgen in vivo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecten cèl·lules quiescents i en divisió</li> <li>• Es mantenen episomals</li> <li>• Producció a títols elevats</li> <li>• Baixa immunogenicitat</li> </ul>
<b>Inconvenients</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Integració a l'atzar en el genoma</li> <li>• Capacitat d'encapsidació limitada</li> <li>• Infecten només cèl·lules en divisió (excepte Lentivirus)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expressió transitòria</li> <li>• Neurotoxicitat poc caracteritzada</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aparició de resposta immunològica i inflamatòria</li> <li>• Impossibilitat per seleccionar el tropisme</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Capacitat d'encapsidació limitada</li> <li>• Expressió gènica limitada per la síntesi de la cadena de DNA complementària</li> </ul>

Adaptat de Nagabhushan Kalburgi, 2013.

Tot i la disponibilitat de gran varietat de vectors virals per al tractament de patologies que afecten al SNC, els vectors virals adenoassociats són els més àmpliament utilitzats per al tractament de patologies del SNC.

### 5.3. Vectors virals adenoassociats

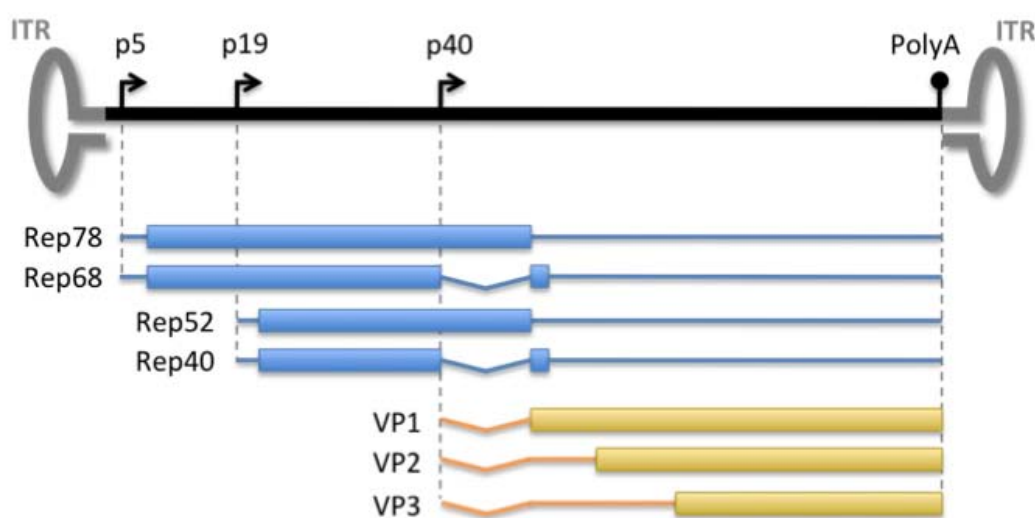
Els *vectors virals adenoassociats* deriven de virus humans de la família *Parvoviridae*, els anomenats *Virus Adenoassociats* (AAV: *Adeno-associated Virus*) que no provoquen cap patologia humana coneguda i que es van descobrir per primera vegada com a contaminants en preparacions d'Adenovirus (Atchinson, 1965; Hoggan, 1966). Els AAV també formen part del gènere *Dependoviridae*, que en general són virus poc immunogènics, no patogènics i no-autònoms, és a dir, que no es poden replicar per sí sols, sinó que necessiten de la coinfecció de virus accessoris (Adenovirus o Herpesvirus) per completar el seu cicle vital (Lentz, 2012). Aquestes característiques naturals dels AAV permeten que els vectors virals recombinants derivats d'aquests virus siguin segurs i presentin baixa probabilitat d'aparició d'efectes secundaris deguts a la seva administració en protocols de teràpia gènica.

#### 5.3.1. Biologia dels virus adenoassociats

Els AAV salvatges pertanyen al grup de virus sense envolta lipídica. Són partícules icosaèdriques de 20 nm de diàmetre amb càpsida proteica (Xie, 2002) i amb un genoma de DNA de cadena senzilla (ssDNA), d'aproximadament 4,8 kb, format per dos gens: el gen *rep*, codificant per proteïnes implicades en la replicació i el gen *cap*, que codifica per proteïnes estructurals. L'expressió gènica està controlada per tres promotors diferents que donen lloc a tres Marcs Oberts de Lectura (ORF: *Open Reading Frame*). Per mecanismes de *splicing* alternatiu d'aquests dos gens es generen les 7 proteïnes virals, 4 implicades en la replicació i estabilització del DNA (Rep78, Rep68, Rep52 i Rep40, derivades del gen *rep*) i 3 que formen la càpsida (VP1, VP2 i VP3, derivades del gen *cap*) (Figura 9). Són precisament les proteïnes de la càpsida proteica les que els confereixen la capacitat d'unió a receptor i per tant, en determinen el tropisme, el qual varia en funció del serotip (Taula 5). S'han descrit, identificat i caracteritzat multitud de serotips diferents de AAV humans (serotips 1, 2 i 5) i de primats (serotips 7, 8, 9, rh.10), entre d'altres (Gao, 2002; Gao, 2005). Degut a la variabilitat de tropisme, varis estudis es centren en la seva caracterització per a la

utilització d'aquests AAV com a vectors virals per al desenvolupament d'aproximacions de teràpia gènica per al tractament de malalties humanes.

El genoma viral dels AAV es troba flanquejat en 5' i 3' per seqüències terminals repetitives i invertides (ITR: *Inverted Terminal Repeats*) que contenen les funcions en *cis* necessàries per a la replicació, empaquetament i integració del genoma viral (Samulski, 1989; Srivastava, 1989). Les ITRs formen una estructura en forma de T donant lloc a un *loop* per complementaritat dins la pròpia seqüència (Nash, 2008) (Figura 9).



**Figura 9. Representació esquemàtica del genoma del AAV de serotip 2.** El genoma viral es troba flanquejat per dues seqüències ITR. Les fletxes indiquen la posició dels tres promotors p5, p19 i p40 codificants pels 3 ORFs. Tots els transcrits comparteixen la mateixa senyal de poliadenilació (PolyA). Adaptat de Daya, 2008.

La unió a receptor per part d'aquests virus és variable, i reflexa la gran variabilitat de seqüència que hi ha entre ells. L'àcid siàlic i el HS són els receptors més habituals per molts AAV (Taula 5), tot i que en alguns serotips, el receptor cel·lular roman encara desconegut. Aquest és el cas del serotip 9, un dels més utilitzats en teràpia gènica, del qual se n'ha descrit recentment el seu receptor (Shen, 2011; Taula 5). A banda dels receptors primaris, els AAV també interaccionen amb diversos coreceptors durant el seu procés d'internalització (Taula 5). Aquesta diversitat en la utilització de receptors i coreceptors és el que en determina les diferències de tropisme *in vivo* entre els diferents serotips.

Taula 5. Receptors, coreceptors i tropisme dels principals serotips de AAV

Serotip	Receptor	Co-receptors	Tropisme
AAV1	Àcid Siàlic	<i>Desconegut</i>	Múscul esquelètic, SNC, Retina, Pàncrees
AAV2	Heparan Sulfat	FGFR1, HGFR, LamR	Cèl·lules musculars vasculares, Múscul esquelètic, SNC, Fetge, Ronyó
AAV3	Heparan Sulfat	FGFR1, HGFR, LamR	Múscul esquelètic, Hepatocarcinoma
AAV4	Àcid Siàlic	<i>Desconegut</i>	SNC (ependimòcits), Retina
AAV5	Àcid Siàlic	PDGFR	Múscul esquelètic, SNC, Ependimòcits, Pulmó, Retina
AAV6	Àcid Siàlic	EGFR	Múscul esquelètic, Cor, Pulmó
AAV7	<i>Desconegut</i>	<i>Desconegut</i>	Múscul esquelètic, SNC, Retina
AAV8	<i>Desconegut</i>	LamR	Fetge, Múscul esquelètic, SNC, Retina, Pàncrees, Cor
AAV9	Galactosa N-unida	LamR	Fetge, Cor, Pulmó, SNC, Múscul esquelètic, Pàncrees, Ronyó

Adaptat de Lentz, 2012. FGFR1: Receptor del Factor de Creixement de Fibroblasts tipus 1; HGFR: Receptor del Factor de Creixement d'Hepatòcits; LamR: Receptor de Laminina; PDGFR: Receptor del Factor de Creixement derivat de Plaquetes; EGFR: Receptor del Factor de Creixement Epidèrmic.

El tràfic de les partícules víriques des del medi extracel·lular a l'interior del nucli no és totalment conegut, tot i que sembla que en alguns serotips pot estar mediat per endocitosi en vesícules amb revestiment de clatrina (Schultz i Chamberlain, 2008).

Un cop al nucli cel·lular, la síntesi de la cadena complementària de DNA viral, pas crític i limitant de la replicació viral, requereix tant de la maquinària enzimàtica cel·lular (Nash, 2008) com de l'expressió del gen viral *rep*, donant lloc a les diferents proteïnes Rep 78, 68, 52 i 40 (Im i Muzyczka, 1992). En absència d'un virus accessori, el genoma viral pot persistir de forma episomal formant monòmers o unint-se donant lloc a concatèmers circulars (Schnepp, 2005). A més, la integració del genoma viral, tot i donar-se en molt baixa freqüència, quan té lloc es dóna preferencialment en llocs específics del cromosoma 19 humà (McCarty, 2004), generalment en llocs transcripcionalment actius o amb presència de trencaments de doble cadena (Miller, 2002; Nakai, 2003).

### 5.3.2. Característiques dels vectors AAV

Els vectors virals derivats dels AAV es generen substituint el genoma viral codificant per les proteïnes *rep* i *cap* contingut entre les dues ITR, pel constructe de DNA d'elecció, sense superar el límit màxim d'encapsidació d'aquests vectors que és d'aproximadament 4,7 kb (Taula 4). Com a conseqüència, els vectors perden la capacitat d'expressió de proteïnes virals, minimitzant l'acció del sistema immunitari contra les cèl·lules transduïdes, tot i que s'han descrit respostes immunitàries desencadenades per vectors AAV en humans (Manno, 2006; Mingozzi, 2009). La majoria de vectors virals utilitzats en aproximacions de teràpia gènica estan basats en el genoma del AAV2, un dels serotips millor caracteritzats (Samulski, 1982; Srivastava, 1989).

Com en els AAV salvatges, les proteïnes de la càpsida confereixen l'especificitat d'unió a receptor dels AAV (Taula 5). D'aquesta manera, l'elevat tropisme neuronal d'alguns serotips juntament amb el fet que els AAV poden transduir cèl·lules quiescents, posiciona aquests vectors com a bons candidats per al tractament de patologies que afecten al SNC. A més, la seva taxa d'inserció al genoma cel·lular es veu disminuïda degut a l'absència dels gens virals Rep78 i Rep68 (McCarty, 2004), fet que disminueix la probabilitat que apareguin alteracions degudes a mutacions insercionals.

Un cop al nucli, la síntesi de la cadena complementària de ssDNA, la qual és el pas limitant en la transducció cel·lular, suposa també la principal limitació d'aquests vectors (Ferrari, 1996). Per tal de superar aquesta limitació, es van desenvolupar els anomenats *Self-complementary AAV* (scAAV) (McCarty, 2001). Aquests vectors consten d'una seqüència ITR mutada i centrada entre dues seqüències de DNA del transgèn, una d'elles invertida i complementària a l'altra. La complementarietat entre seqüències permet la formació de dsDNA dins les partícules virals, fet que es tradueix en una expressió més primerenca del transgèn respecte dels vectors AAV amb ssDNA. Per contra, el fet de disposar d'una cadena complementària de DNA limita la capacitat d'encapsidació a 2,2 kb.

Els vectors AAV poden ser elaborats i purificats a títols elevats al laboratori (Ayuso, 2010a). Generalment, la producció es realitza per un sistema de triple transfecció, amb la participació de tres plasmidis, de manera que tant els gens virals *rep* i *cap*, com els gens del virus accessori es proporcionen en *trans*. Un dels plasmidis conté el *cassette* d'expressió d'interès flanquejat per les seqüències ITR. Un segon

plasmidi accessori sense ITR codifica per les proteïnes virals *Rep* i *VP*. Ambdós plasmidis són co-transfectats en una línia cel·lular juntament amb un tercer plasmidi codificant per les proteïnes adenovirals necessàries per a la replicació dels vectors AAV. D'aquesta manera s'aconsegueix encapsidar únicament el material genètic contingut entre les ITRs evitant l'encapsidació dels gens virals (Lai, 2010; Wu, 2010). L'especificitat de serotip ve donada pel gen *cap*, codificant per les proteïnes VP, de manera que la combinació del gen *rep* del AAV2 amb el gen *cap* d'altres serotips, permet l'obtenció de partícules virals amb les ITR del AAV2 però amb la càpsida proteica pròpia d'altres serotips de AAV (Grimm, 2003; Rabinowitz, 2002).

La purificació final es duu a terme per mitjà de la lisi cel·lular i posterior centrifugació en gradients de clorur de cèssi (CsCl) o d'iodixanol (Ayuso, 2010b). En particular, el protocol de purificació desenvolupat al nostre laboratori basat en Polietilenglicol i un gradient de CsCl permet optimitzar la purificació dels vectors minimitzant la presència de càpsides buides (Ayuso, 2010b).

### **5.3.3. Teràpia gènica amb vectors AAV per malalties del SNC**

La teràpia gènica amb vectors AAV ofereix una alternativa atractiva per al tractament de malalties minoritàries d'origen genètic. Les estratègies de teràpia gènica basades en vectors AAV han mostrat resultats prometedors, d'una banda com a eina per a la transferència gènica *in vivo* i d'altra banda mostrant expressió a llarg termini en models animals (Rivera, 2005; Niemeyer, 2009; Nathawani, 2011a) així com també en pacients humans de malalties genètiques després d'una única administració (Bainbridge, 2008; Maguire, 2008; Buchlis, 2012). A més, degut a la seva baixa immunogenicitat (Bessis, 2004; Mingozzi i High, 2013), al fet que permeten expressió a llarg termini i a la seva capacitat per transduir diferents tipus cel·lulars presents al cervell (Wang, 2003; Burger, 2004; Lawlor, 2009), els AAV es postulen com els vectors d'elecció per al tractament de malalties genètiques amb afecció del SNC.

Diverses aproximacions de teràpia gènica basades en l'administració de vectors AAV tant al SNC per injecció directa al parènquima cerebral (Fraldi, 2007; Ciron, 2009; Ellinwood, 2011) com per administració directa al LCR (Passini, 2003; Fu, 2010; Haurigot, 2013) han demostrat ser efectives en la transducció de diferents tipus cel·lulars del SNC en models animals, especialment els serotip 9 i rh.10 (Sondhi, 2007; Piguet, 2012; Swain, 2014). A més a més, recentment s'han publicat els primers resultats d'un assaig clínic basat en l'administració directa al parènquima cerebral de

vectors AAV en pacients afectats de MPSIIIA (Tardieu, 2014; NCT01474343, clinicaltrials.gov). A 4 pacients d'entre 3 i 7 anys d'edat se'ls ha administrat un vector AAV de serotip rh.10 codificant per la Sulfamidasa humana (proteïna deficitària en aquests pacients) juntament amb el factor SUMF1 (*Sulfatase Modifying Factor 1*), a través de 6 punts d'injecció repartits bilateralment en ambdós hemisferis cerebrals, en els quals s'hi fan 2 administracions per punt a diferents profunditats. Els resultats preliminars obtinguts després d'un any de seguiment mostren la tolerabilitat de l'administració viral, i l'absència d'efectes secundaris (Tardieu, 2014). D'altra banda i degut a l'absència de marcadors validats, no és possible l'observació de millores substancials en l'eficàcia del tractament, i fins i tot en dos dels pacients s'augmenta l'atròfia cerebral, suggerint una eficàcia limitada d'aquest tipus de tractament intraparenquima (Tardieu, 2014). Aquest fet podria atribuir-se a la limitada difusió del vector viral a partir dels punts d'injecció.

D'entre tots els serotips de AAV descrits i caracteritzats, el serotip 9 (AAV9) (Gao, 2004) mostra un ampli tropisme (Inagaki, 2006; Cearley i Wolfe, 2006; Klein, 2008; Zincarelli, 2008). Respecte dels serotips clàssics (1 a 8), el serotip 9 presenta variacions en les proteïnes de la càpsida que li confereixen la capacitat de travessar la BHE quan és administrat per via sistèmica, permetent la seva entrada al SNC. En aquest sentit, l'administració intravenosa de vectors virals derivats del AAV9 ha demostrat ser efectiva en la transducció de neurones i cèl·lules glials al SNC (Foust, 2009; Duque, 2009; Gray, 2011) i també en la correcció de les alteracions neurològiques presents en models murins de la MPSIIIA (Ruzo, 2012a i 2012b) i MPSIIIB (Fu, 2011). De tota manera, el mecanisme exacte pel qual els AAV9 passen la BHE encara és desconegut. D'altra banda, l'administració directa de vectors virals derivats del AAV9 directament al LCR també ha demostrat la seva capacitat de transducció de diferents tipus cel·lulars del SNC en el model murí de la MPSIIIA (Haurigot, 2013). A més, una part d'aquest vector és capaç de passar a circulació sistèmica i transduir òrgans perifèrics com el fetge o el cor, fent possible la producció i secreció de la proteïna no només al SNC, sinó que també per part d'altres òrgans perifèrics.

En resum, els vectors virals derivats dels AAV, són els vectors d'elecció per a la majoria d'aproximacions de teràpia gènica basades en l'administració de proteïnes terapèutiques, especialment al SNC, ja que donen lloc a una expressió gènica eficient, a llarg termini, amb baixa immunogenicitat i mínima patogenicitat. A més, els títols necessaris per a possibles futures aplicacions a la clínica humana els fa escalables.

## 6. ESTAT ACTUAL DE LA TERÀPIA GÈNICA PER A LA MPSIIIB

S'han dut a terme diferents aproximacions de teràpia gènica amb vectors virals en els models animals murí i caní de la MPSIIIB, essent el primer el més àmpliament utilitzat.

### 6.1. Teràpia gènica amb vectors lentivirals

El ratolí MPSIIIB ha estat utilitzat per a l'estudi de diferents aproximacions de teràpia gènica basades en l'administració de vectors virals codificants per la NAGLU a través de diferents vies. D'una banda, els vectors lentivirals han estat utilitzats per a estratègies de teràpia gènica *ex vivo*. La transducció de HSCs de medul·la òssia de ratolins MPSIIIB amb vectors lentivirals codificants per la NAGLU humana i posterior reinfusió en ratolins malalts, ha demostrat ser efectiva en la correcció de les manifestacions patològiques del SNC. Aquesta, s'atribueix a la migració de les cèl·lules trasplantades des de la medul·la òssia fins al SNC (Zheng, 2004). De tota manera, la limitada eficàcia terapèutica obtinguda amb el transplantament de HSCs en pacients de MPSIIIB fa preveure que la teràpia gènica *ex vivo* utilitzant HSCs pot no resultar ser efectiva a l'hora de corregir la patologia del SNC en aquests pacients.

Altres estratègies s'han basat en l'administració directa de vectors lentivirals per via intravenosa (Di Natale, 2005). En aquest estudi, únicament s'han assolit valors d'activitat NAGLU hepàtica de l'1% respecte dels animals sans, tot i que suficients per corregir la malaltia en aquest òrgan i de reduir, però no de normalitzar, el contingut en GAGs d'altres òrgans com el pulmó o la melsa. No obstant, no s'observa correcció dels nivells de GAGs al SNC per la incapacitat d'aquests vectors per creuar la BHE. Posteriorment, el mateix grup va dur a terme l'administració intracranial d'aquests vectors lentivirals en ratolins MPSIIIB amb la finalitat d'avaluar-ne els seus efectes al SNC (Di Domenico, 2009). Tot i que en l'estudi no es fa referència als efectes sobre l'afectació somàtica, sí que es va observar una millora de la patologia del SNC que com a conseqüència també va donar lloc a una millora en el comportament dels animals tractats amb els vectors lentivirals. Tot i així, la correcció del contingut en GAGs únicament va ser parcial i restringida a determinades zones del cervell. Els autors atribueixen aquest fet a la poca difusió del vector respecte del punt d'injecció, la qual cosa va permetre una major correcció en zones adjacents i únicament una lleugera millora o fins i tot cap canvi en zones més allunyades (Di Domenico, 2009).



## 6.2. Teràpia gènica amb vectors AAV

Degut als resultats poc prometedors obtinguts amb la teràpia gènica basada en vectors lentivirals i aprofitant els avantatges que ofereixen altres vectors com els AAV (principalment la seva baixa immunogenicitat i l'expressió a llarg termini), aquests han estat els vectors d'elecció en altres estudis amb el model animal murí.

Un dels primers serotips utilitzats va ser el AAV2. Aquest vector, codificant per la NAGLU humana i administrat directament al parènquima cerebral de ratolins MPSIIIB, va mostrar tant un augment en l'activitat NAGLU de les zones adjacents al punt d'administració com una reducció en la distensió lisosòmica (Fu, 2002). Estudis posteriors del mateix grup s'han basat tant en l'administració intracisterna magna com intravenosa, o ambdues combinades, del AAV2 codificant per la NAGLU humana en ratolins MPSIIIB, però únicament han observat correcció/millora de la patologia del SNC, sense efectes o amb efectes mínims sobre la patologia somàtica (Fu, 2007; McCarty, 2009; Fu, 2010). Davant la incapacitat del AAV2 per superar la BHE quan és administrat sistèmicament, els ratolins prèviament havien de ser tractats amb un agent permeabilitzador per tal de permetre la disrupció transitòria de la BHE i afavorir l'entrada del vector al SNC.

D'altra banda, també s'han dut a terme aproximacions terapèutiques en el ratolí MPSIIIB basades en AAV5 codificants per l'enzim NAGLU humà. En aquest sentit, teràpies combinades amb vectors AAV5 injectats al parènquima cerebral juntament amb el transplantament de medul·la òssia de ratolins no afectats (Heldermon, 2010) o amb l'administració d'un vector lentiviral intravenós (Heldermon, 2013) han demostrat la seva eficàcia en corregir la patologia somàtica i del SNC. Tot i així, l'efecte sinèrgic de l'administració cerebral de AAV5 juntament amb el transplantament de medul·la o amb l'administració de vectors lentivirals, no resulta en una clara millora respecte del tractament amb el AAV5 únicament.

Altres aproximacions de teràpia gènica s'han basat en la comparació de l'eficiència de les administracions intraparenquimals entre AAV2 i AAV5 codificants per la NAGLU humana. En aquest cas, es va observar una major millora en la correcció de la patologia del SNC amb els vectors AAV5 respecte dels AAV2, indicant una millor eficiència de transducció per part dels vectors AAV5 (Cressant, 2004). En qualsevol cas, el tractament amb AAV5 va donar lloc a la correcció de la patologia del SNC i a una millora de la patologia somàtica i del comportament, suggerint que una única

injecció intracerebral no és suficient per corregir conjuntament la patologia somàtica i del SNC en el ratolí MPSIIIB (Cressant, 2004).

El model caní va ser també utilitzat per a la injecció intraparenquima cerebral del vector AAV5 codificant per la NAGLU humana. El tractament únicament va donar lloc a una reducció del contingut en GAGs al cervell, sense assolir els nivells normals. El fet de no observar-s'hi correcció es va atribuir al fet que únicament es van realitzar 4 dipòsits de la preparació viral en cada gos, per la qual cosa la difusió del vector va ser limitada, limitant també l'eficàcia terapèutica (Ellinwood, 2011).

L'única aproximació de teràpia gènica que ha arribat a estudis clínics per a la MPSIIIB, està basada en l'administració intraparenquima cerebral de la NAGLU humana codificada en un AAV5. Els primers resultats preliminars encara no s'han fet públics, però els detalls de l'assaig es poden consultar al registre ISRCTN (ISRCTN19853672, [www.controlled-trials.com/](http://www.controlled-trials.com/)). La diferència de mida entre el cervell humà i el cervell dels ratolins fa més difícil el fet de cobrir la totalitat del volum cerebral amb injeccions intraparenquimals. Per tant, l'administració de vectors AAV en pacients humans requereix de múltiples punts d'injecció associats a procediments quirúrgics complexos, la qual cosa esdevé tècnicament més difícil.

Recentment, el AAV9 també ha començat a ser considerat com un dels serotips d'elecció per al disseny d'estratègies de teràpia gènica per al tractament de malalties del SNC, principalment degut a la seva capacitat per creuar la BHE i al seu tropisme tant neuronal com per cèl·lules de la glia (Gray, 2011).

L'estudi de teràpia gènica més recent realitzat en el model murí de la MPSIIIB es basa en l'administració sistèmica d'un AAV9 codificant per la NAGLU humana. En aquest estudi, el primer basat en la utilització de vectors AAV9 per al tractament de la MPSIIIB, es va administrar el vector viral per via sistèmica. Aprofitant la propietat d'aquest serotip de travessar la BHE sense necessitat d'administrar un agent permeabilitzador, se'n va observar la seva expressió en tot el SNC així com també en òrgans i teixits perifèrics com el fetge, el cor o el múscul esquelètic. Aquest elevat grau de transducció anava acompanyat de la correcció de la patologia a nivell somàtic i del SNC, disminuint el contingut en GAGs, corregint els defectes de comportament i millorant la supervivència dels ratolins MPSIIIB tractats (Fu, 2011). De tota manera, l'eficàcia terapèutica es va aconseguir amb dosis molt elevades de vector ( $>1 \times 10^{13}$  vg/kg), la qual cosa podria representar un inconvenient de cara a la translació clínica d'una possible teràpia en humans, tant a nivell de costos de producció com de toxicitat

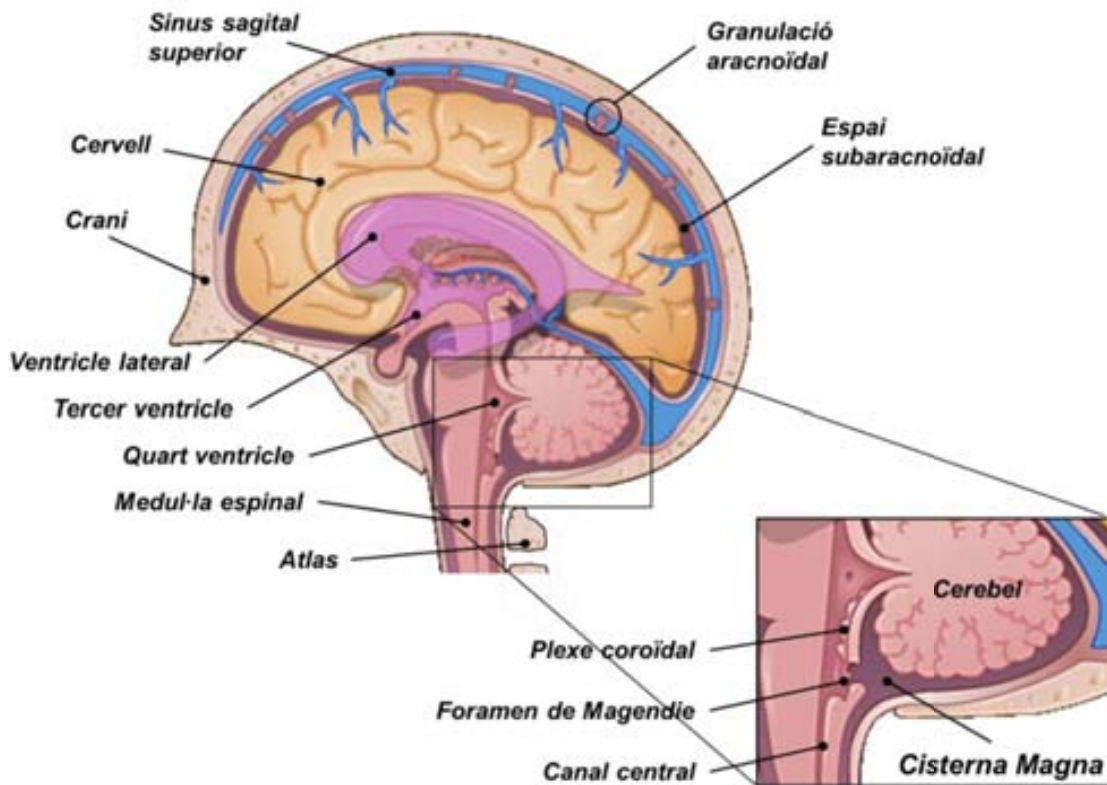
davant l'exposició sistèmica a dosis tan elevades. A més, el constructe d'expressió de la NAGLU humana es troba sota el control transcripcional del promotor CMV, el qual està àmpliament descrit que se silencia poc temps després de la transducció cel·lular (Löser, 1998; Gray, 2011).

El mateix grup ha demostrat la viabilitat i expressió a llarg termini de la proteïna NAGLU humana amb una única administració intravenosa del mateix vector viral AAV9 en primats sans (Murrey, 2014). Tot i la presència d'anticossos contra la proteïna humana i contra la càpsida del AAV9, no s'ha detectat resposta immunitària cel·lular ni cap alteració en el comportament animal, suggerint la viabilitat del tractament i la seva escalabilitat a la clínica humana amb pacients de MPSIIIB. De tota manera, el problema d'escalabilitat de dosi segueix essent un inconvenient inherent a l'administració intravenosa.

Tot i així, entre tots els vectors utilitzats en el model murí de la MPSIIIB, el AAV9 administrat en una sola injecció sistèmica és el que ha mostrat, fins a data d'avui, ser el més eficient en corregir la patologia.

### **6.3. Administració de vectors AAV9 al LCR per al tractament de MPS amb afectació del SNC**

El LCR, tant en l'espècie humana com en ratolins, circula lliurement pels ventricles cerebrals, pel canal central de la medul·la espinal i per l'espai subaracnoïdal (Figura 10). És produït per cadascun dels 4 ventricles, en els plexes coroïdals, una estructura formada per una monocapa de cèl·lules endotelials i pels corresponents vasos sanguinis i teixit connectiu. Així, el LCR format als ventricles laterals flueix cap al tercer i quart ventricle, des d'on es distribueix cap al canal central de la medul·la espinal i també cap a l'espai subaracnoïdal, al qual hi accedeix a través del Foramen de Magendie. Aquest foramen comunica directament amb la cisterna magna, una de les tres principals obertures de l'espai subaracnoïdal, situada entre el cerebel i la part dorsal de la medul·la oblonga. Un cop a l'espai subaracnoïdal, el LCR es distribueix per tot el SNC. Aquest fet el fa idoni per a una distribució més àmplia dels vectors virals al SNC quan són administrats al LCR, a diferència d'una administració directa al parènquima cerebral, on la difusió es veu limitada al voltant del punt d'administració.



**Figura 10. Representació esquemàtica del cervell humà i magnificació de la cisterna magna.**

El LCR es produeix a la monocapa de cèl·lules endimàries que recobreixen la part interna dels 4 ventricles cerebrals. Accedeix a l'espai subaracnoïdal a partir de dues obertures laterals del quart ventricle i a través del Foramen de Magendie. El LCR drena a circulació sanguínia, concretament al sinus sagital superior, a través de projeccions aracnoïdals cap al sinus venós, anomenades granulacions aracnoïdals. Adaptat de *Anatomy & Physiology REVEALED® 2.0, McGraw-Hill Higher Educational Product*.

A banda del ratolí MPSIIIB, el vector viral AAV9 també ha estat utilitzat en altres models murins de MPS. En el cas del model murí de la MPSIIIA, al nostre laboratori hem demostrat que una única administració del vector AAV9 codificant per la sulfamidasa murina directament al LCR a través de la cisterna magna va donar lloc a l'expressió del vector al SNC, SNP i al fetge, amb reversió de la patologia tant somàtica com del SNC. A més, també es va observar una correcció en el comportament així com una normalització en la supervivència dels ratolins MPSIIIA tractats amb el vector terapèutic (Haurigot, 2013). En el mateix estudi, el vector viral AAV9 codificant per la sulfamidasa canina va ser administrat intracisterna magna en gossos control, demostrant l'expressió a llarg termini de la proteïna canina al LCR tot i la presència d'elevats títols d'anticossos neutralitzants circulants contra AAV9. A diferència del tractament sistèmic amb AAV9, l'administració intracisterna magna permet reduir la dosi efectiva administrada permetent l'escalabilitat del tractament cap

a la clínica humana així com també a models animals més grans. Aquest estudi doncs, suggereix la viabilitat d'un possible tractament per a la MPSIIIA així com també per altres LSDs amb afectació del SNC per mitjà de l'administració del vector viral directament al LCR.

Per tant, degut al fet que el vector viral AAV9 presenta un ampli tropisme i transducció del SNC quan és administrat a la cisterna magna, així com també als resultats observats en el tractament intracisterna amb AAV9 per a la MPSIIIA i a la similitud entre la MPSIIIA i la MPSIIIB, fa que l'administració directa al LCR per via intracisterna del vector viral AAV9 codificant per la NAGLU es presenti com un dels tractaments d'elecció per a provar-ne la seva eficàcia en el tractament de la patologia del ratolí MPSIIIB, i la seva posterior escalabilitat cap a la clínica humana.

Cap dels tractaments per a la MPSIIIB descrits fins a aquest punt han donat lloc a la restauració de l'activitat NAGLU conjuntament amb una correcció de les inclusions citoplasmàtiques al SNC i als teixits somàtics. Per tant, es fa necessari el desenvolupament de noves estratègies terapèutiques més eficaces per al tractament de la MPSIIIB.

### ***III. Objectius***

La Mucopolisacaridosi IIIB és una malaltia minoritària caracteritzada per una progressiva i severa neurodegeneració, i per alteracions a nivell somàtic. Tot i que es pot presentar en diferents formes d'evolució, la més greu és la d'aparició infantil que duu a la mort dels pacients entre la primera i la segona dècada de vida. Les teràpies actuals per al tractament de la patologia són merament pal·liatives i destinades al control simptomàtic i a la millora de la qualitat de vida. Per aquesta raó, es fa necessari el desenvolupament de noves estratègies terapèutiques per al seu tractament. La teràpia gènica *in vivo* basada en l'administració de vectors virals adenoassociats es presenta com una de les alternatives terapèutiques més prometedores, ja que permet l'expressió a llarg termini de la proteïna deficitària a nivell del sistema nerviós central així com també a nivell somàtic, afavorint el tractament de la patologia somàtica i del sistema nerviós central.

*L'objectiu general* del present estudi va ser **desenvolupar una aproximació de teràpia gènica per al tractament de l'afectació neurològica i somàtica de la mucopolisacaridosi tipus IIIB**. Aquest objectiu principal es va subdividir en els següents *objectius específics*:

- 1. Avaluat els efectes de l'administració directa al líquid cefaloraquídi d'un vector viral adenoassociat de serotip 9 codificant per la proteïna NAGLU en ratolins model de la MPSIIIB.**
  - 1.1. Estudiar l'efecte del tractament sobre la patologia neurològica i somàtica.
  - 1.2. Determinar l'efecte del tractament a nivell conductual i de supervivència.
  
- 2. Avaluat la translacionabilitat de l'aproximació terapèutica en un model animal gran, gossos *Beagle* adults.**

## ***IV. Resultats***



***Part 1. Caracterització del model murí de  
MPSIIIB a 2 mesos d'edat***

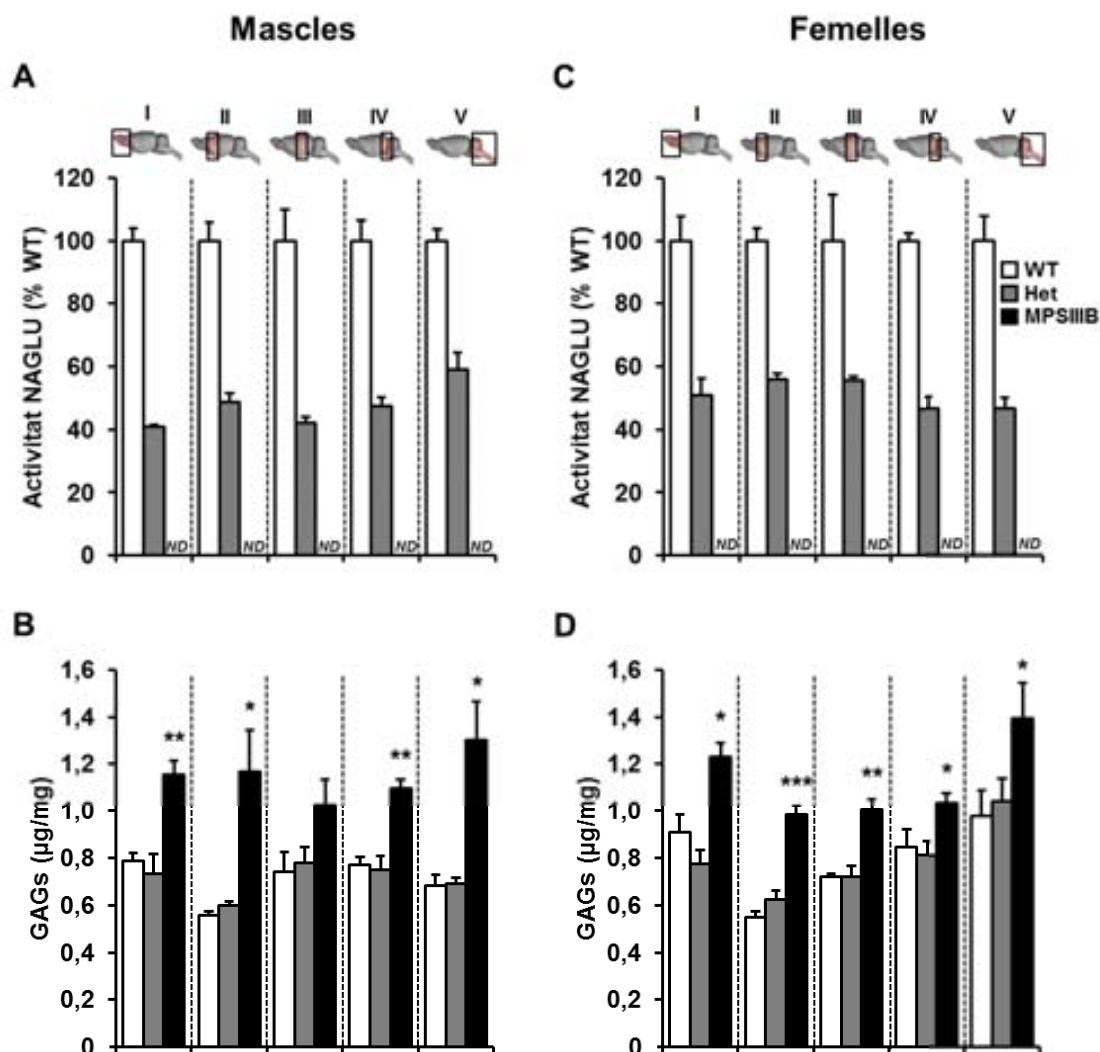
## 1. PATOLOGIA DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL

Previ al disseny d'una aproximació terapèutica per ser provada en el ratolí MPSIIIB, es va dur a terme un anàlisi fenotípic complet del ratolí model de la malaltia als 2 mesos d'edat amb la finalitat de determinar l'estat de la patologia a aquesta edat primerenca, quan els ratolins són adults joves.

Per tal de valorar el grau d'afectació del SNC del ratolí MPSIIIB, en primer lloc es va determinar l'activitat enzimàtica NAGLU i l'acumulació de GAGs en diferents parts del cervell de ratolins Control (*Wilde-type*, WT), Heterozigots (Het) i Homozigots (MPSIIIB) per la disrupció del gen *Naglu*. Amb aquesta finalitat, el cervell es va dividir longitudinalment en 2 regions (dreta i esquerra) i cadascuna alhora es va dividir en 5 regions coronals més, essent la regió "I" la més frontal i la regió "V" la més caudal. D'aquesta manera, les regions cerebrals es trobaven igualment representades per a les posteriors determinacions analítiques.

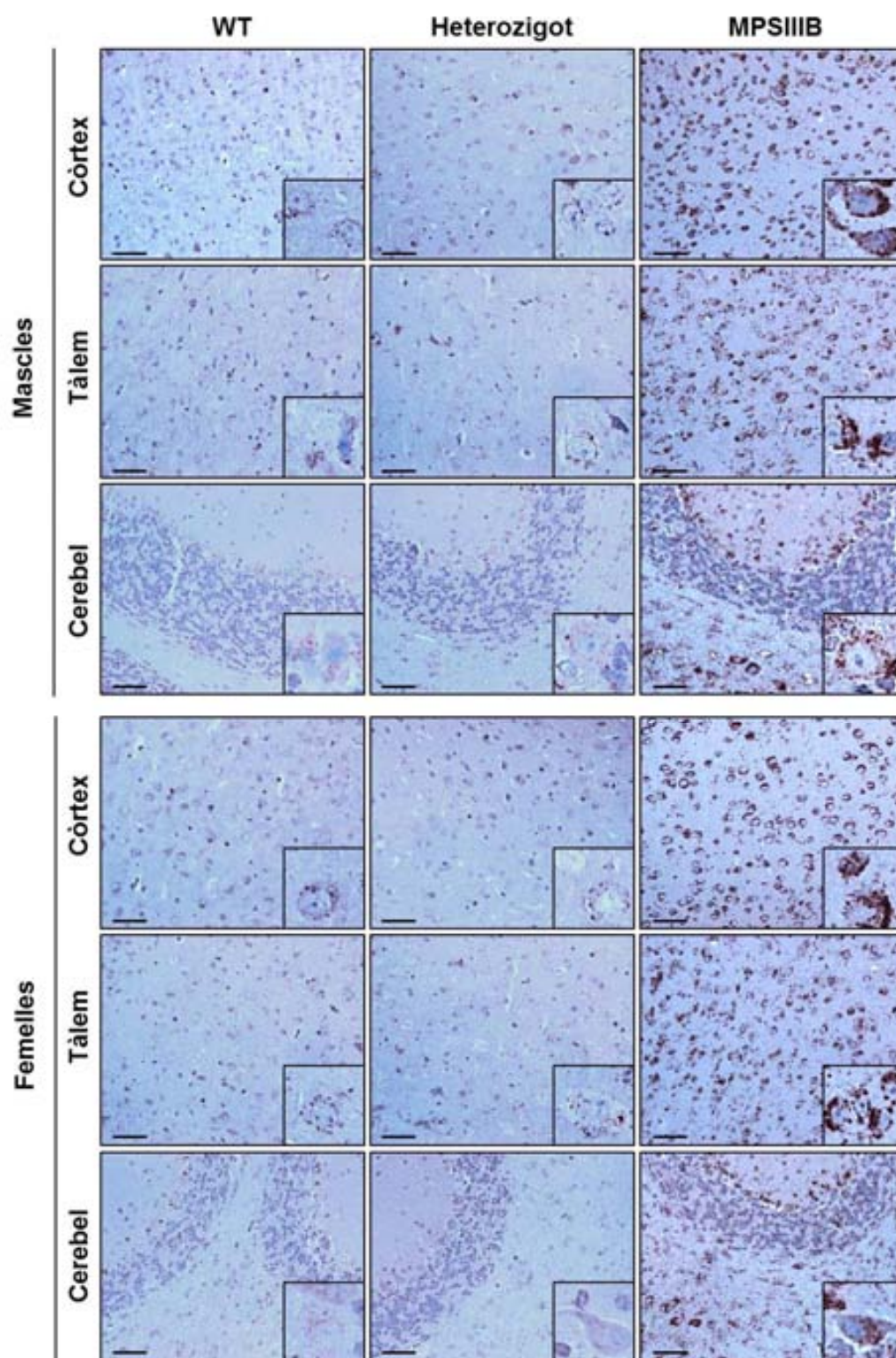
### 1.1. Determinació d'activitat NAGLU i contingut de GAGs al cervell

L'activitat NAGLU mesurada a les diferents parts del cervell de ratolins mascles i femelles va ser pràcticament indetectable en ratolins MPSIIIB, mentre que els heterozigots presentaven una activitat aproximada del 50% respecte dels ratolins WT (Figura 11A i C). No obstant, el 50% d'activitat NAGLU observada en els extractes de cervell dels ratolins heterozigots era suficient per mantenir la quantitat de GAGs a nivells indistingibles dels determinats en cervells de ratolins WT (Figura 11B i D). Per contra, en totes les zones del cervell analitzades de ratolins MPSIIIB, l'acumulació de GAGs es trobava significativament augmentada, tant en mascles com en femelles, en concordança amb l'absència d'activitat enzimàtica NAGLU en aquest ratolins models de la malaltia.



**Figura 11. Mesura d'activitat NAGLU i quantificació de GAGs al cervell.** (A,C) Determinació d'activitat NAGLU i (B,D) quantificació de GAGs en extractes de cervell de ratolins mascles (A,B) i femelles (C,D) de 2 mesos d'edat. L'activitat NAGLU en totes les regions de cervell analitzades de ratolins MPSIIIIB mascles (A) i femelles (C) era pràcticament indetectable, mentre que els heterozigots presentaven una activitat d'aproximadament el 50% respecte l'activitat observada en els WT. En totes les regions del cervell de ratolins MPSIIIIB d'ambdós sexes s'hi va detectar un augment significatiu de l'acumulació de GAGs. Els ratolins heterozigots no presentaven diferències significatives d'acumulació respecte dels WT. Les dades que es mostren corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM de 3-4 animals per grup. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. WT; ND: No detectable.

L'acumulació patològica de GAGs observada al cervell dels ratolins MPSIIIIB d'ambdós sexes (Figura 11B i D) es va confirmar posteriorment mitjançant anàlisi immunohistoquímica en camp clar utilitzant el marcatge contra la proteïna LIMP-2, una proteïna integral de la membrana lisosòmica (Fujita, 1991) (Figura 12).



**Figura 12. Increment del compartiment lisosòmic al cervell.** Imatges representatives del marcatge de LIMP-2 en diferents zones del cervell de ratolins WT, Heterozigots i MPSIIIB d'ambdós sexes de 2 mesos d'edat. En les zones analitzades, els ratolins MPSIIIB presentaven un augment en el compartiment lisosòmic en comparació amb ratolins WT i Heterozigots de la mateixa edat. Imatges representatives de 3 animals per grup. La barra d'escala indica 50  $\mu$ m.

Els ratolins MPSIIIB de 2 mesos d'edat i independentment del sexe, presentaven un augment significatiu del marcatge lisosòmic per a LIMP-2, indicatiu d'un augment en el compartiment d'aquests orgànuls i per tant, d'un excés d'acumulació de GAGs al SNC (Figura 12).

A més, i d'acord amb la quantificació de GAGs que es mostra a la Figura 11, no es va observar un major marcatge contra LIMP-2 en els talls histològics de ratolins heterozigots en comparació amb el grup WT. Aquest fet confirmava l'absència de distensió lisosòmica en aquest grup de ratolins, els quals, tot i presentar una activitat del 50% respecte dels ratolins WT, van mostrar un fenotip indistingible de l'observat en el grup WT.

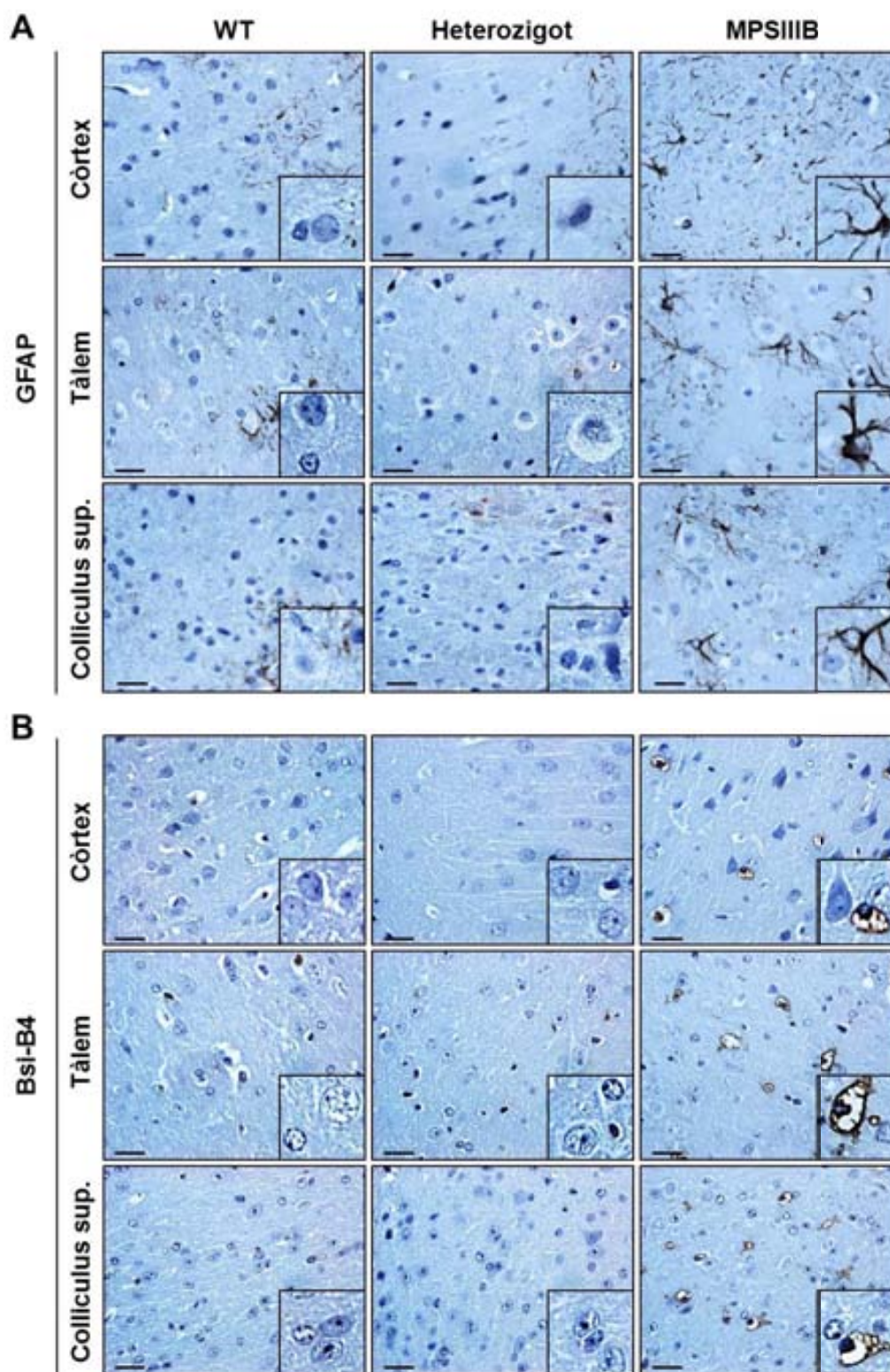
## 1.2. Avaluació de la neuroinflamació

L'acumulació crònica i sostinguda de formes intermèdies de degradació de HS i com a procés secundari a l'acumulació d'aquest GAG a les neurones i cèl·lules de la glia, dona lloc a processos de neuroinflamació al cervell dels ratolins MPSIIIB (Ohmi, 2003; Ausseil, 2008; Wilkinson, 2012), característica també compartida amb la malaltia humana (Kurihara, 1996; Tamagawa, 1985).

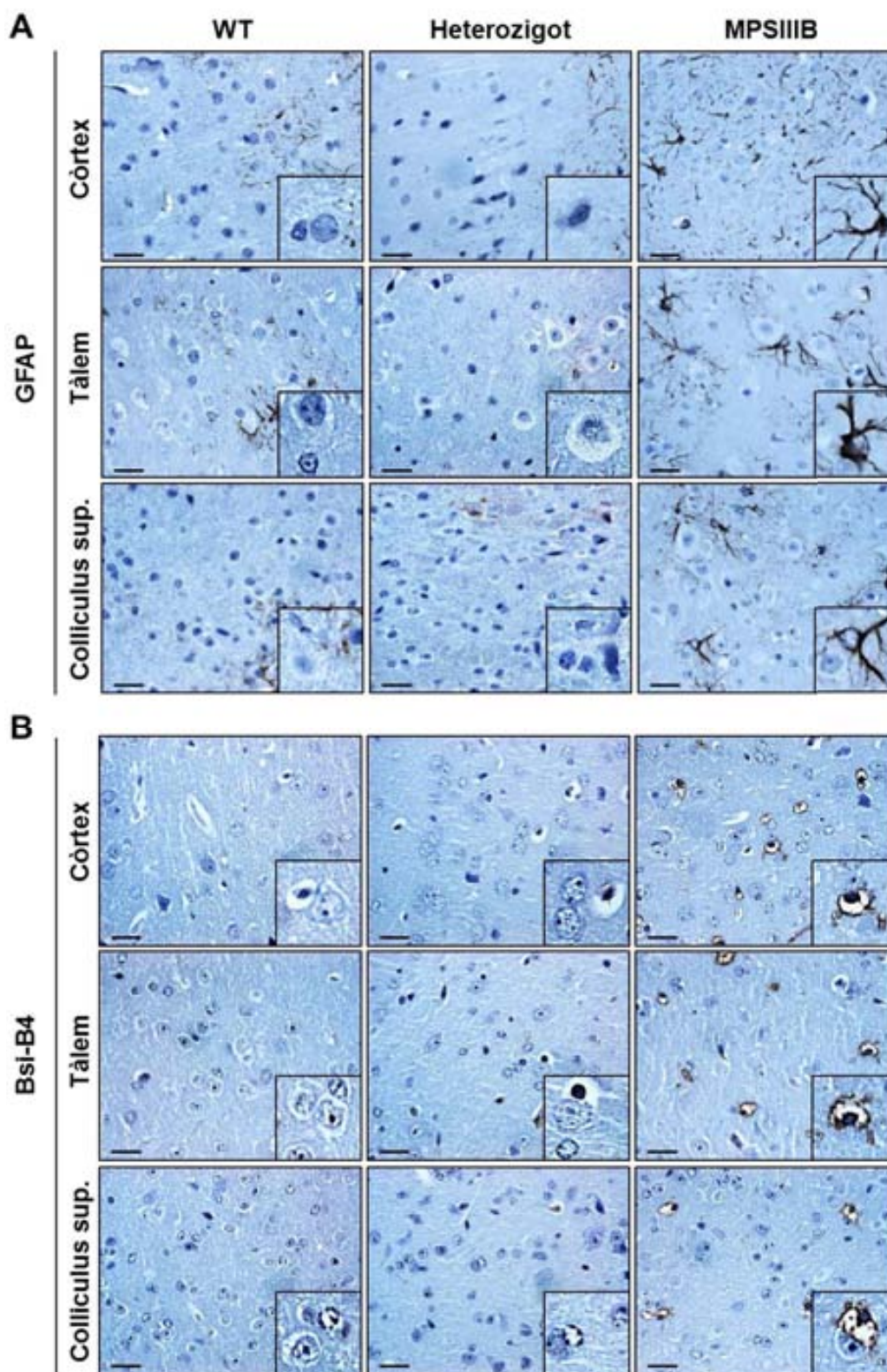
Per aquest motiu, també es va avaluar la possible neuroinflamació en ratolins MPSIIIB joves mitjançant anàlisi immunohistoquímica contra marcadors de processos neuroinflamatoris, ja que en aquest i d'altres models animals, la neuroinflamació és un procés clau en el desenvolupament de la patologia.

En primer lloc, es van dur a terme tincions immunohistoquímiques en seccions de còrtex cerebral, tàlem i *colliculus* superior utilitzant marcadors específics per a astròcits (GFAP) i per a micròglia (Bsi-B4). La GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) és una proteïna estructural citoplasmàtica present als astròcits, mentre que Bsi-B4 és una lectina que reconeix conjugats glicoproteics de membrana que contenen residus terminals de  $\alpha$ -D-galactosa presents en les cèl·lules de la micròglia activades, però no en altres tipus de cèl·lules glials (Streit, 1987). Ambdues tincions, estretament relacionades amb la neuroinflamació, van posar de manifest una marcada astrocitosi i microgliosi en totes les regions cerebrals analitzades de ratolins MPSIIIB, mentre que les mateixes regions de ratolins heterozigots tenien un aspecte no patològic indistingible de l'observat en els ratolins WT (Figures 13 i 14).





**Figura 13. Avaluació de la neuroinflamació en ratolins mascles.** Imatges representatives dels marcatges per a GFAP (A) i Bsi-B4 (B) en diferents zones del cervell de ratolins WT, Heterozigots i MPSIIIB mascles de 2 mesos d'edat. L'anàlisi immunohistoquímica va posar de manifest la presència d'una marcada astrocitosi i microgliosi únicament en els cervells de ratolins MPSIIIB. No es va observar augment del marcatge de GFAP ni del de Bsi-B4 en ratolins Het en comparació amb els WT de la mateixa edat. Imatges representatives de 3 animals per grup. La barra d'escala indica 25  $\mu$ m.



**Figura 14. Avaluació de la neuroinflamació en ratolins femelles.** Imatges representatives dels marcatges contra GFAP (A) i Bsi-B4 (B) en diferents zones del cervell de ratolins WT, Heterozigots i MPSIIIIB femelles de 2 mesos d'edat. L'anàlisi immunohistoquímica va posar de manifest la presència d'una marcada astrocitosi i microgliosi únicament en els cervells de ratolins MPSIIIIB. No es va observar augment del marcatge de GFAP ni del de Bsi-B4 en ratolins Het en comparació amb els WT de la mateixa edat. Imatges representatives de 3 animals per grup. La barra d'escala indica 25  $\mu$ m.



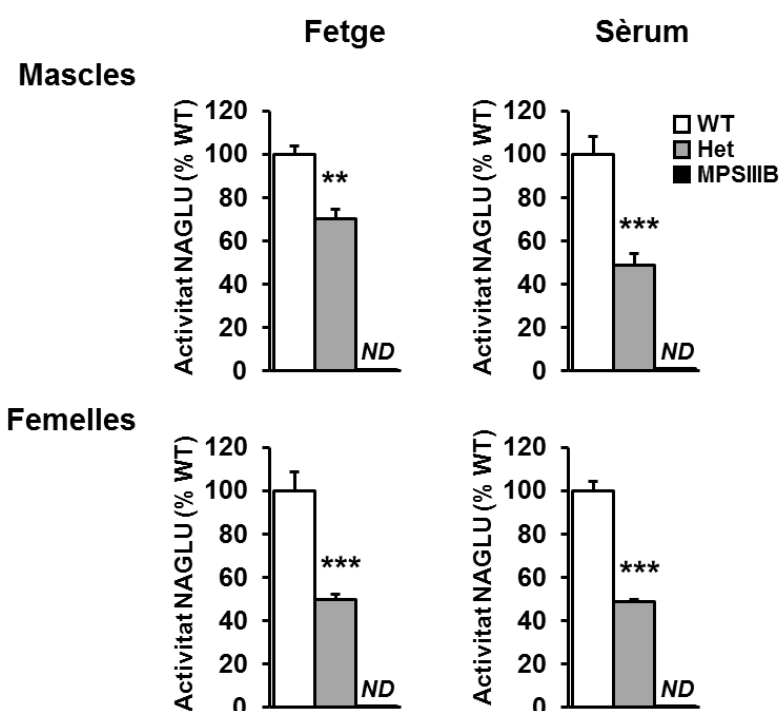
Així, els resultats obtinguts amb l'anàlisi immunohistoquímica de processos de neuroinflamació van permetre confirmar que els ratolins MPSIIIB mascles i femelles de 2 mesos d'edat presentaven, una marcada astrocitosi i microgliosi, i per tant, una neuroinflamació establerta (Figures 13 i 14).

Aquest conjunt d'observacions indicava que a l'edat de 2 mesos, la patologia neurològica dels ratolins MPSIIIB es trobava totalment establerta.



## 2. PATOLOGIA SOMÀTICA

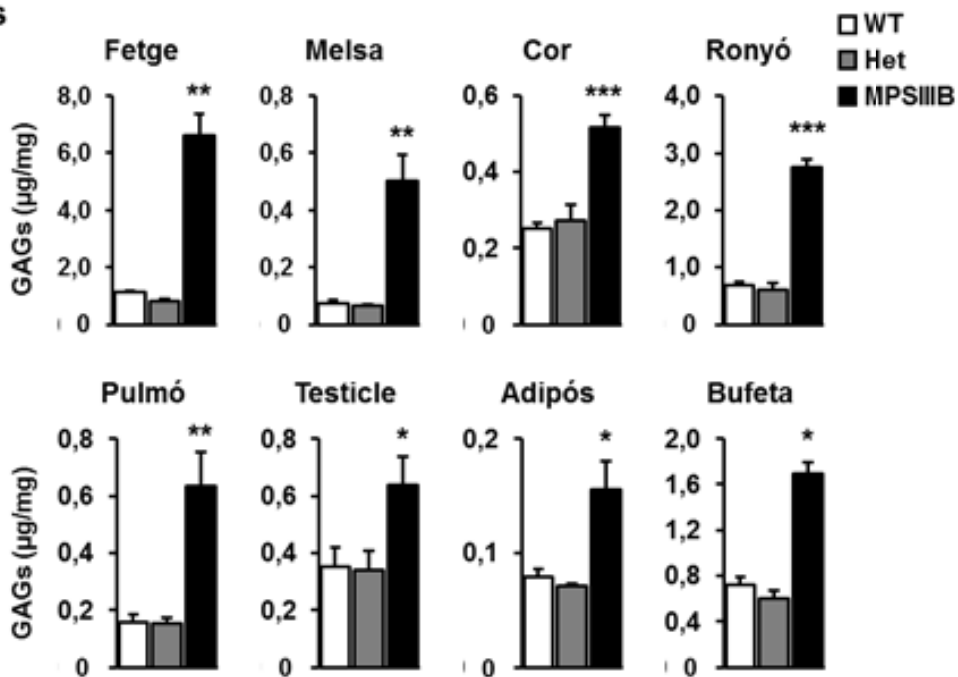
Paral·lelament a l'estudi de la patologia del SNC en ratolins MPSIIIB joves, també es va dur a terme una valoració de l'afectació a nivell somàtic. La determinació de l'activitat NAGLU en fetge i sèrum, com ja s'havia observat en el cas del cervell, va ser pràcticament indetectable en els ratolins MPSIIIB, mentre que l'activitat en ratolins heterozigots era d'aproximadament el 50% respecte a l'activitat mesurada en ratolins WT (Figura 15).



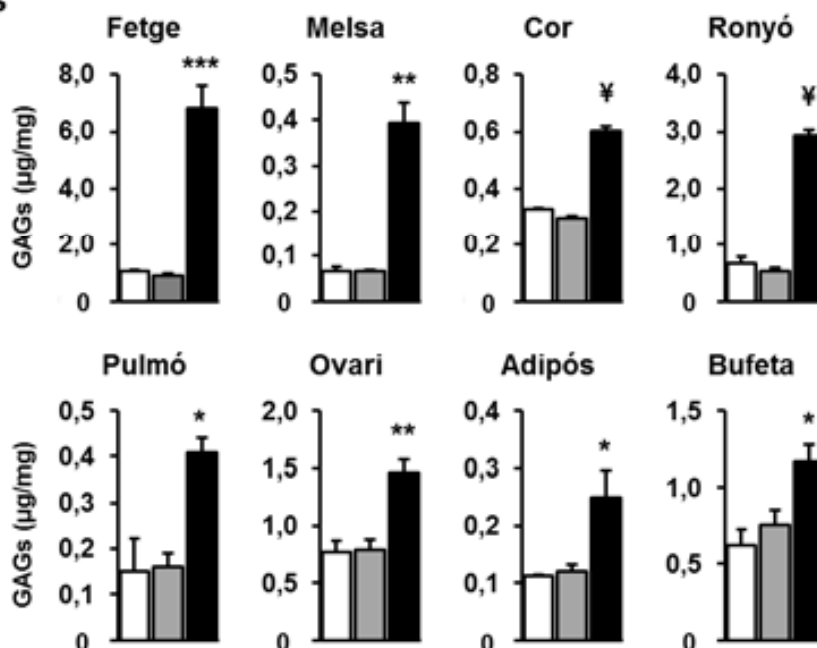
**Figura 15. Mesura d'activitat NAGLU circulant i hepàtica.** L'activitat NAGLU circulant i hepàtica de ratolins de 2 mesos d'edat va mostrar ser del 50% en els ratolins Heterozigots en comparació als WT de la mateixa edat. Els ratolins MPSIIIB van presentar nivells d'activitat indetectables. Les dades que es mostren corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM de 3-4 animals per grup. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. WT; ND: No detectable.

Es van determinar també el contingut de GAGs a nivell somàtic, i en tots els teixits i òrgans analitzats, els ratolins MPSIIIB d'ambdós sexes van presentar nivells significativament elevats de GAGs en comparació amb els ratolins WT i Het, amb especial acumulació al fetge i als ronyons (Figura 16). Com ja s'havia observat en el cas de la patologia del cervell, el 50% d'activitat NAGLU pròpia dels heterozigots era suficient per mantenir els nivells de GAGs de tots els teixits i òrgans, indistingibles dels detectats en ratolins WT de la mateixa edat.

## Mascles

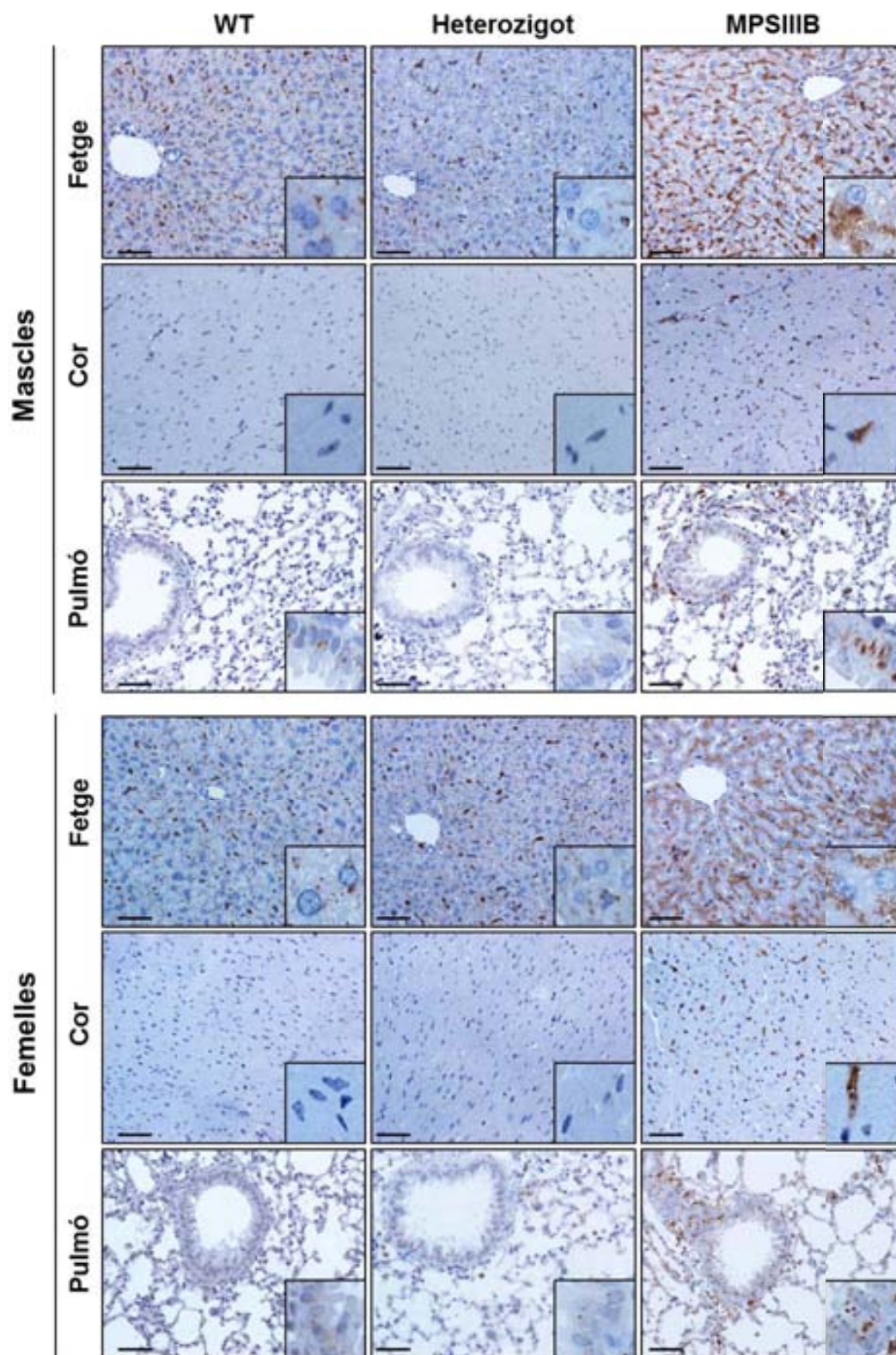


## Femelles



**Figura 16. Contingut de GAGs en òrgans i teixits somàtics de ratolins de 2 mesos d'edat.** Acumulació patològica de GAGs en òrgans i teixits somàtics de ratolins MPSIIIB, mentre que aquests nivells en ratolins Het es van mantenir dins el rang mesurat en els ratolins WT. Les dades que es mostren corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM de 3-4 animals per grup. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , ‡ $p < 0,0001$  vs. WT.

El contingut en GAGs en òrgans i teixits somàtics també es va determinar mitjançant anàlisi immunohistoquímica utilitzant com a marcador la proteïna lisosòmica de membrana LAMP-1. La distensió lisosòmica era únicament present en ratolins MPSIIIB, mentre que l'acumulació en els ratolins heterozigots era indistingible de l'observada en els mateixos òrgans i teixits dels ratolins WT (Figura 17), com s'evidenciava en la quantificació del nivell total de GAGs en diferents teixits (Figura 16).



**Figura 17. Increment del contingut lisosòmic en òrgans i teixits somàtics.** Imatges representatives mostrant el marcatge contra LAMP-1 en Fetge, Cor i Pulmó de ratolins WT, Heterozigots i MPSIIIB d'ambdós sexes de 2 mesos d'edat. Es va poder observar un marcatge contra LAMP-1 significativament més elevat en ratolins MPSIIIB, en comparació amb els altres grups. No es van observar diferències entre els grups de ratolins WT i Heterozigots. Imatges representatives de 3 animals per grup. La barra d'escala indica 50  $\mu$ m.

### 3. AVALUACIÓ DEL COMPORAMENT

#### 3.1. Alteracions del comportament a 2 mesos d'edat

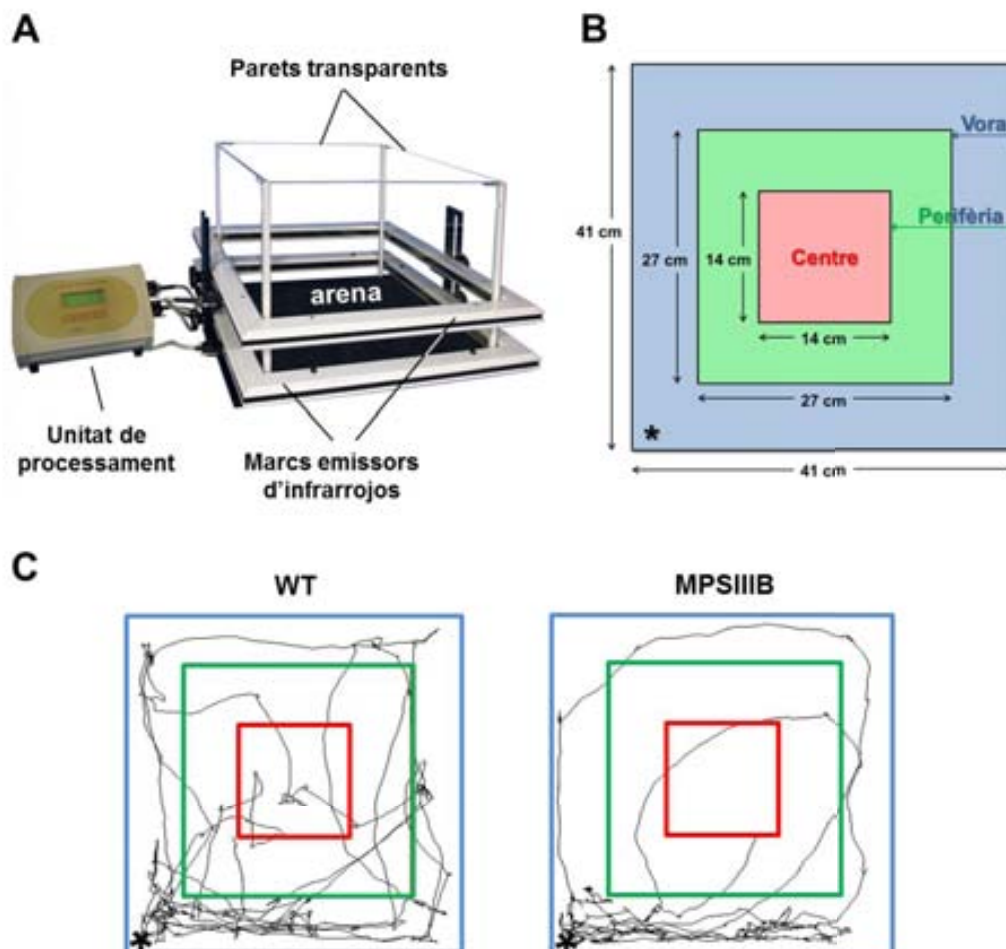
Està àmpliament descrit que el ratolí MPSIIIB presenta importants dèficits de comportament, tant mascles com femelles de diferents edats (Li, 1999; Heldermon, 2007; Fu, 2009; Canal, 2010; Langford-Smith, 2011). Aquestes alteracions s'observen tant a nivell somàtic com també a nivell del SNC afectant i alterant l'activitat locomotora, la coordinació motora, el ritme circadiari, l'aprenentatge o la cognició, entre d'altres.

Per tal d'estudiar en més detall el comportament de ratolins joves, es va decidir dur a terme una caracterització del model animal utilitzant la prova de l'*Open-field* o Actímetre, que permet avaluar, detectar i quantificar comportaments ansiògens quan l'animal es troba en un entorn nou i desconegut, així com també problemes relacionats amb l'activitat locomotora. La prova de l'*Open-field* ha estat àmpliament utilitzada en aquest model animal murí de la MPSIIIB, amb resultats en alguns casos contradictoris entre ells i molt variables en funció de l'edat i el sexe dels ratolins analitzats en cada cas (Cressant, 2004; Fu, 2007; Heldermon, 2007; Fu, 2010; Fu, 2011; Langford-Smith, 2011).

La prova de l'*Open-field* consisteix en exposar l'animal a una situació estressant, com ho és el fet de deixar-lo en un entorn nou i desconegut, per tal d'observar-ne la seva reacció. Consta d'un espai generalment quadrat anomenat *arena*, delimitada per parets transparents, de manera que l'animal té la sensació de trobar-se en un espai nou i obert (Figura 18A). Alhora, l'arena es troba dividida en 3 regions diferenciades: Centre –o part central–, Perifèria –la qual correspon a la part de l'arena que no es troba inclosa a la part central–, i Vora –o zona de la perifèria estrictament adjacent a les parets– (Figura 18B). La vora correspon a la part menys ansiògena de l'Actímetre, mentre que el centre n'és la part més ansiògena, motiu pel qual es tendeix a evitar durant els primers minuts. El fet de deixar el ratolí en un ambient desconegut li provoca una primera reacció que fa que aquest inspeccioni en primer lloc les zones més properes a les parets (zones menys ansiogèniques) evitant les zones més allunyades, com ho és el centre de l'arena, ja que en l'entorn natural de l'animal correspondria a l'espai on s'hi troba menys protegit i més exposat a possibles perills i/o depredadors.

En el cas de la colònia dels ratolins de la MPSIIIB, les diferències entre ratolins WT i MPSIIIB es van fer evidents únicament durant els primers 2 minuts de la prova, moment a partir del qual les diferències entre ells quedaven diluïdes i es feien

indistingibles. El comportament estàndard d'un ratolí WT durant aquest període era el d'explorar ràpidament l'arena, independentment de la zona. En canvi, els ratolins MPSIIIB es mostraven estàtics durant uns segons i començaven a explorar l'arena a la zona de la vora, i rarament creuaven o exploraven la part central (Figura 18C).



**Figura 18. Actímetre i representació esquemàtica de l'arena.** (A) L'actímetre consta de l'arena (espai delimitat per les parets transparents), de dos marcs emissors de feixos d'infrarojos per detectar el moviment vertical i horitzontal dels ratolins, i d'una unitat de processament de dades. (B) Representació esquemàtica de les zones en què es divideix l'arena. L'asterisc indica el punt inicial on es diposita el ratolí en iniciar la prova. (C) Esquemes representatius de la trajectòria seguida pels ratolins WT i MPSIIIB de 2 mesos d'edat durant els 2 primers minuts de la prova. El traçat negre indica la trajectòria seguida pels ratolins durant els 2 primers minuts. La vora de l'arena està delimitada per la línia blava; la perifèria queda delimitada entre les línies verda i blava; la zona central està continguda dins la línia vermella.

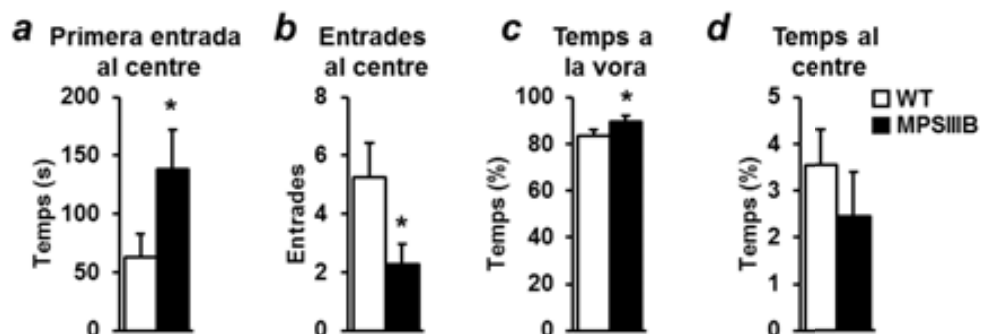
Així, el comportament dels ratolins MPSIIIB a l'*Open-field* va permetre observar que ja als 2 mesos d'edat, aquest model animal presentava dèficits tant en l'activitat locomotora com també alteracions conductuals relacionades amb l'ansietat, independentment del sexe. El comportament ansiogen dels ratolins MPSIIIB es va veure reflectit amb un major temps d'entrada a la zona central de l'arena (zona ansiògena) (Figures 19Aa i 20Aa). A més, durant els 2 primers minuts de la prova, el nombre d'entrades totals al centre es veia significativament disminuït en els ratolins malalts, així com també es podia observar un augment significatiu del temps transcorregut a la vora o zona de menys ansietat, evitant així la zona central (Figures 19Ab-Ac i 20Ab-Ac). Tot i no ser significativa, es va observar també una tendència dels ratolins MPSIIIB a passar menys proporció de temps a la zona central, fet que posava encara més de manifest el comportament ansiogen d'aquests animals (Figures 19Ad i 20Ad). En general, doncs, els ratolins MPSIIIB presentaven una clara tendència a evitar la zona més ansiògena o zona central de l'Actímetre, podent concloure d'aquesta conducta que els ratolins models de la malaltia presenten un marcat comportament ansiogen quan són sotmesos al test de l'*Open-Field*.

A banda dels problemes associats amb l'ansietat, també es van poder observar deficiències en l'activitat locomotora i exploratòria dels ratolins MPSIIIB (Figures 19Ba-Bg i 20Ba-Bg).

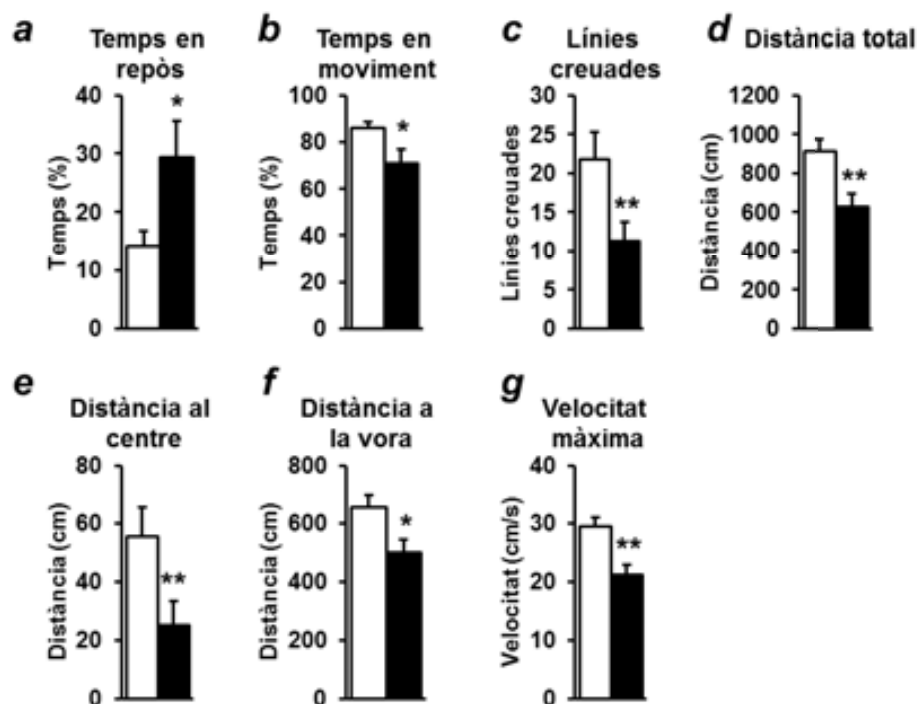
Els ratolins MPSIIIB passaven significativament més part del temps en repòs en comparació amb els ratolins WT, la qual cosa es traduïa en un menor temps en moviment i com a conseqüència, el nombre de línies que delimitaven les diferents zones de l'arena i que eren creuades pels ratolins, també es veia significativament reduït (Figures 19Ba-Bc i 20Ba-Bc). Com a conseqüència, la distància recorreguda durant els dos primers minuts així com també la distància recorreguda tant al centre com a la vora, es van veure significativament disminuïdes en els ratolins MPSIIIB, tant mascles com femelles, a excepció de la distància a la vora, que en femelles s'hi observa una tendència no significativa (Figures 19Bd-Bf i 20Bd-Bf). La velocitat màxima significativament reduïda en els ratolins MPSIIIB respecte dels WT també era un clar indicador d'alteracions en l'activitat locomotora (Figures 19Bg i 20Bg).

En general doncs, el conjunt d'aquests paràmetres van posar de manifest la presència d'alteracions tant en l'activitat locomotora així com també en l'activitat exploratòria del ratolins MPSIIIB mascles i femelles.

## A. Ansietat



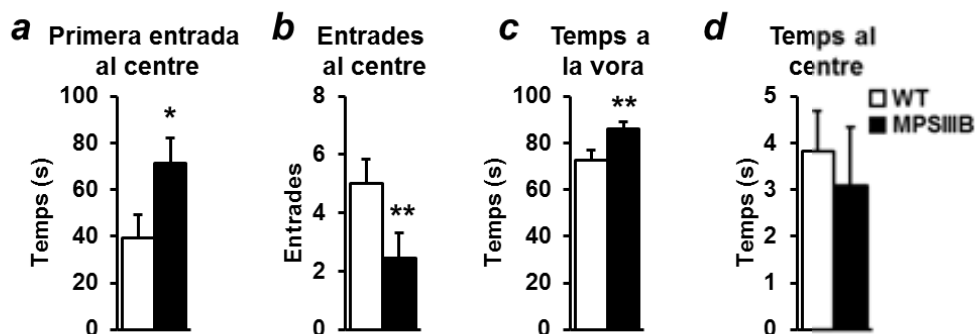
## B. Activitat locomotora



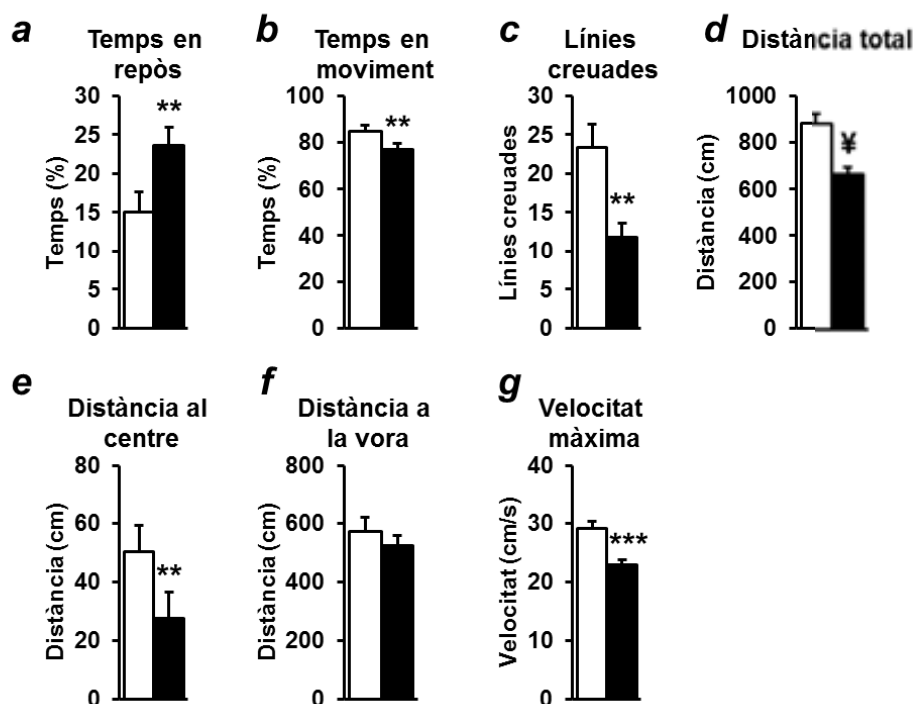
**Figura 19. Alteracions en el comportament dels ratolins MPSIIIB mascles.** A l'edat de dos mesos, els ratolins MPSIIIB mascles presenten un comportament ansiogen (**Aa-Ad**) i alteracions en l'activitat locomotora (**Ba-Bg**). Les dades que es mostren corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM de 15 animals per grup. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs. WT.



## A. Ansietat



## B. Activitat locomotora



**Figura 20. Alteracions en el comportament dels ratolins MPSIII B femelles.** A l'edat de dos mesos, els ratolins MPSIII B femelles presenten un comportament ansiogen (**Aa-Ad**) i alteracions en l'activitat locomotora (**Ba-Bg**). Les dades que es mostren corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM de 15 animals per grup. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \* $p < 0,0001$  vs. WT.

D'aquesta manera, les alteracions relatives al comportament posades de manifest amb la prova de l'*Open-Field* indicaven que ja a l'edat de 2 mesos, el model animal murí de la MPSIII B presentava alteracions de comportament. En conseqüència,

qualsevol tractament o aproximació terapèutica experimental que es dugués a terme a aquesta edat seria curatiu i no preventiu.

### 3.2. Evolució del comportament de ratolins WT i MPSIIIB amb l'edat

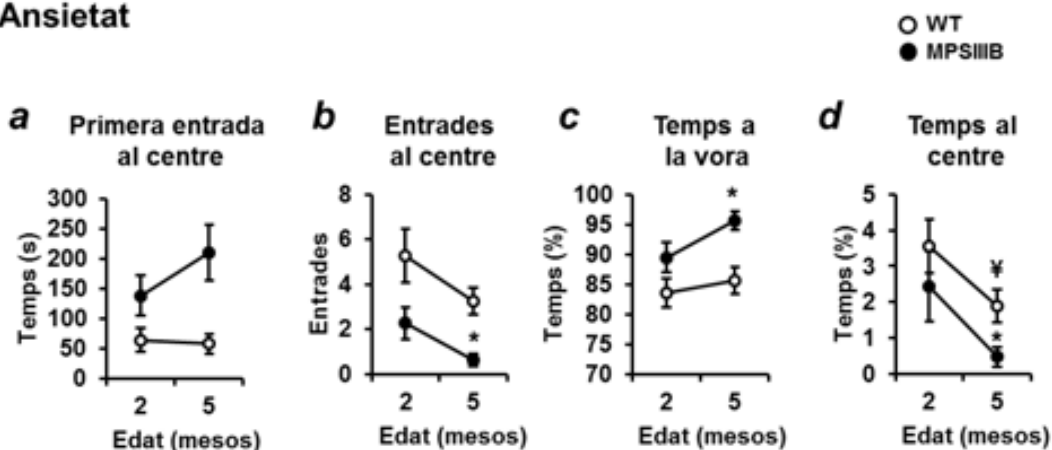
La prova de l'*Open-field* també es va realitzar en ratolins WT i MPSIIIB de 5 mesos d'edat per tal d'avaluar l'evolució de les alteracions del comportament amb l'edat. D'aquesta manera, es van comparar les dades de comportament obtingudes a 2 mesos d'edat amb les obtingudes als 5 mesos entre ratolins WT i MPSIIIB d'ambdós sexes.

En el cas dels mascles, i pel que fa al comportament ansiogen, es va poder observar un empitjorament general dels ratolins MPSIIIB de 5 mesos d'edat (Figura 21). A aquesta edat, els ratolins presentaven un temps d'entrada al centre i un temps transcorregut a la vora més elevats respecte a les dades mesurades en ratolins de 2 mesos (Figura 21Aa i Ac). Tant el temps transcorregut al centre com també el nombre d'entrades al centre disminuïen també significativament (Figura 21Ab i Ad). De la mateixa manera, l'activitat locomotora a 5 mesos d'edat també es va veure empitjorada en ratolins MPSIIIB en comparació amb els joves (Figura 21B); en gairebé tots els paràmetres analitzats amb l'*Open-Field* s'hi observava un canvi més acusat i estadísticament significatiu en els ratolins de més edat. Per tant, i en termes generals, el comportament ansiogen així com també l'activitat locomotora es van veure més acusats amb l'edat en ratolins MPSIIIB mascles.

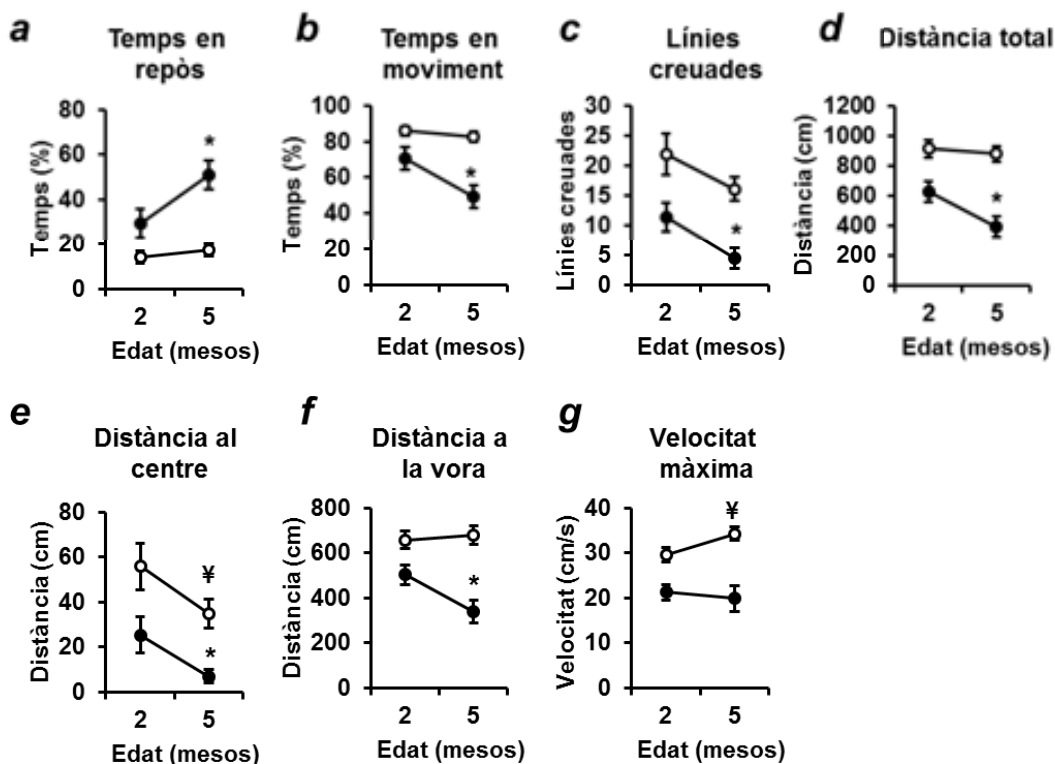
D'altra banda, tant mascles WT com MPSIIIB de 5 mesos d'edat tendien a evitar la zona central, ja que tant el nombre d'entrades al centre així com també la distància i el temps transcorreguts en aquesta zona es veien significativament disminuïts en ambdues condicions (Figura 21Bb, Bd, Be). Aquest fet suggeria una tendència a un comportament pro-ansiogen desenvolupat amb l'edat.

L'empitjorament del comportament de les femelles no va ser tant clar com en el cas dels mascles. Les femelles MPSIIIB de 5 mesos d'edat presentaven una tendència a presentar comportaments més ansiògens, tot i que no hi havia diferències estadísticament significatives (Figura 22A). A nivell d'activitat locomotora sí que es va observar un deteriorament en les femelles MPSIIIB en molts dels paràmetres analitzats, indicatiu, com en el cas dels mascles MPSIIIB, d'un empitjorament amb l'edat d'aquest paràmetre (Figura 22B). Aquest fet podria suggerir una evolució diferent (potser més lenta) de la malaltia en els ratolins MPSIIIB femelles.

## A. Ansietat

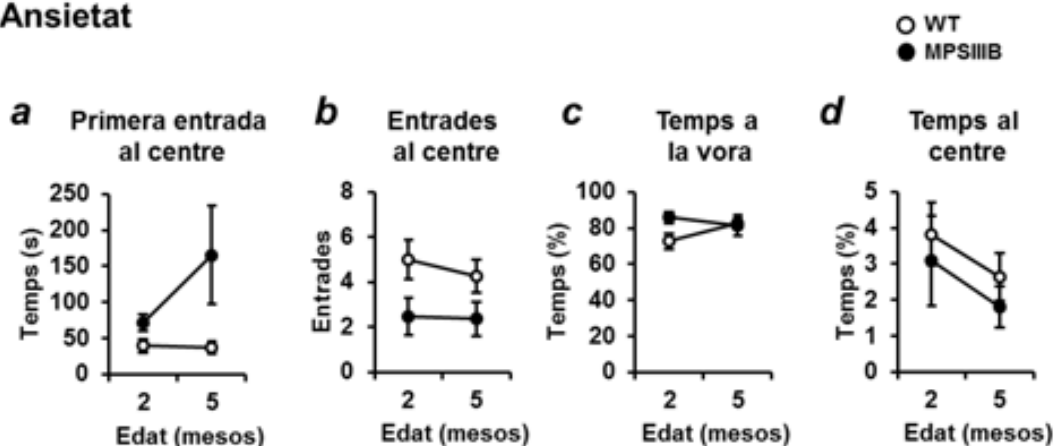


## B. Activitat locomotora

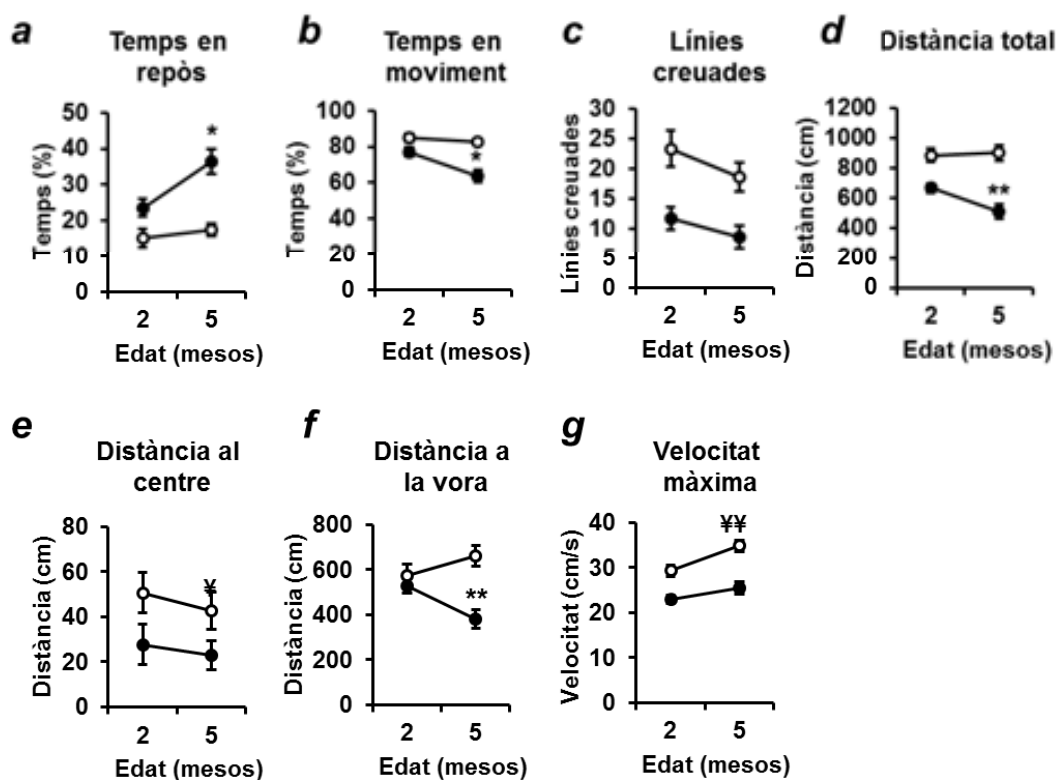


**Figura 21. Evolució del comportament amb l'edat en ratolins MPSIIIB mascles.** Empitjorament general del comportament en els ratolins MPSIIIB mascles de 5 mesos d'edat respecte dels 2 mesos d'edat, tant dels paràmetres indicadors d'alteracions relacionades amb l'ansietat (**A**) com d'alteracions en l'activitat locomotora (**B**). Als 5 mesos d'edat els ratolins MPSIIIB van mostrar un comportament més ansiogen i una disminució significativa de l'activitat locomotora. Les dades que es mostren corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM de 12-19 animals per grup. \* $p < 0,05$ , vs. MPSIIIB de 2 mesos d'edat;  $\ddagger p < 0,05$  vs. WT de 2 mesos d'edat.

## A. Ansietat



## B. Activitat locomotora



**Figura 22. Evolució del comportament amb l'edat en ratolins MPSIIIIB femelles.** Empitjorament general del comportament en els ratolins MPSIIIIB femelles de 5 mesos d'edat respecte dels 2 mesos d'edat, tant dels paràmetres indicadors d'alteracions relacionades amb l'ansietat (A) com d'alteracions en l'activitat locomotora (B). Als 5 mesos d'edat els ratolins MPSIIIIB van mostrar un comportament més ansiogen i una disminució significativa de l'activitat locomotora. Les dades que es mostren corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM de 12-19 animals per grup. \* $p < 0,05$ , vs. MPSIIIIB de 2 mesos d'edat; † $p < 0,05$ , ‡ $p < 0,01$  vs. WT de 2 mesos d'edat.

L'absència d'activitat enzimàtica NAGLU, l'augment en el contingut de GAGs i les alteracions de comportament observades en els ratolins MPSIIIB de 2 mesos d'edat, demostren que les principals alteracions de la MPSIIIB ja estan establertes a aquesta edat. Per tant, el model murí de la MPSIIIB a 2 mesos d'edat representa un bon model animal per a l'estudi i assaig de noves estratègies terapèutiques en les fases inicials de la malaltia, quan la patologia ja es troba establerta.

***Part 2. Tractament del model animal murí de  
MPSIIIB amb AAV9-mNAGLU***

## 1. CONSTRUCCIÓ D'UN VECTOR VIRAL ADENOASSOCIAT CODIFICANT PER LA PROTEÏNA NAGLU MURINA

Com a conseqüència de la patologia observada en ratolins MPSIIIB joves i aprofitant l'experiència del nostre grup en el desenvolupament d'aproximacions de teràpia gènica, es va dur a terme el disseny d'una aproximació terapèutica pel tractament de la MPSIIIB. Aquesta es va centrar en l'administració intracisterna magna en el model murí de la malaltia de la còpia corregida de la seqüència codificant del gen *Naglu* murí, mitjançant un vector viral adenoassociat de serotip 9. L'elecció d'aquest serotip es va fonamentar en la seva àmplia biodistribució al SNC quan és administrat al LCR (Haurigot, 2013).

Per al disseny i construcció del vector viral es va partir de la seqüència codificant del gen *Naglu* murí (*Gene ID: 27419*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), la qual es va optimitzar per tal d'obtenir un augment en l'eficiència tant a nivell de traducció del mRNA així com també d'expressió proteica (Disbrow, 2003; Ward, 2011). La seqüència murina optimitzada (mNAGLU) es va clonar en el plasmidi d'expressió pAAV-CAG, que conté el promotor ubic CAG, la seqüència de poliadenilació de la  $\beta$ -globina de conill i les ITRs del vector AAV2. El plasmidi resultant es va anomenar pAAV-CAG-mNAGLU (on la *m* indica l'origen murí).

Finalment, la producció del vector viral corresponent es va dur a terme com s'especifica en l'apartat de Materials i Mètodes. El vector viral resultant es va anomenar AAV9-mNAGLU (Figura 23)



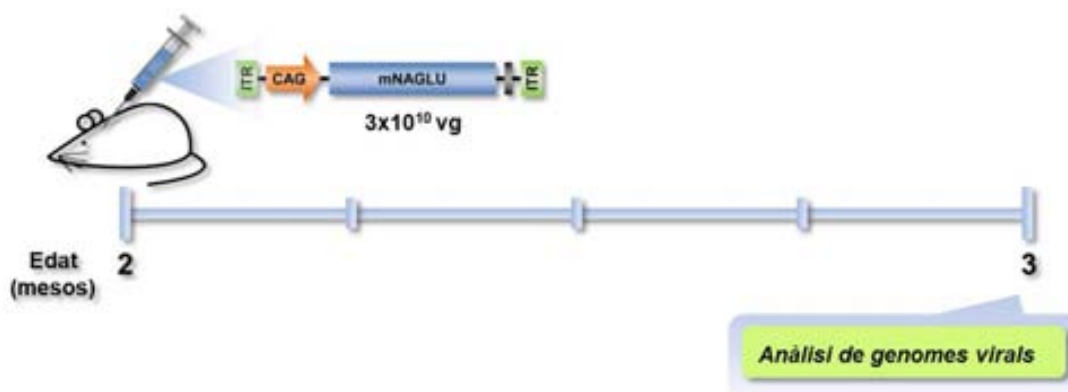
**Figura 23. Representació esquemàtica del constructe codificant per la proteïna NAGLU murina optimitzada AAV9-mNAGLU.** CAG: promotor híbrid basat en el promotor de la  $\beta$ -actina de pollastre i l'*enhancer* del Citomegalovirus; ITR: *Inverted Terminal Repeats*; Poly A: seqüència de poliadenilació.

## 2. BIODISTRIBUCIÓ DEL VECTOR VIRAL AAV9-mNAGLU ADMINISTRAT AL LCR PER VIA INTRACISTERNA MAGNA

Recentment, al nostre laboratori s'ha observat com l'administració directa al LCR per via intracisterna magna de vectors virals AAV9 resulta en la transducció eficient de neurones i cèl·lules de la glia del cervell murí (Haurigot, 2013). A més, estudis farmacocinètics indiquen que tot i ser administrat al LCR, una petita part d'aquest vector és capaç de passar a circulació sanguínia i transduir el fetge, donant lloc a l'expressió gènica del transgèn en aquest òrgan (Haurigot, 2013).

D'altra banda, l'expressió hepàtica de proteïnes lisosòmiques de secreció és una font d'enzim circulant que dona lloc a l'augment d'activitat enzimàtica al sèrum i conseqüentment, a la correcció de la patologia lisosòmica en teixits somàtics per un mecanisme de "correcció creuada" (Fu, 2011; Ruzo, 2012a i 2012b) (Figura 2).

Per tal de valorar la difusió del vector viral AAV9-mNAGLU administrat al LCR, es va dur a terme un estudi de biodistribució. Ratolins WT i MPSIIIB mascles i femelles de 2 mesos d'edat es van administrar intracisterna magna amb el vector viral AAV9-mNAGLU a una dosi de  $3 \times 10^{10}$  vg/ratolí (Figura 24). Passat un mes de l'administració, els animals van ser sacrificats i es van quantificar els genomes virals tant a nivell del SNC com dels òrgans i teixits somàtics.



**Figura 24. Disseny experimental de l'estudi de biodistribució.** El vector viral AAV9-mNAGLU es va administrar a la cisterna magna de ratolins WT i MPSIIIB mascles i femelles de 2 mesos d'edat. Transcorregut un mes des de l'administració, es va dur a terme la quantificació de genomes virals en diferents òrgans i teixits.



La presència de genomes virals en ratolins WT i MPSIIIB es va determinar per mitjà de PCR quantitativa (qPCR), tal com s'especifica a l'apartat de Materials i Mètodes. Així, es van observar genomes virals en totes les parts del cervell analitzades, essent les parts més properes al punt d'administració les que presentaven una major transducció viral (Taula 6). També es van detectar genomes virals a la part frontal del cervell, més allunyada del punt d'injecció (Taula 6). A banda del cervell, la medul·la espinal també va mostrar nivells significatius de transducció viral, essent els valors més elevats a la zona cervical, més propera al punt d'administració, confirmant la biodistribució del vector viral a tot el SNC gràcies al transport a través del LCR.

Taula 6. Biodistribució del vector viral AAV9-mNAGLU

		vg/cèl·lula							
		Mascles				Femelles			
		WT		MPSIIIB		WT		MPSIIIB	
Cervell	I	0,18	0,02	0,14	0,04	0,10	0,04	0,13	0,03
	II	0,10	0,01	0,09	0,01	0,07	0,04	0,12	0,04
	III	0,13	0,01	0,13	0,04	0,06	0,03	0,19	0,10
	IV	0,18	0,04	1,61	0,73	0,28	0,21	0,80	0,55
	V	0,15	0,07	0,94	0,15	0,46	0,40	1,35	0,74
Medul·la espinal	Cer	0,04	0,01	0,14	0,07	0,05	0,02	0,07	0,02
	Dor	0,01	0,00	0,04	0,01	0,02	0,01	0,02	0,00
Fetge	LLE	0,78	0,10	0,73	0,31	0,64	0,29	0,65	0,07
	LME	0,82	0,05	0,90	0,39	0,72	0,33	0,75	0,14
	LD	1,11	0,18	0,71	0,30	0,40	0,08	0,75	0,10
Melsa		0,25	0,19	0,03	0,02	ND		0,02	0,01
Glàndula adrenal	E	0,06	0,01	0,03	0,01	0,08	0,02	0,10	0,02
	D	0,09	0,03	0,05	0,01	0,09	0,01	0,10	0,00
Nòdul limfàtic mandibular	E	0,11	0,01	0,15	0,01	0,06	0,03	0,14	0,03
	D	0,14	0,03	0,10	0,02	0,05	0,02	0,10	0,03
Nòdul limfàtic inguinal	E	0,07	0,02	0,01	0,00	0,02	0,01	0,02	0,01
	D	0,08	0,02	0,01	0,00	0,02	0,00	0,02	0,01
Teixit adipós blanc		0,03	0,00	0,02	0,00	0,03	0,01	0,03	0,01

El vector viral AAV9-mNAGLU es va administrar a la cisterna magna de ratolins WT i MPSIIIB d'ambdós sexes a una dosi de  $3 \times 10^{10}$  vg/ratolí. Un mes post-administració, els genomes virals es van detectar majoritàriament a tot el SNC i al fetge, tot i que nivells més baixos van ser observats en diversos òrgans i teixits somàtics. Altres teixits i òrgans no mostrats a la taula com el cor, pulmons, ronyons, medul·la òssia, pell, timus, múscul esquelètic, intestí, pàncreas, bufeta urinària, epidídim, testicles, oviductes i ovaris no van mostrar nivells detectables de genomes virals. Els resultats que es mostren a la taula corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM de 4-5 animals per grup. Cer: cervical, Dor: dorsal, LLE: lòbul lateral esquerre, LME: lòbul medial esquerre, LD: lòbul dret, E: esquerre, D: dret, ND: No detectable.

El fetge va mostrar nivells significatius de transducció viral, però també altres òrgans i teixits somàtics com la melsa, les glàndules adrenals o el teixit adipós van mostrar transducció viral, tot i que inferior a l'observada al fetge (Taula 6). El fet d'observar transducció viral a nivell somàtic demostra la capacitat del vector viral AAV9 per arribar a circulació sanguínia i transduir òrgans i teixits somàtics després de ser administrat a la cisterna magna.

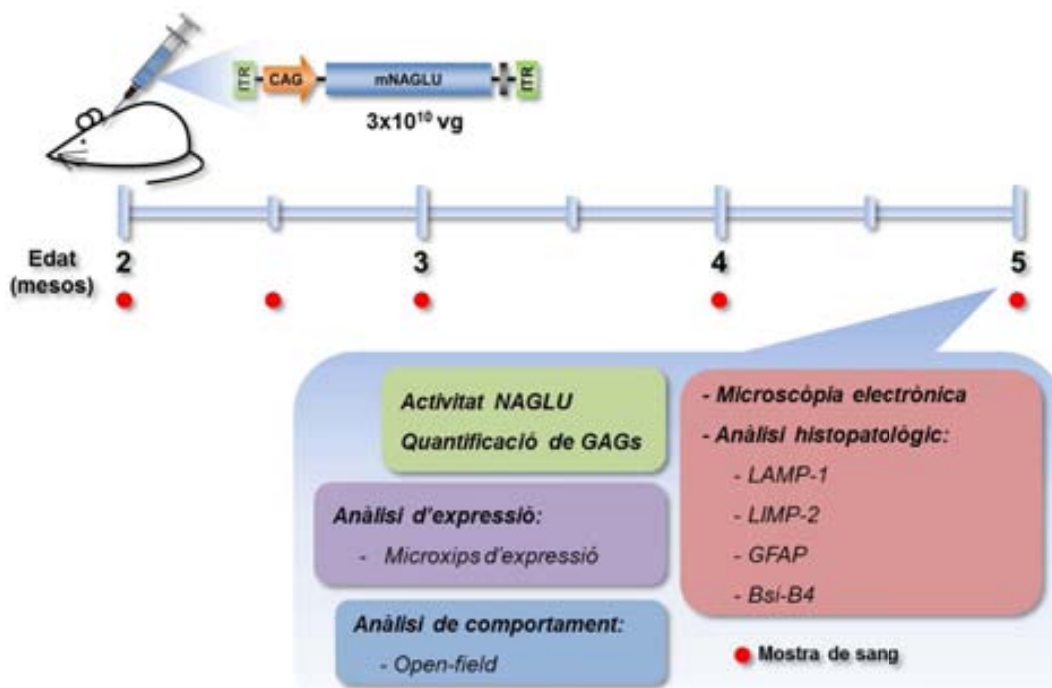
No es van observar diferències significatives de biodistribució entre sexes ni tampoc entre ratolins WT i MPSIIIB (Taula 6), indicant que la transducció viral, en aquest cas, era independent del sexe i no es va veure modificada per les possibles alteracions a nivell cel·lular associades a la MPSIIIB.

Per tant, una única administració intracisterna del vector viral AAV9-mNAGLU va donar lloc a la transducció, no només del SNC, sinó també del fetge i d'altres òrgans i teixits somàtics. Degut a la capacitat de secreció de la proteïna NAGLU al torrent circulatori i de ser captada per altres teixits i òrgans distants que expressin el receptor de la manosa-6-fosfat (MPR), aquest resultat suggereix la possibilitat d'observar una correcció tant de la patologia del SNC com a nivell somàtic.

### 3. EFECTE TERAPÈUTIC DE L'ADMINISTRACIÓ INTRACISTERNA MAGNA DEL VECTOR VIRAL AAV9-mNAGLU AL SNC

Amb la finalitat de determinar el possible efecte terapèutic de l'administració directa al LCR del vector viral codificant per la proteïna NAGLU murina sobre la patologia neurològica, el vector AAV9-mNAGLU va ser administrat a una dosi de  $3 \times 10^{10}$  vg/ratolí a la cisterna magna de ratolins MPSIIIB mascles i femelles de 2 mesos d'edat (Figura 25).

Com a animals control de la injecció es van utilitzar ratolins MPSIIIB administrats també per via intracisterna magna i a la mateixa dosi amb el vector viral AAV9-Nul, vector que únicament conté el promotor CAG i la seqüència de poliadenilació, però que no codifica per a cap proteïna.

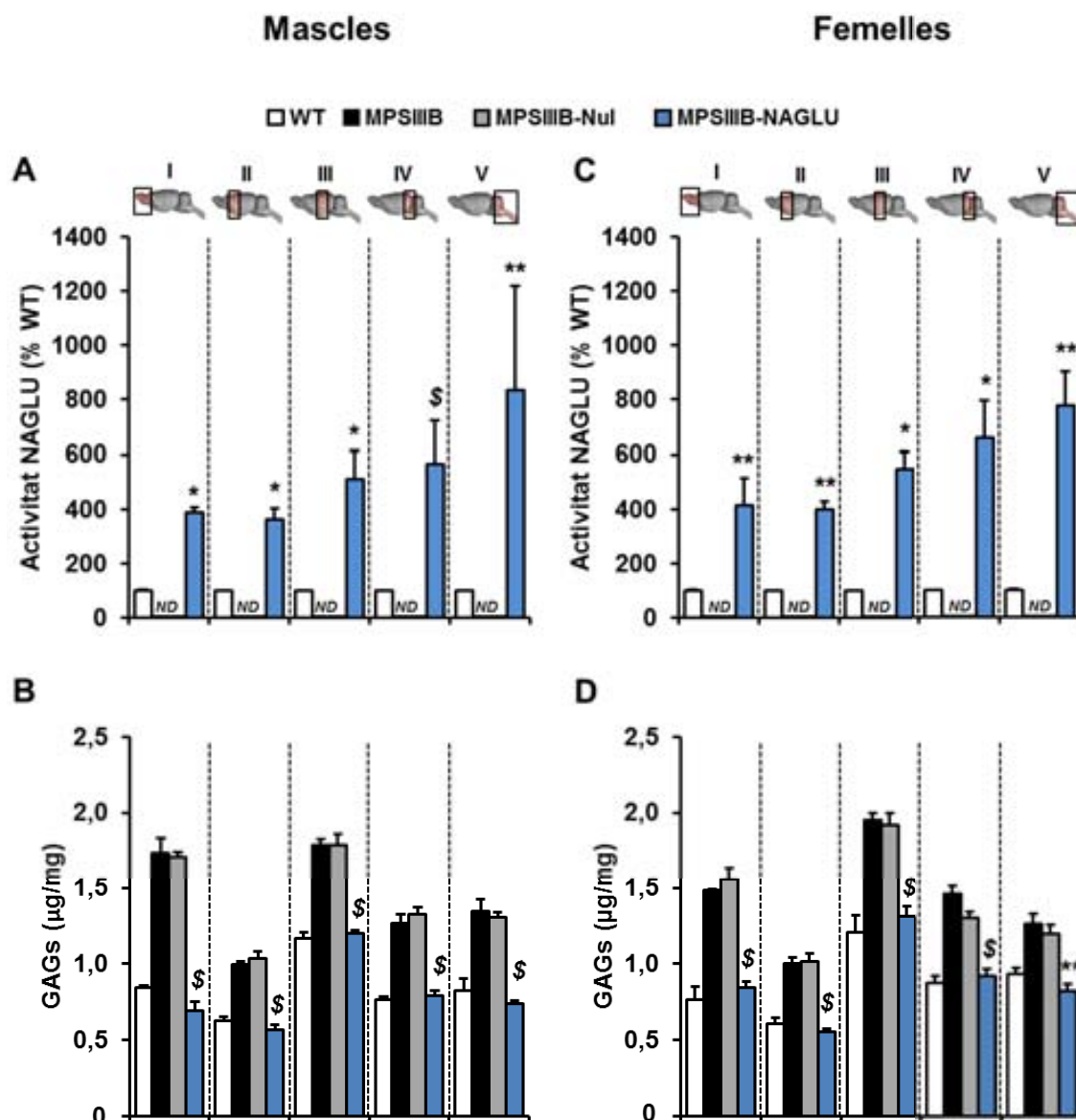


**Figura 25. Disseny experimental.** El vector viral AAV9-mNAGLU es va administrar a la cisterna magna de ratolins MPSIIIB de 2 mesos d'edat. Paral·lelament també es van injectar per via intracisterna ratolins MPSIIIB amb el vector viral AAV9-Nul com a controls de la injecció. El sacrifici es va realitzar passats 3 mesos després de l'administració viral, moment en què es van analitzar tots els paràmetres que s'indiquen a la figura.

Transcorreguts els 3 mesos de tractament (a l'edat de 5 mesos) i prèviament al sacrifici, els ratolins es van sotmetre a la prova de comportament de l'*Open-Field* o Actímetre per tal d'avaluar els possibles efectes terapèutics de l'administració viral en els dèficits de comportament característics del model animal. Finalment, es van sacrificar els ratolins i se'ls van extreure varis òrgans i teixits amb la finalitat de determinar-ne l'activitat NAGLU i el contingut en GAGs (Figura 25). La patologia d'acumulació lisosòmica del cervell i la neuroinflamació es van avaluar mitjançant anàlisi immunohistoquímica en diferents parts del cervell. Als òrgans i teixits somàtics la distensió lisosòmica es va avaluar també per mètodes immunohistoquímics i mitjançant Microscòpia Electrònica de Transmissió (MET). D'altra banda, també es va realitzar un anàlisi d'expressió gènica al cervell mitjançant microxips d'expressió (Figura 25).

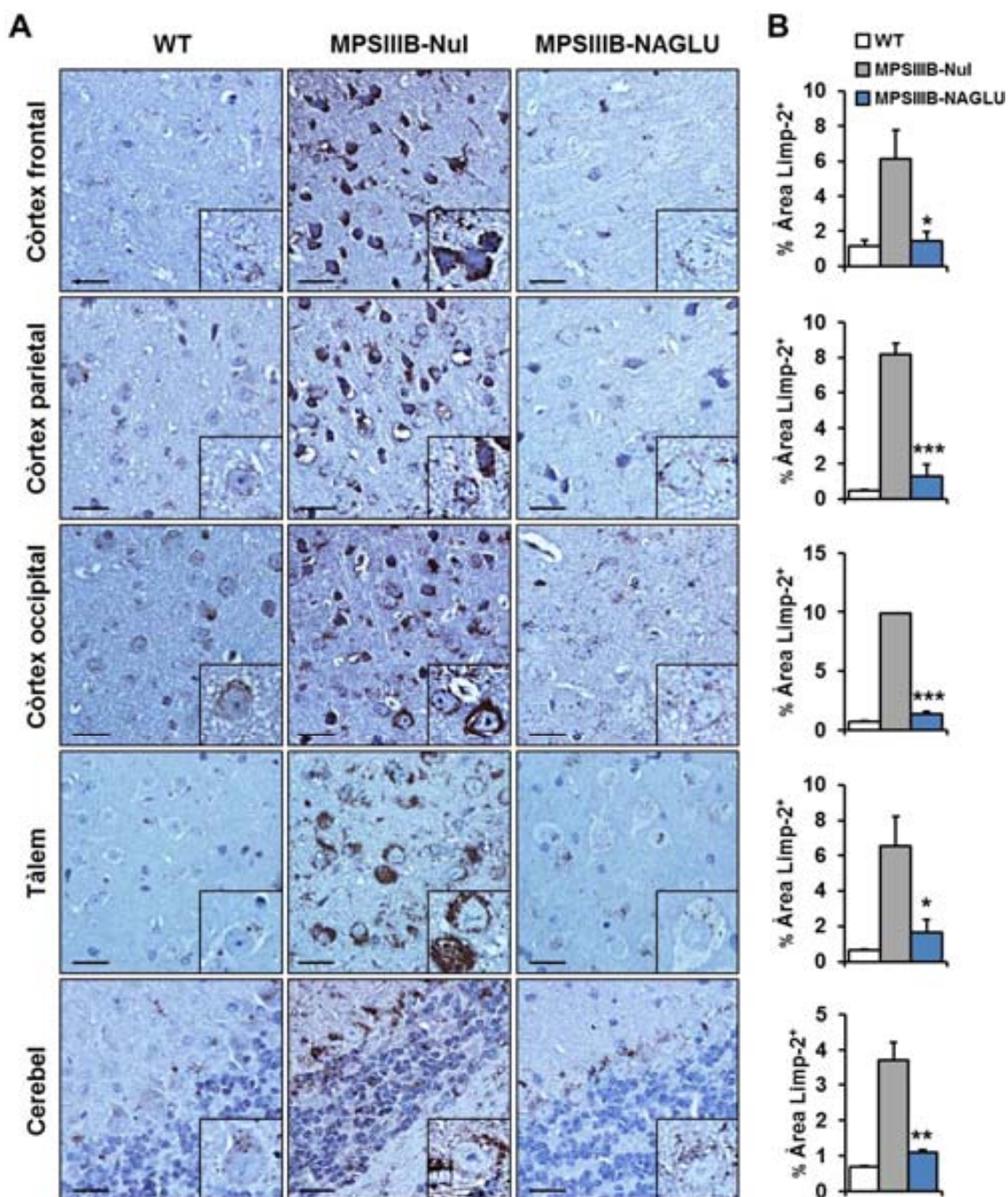
### **3.1. Correcció de l'activitat NAGLU i del contingut de GAGs al cervell**

Després de 3 mesos de tractament, es va observar que l'activitat NAGLU es restaurava i fins i tot augmentava en totes les regions de cervell analitzades de ratolins MPSIIIB d'ambdós sexes tractats amb el vector viral AAV9-mNAGLU, assolint nivells d'activitat d'entre 4 i fins a 8 vegades respecte dels mesurats en ratolins WT (Figura 26A i C). Aquest augment d'activitat es va correlacionar també amb una correcció a nivell d'emmagatzemament de GAGs en les mateixes regions del cervell. Els ratolins MPSIIIB tractats amb el vector viral AAV9-mNAGLU van mostrar nivells de GAGs comparables i indistingibles dels mesurats en els cervells de ratolins WT sans (Figura 26B i D).



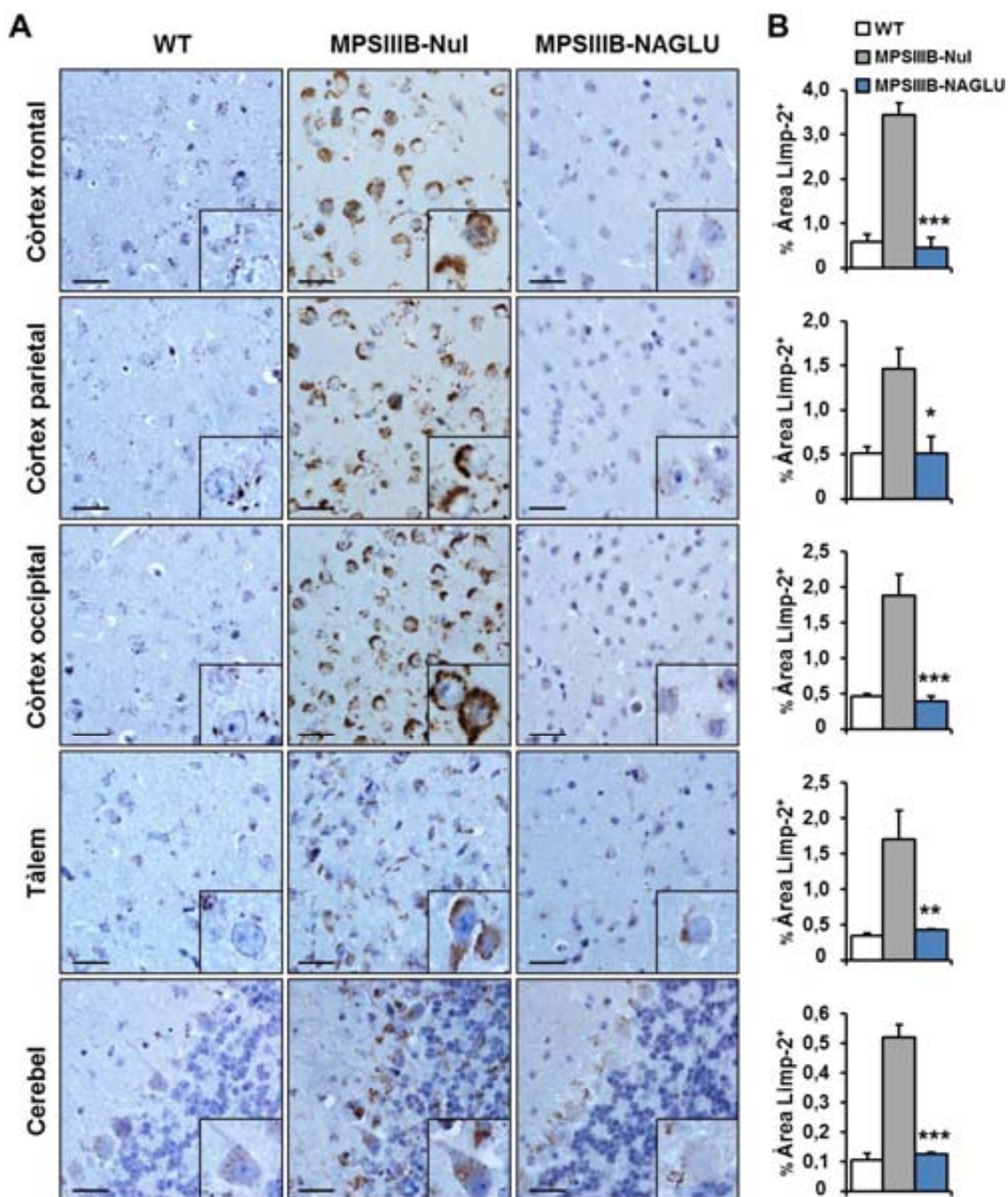
**Figura 26. Determinació d'activitat NAGLU i quantificació de GAGs al cervell.** (A,C) Activitat NAGLU i (B,D) quantificació de GAGs en extractes de cervell de ratolins sans (WT), MPSIIIB no tractats, tractats amb el vector viral Nul (MPSIIIB-Nul) i tractats amb el vector terapèutic (MPSIIIB-NAGLU) mascles (A,B) i femelles (C,D). L'activitat NAGLU era pràcticament indetectable en ratolins MPSIIIB i MPSIIIB-Nul mentre que en el grup MPSIIIB-NAGLU es va observar un augment significatiu d'activitat en totes les regions analitzades. Es va observar també una correcció dels nivells de GAGs en totes les regions de cervell analitzades. Les seccions coronals de cervell (seccions I a V) es mostren a la part superior de les gràfiques. Els resultats que es mostren corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM de 4 animals per grup. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \$ $p < 0,001$  vs. MPSIIIB-Nul. ND: No detectable, tant per MPSIIIB no tractats com per MPSIIIB-Nul.

La correcció del contingut lisosòmic en GAGs observada al cervell es va evidenciar també per mitjà d'anàlisi immunohistoquímica contra el marcador lisosòmic LIMP-2 en diferents regions del cervell (Figures 27 i 28).



**Figura 27. Normalització de la distensió lisosòmica al cervell de ratolins MPSIIIB mascles.** Imatges representatives (A) i quantificació del marcatge contra LIMP-2 (B) en diferents zones del cervell de ratolins mascles de 5 mesos d'edat. El marcatge contra LIMP-2 en ratolins MPSIIIB després de 3 mesos de tractament amb el vector viral AAV9-mNAGLU es va veure normalitzat en diferents àrees del cervell, indicatiu de la disminució del contingut en GAGs presents als lisosomes. Els resultats que es mostren als gràfics corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM de 2-3 animals per grup. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. MPSIIIB-Nul; la barra d'escala indica 25  $\mu$ m.



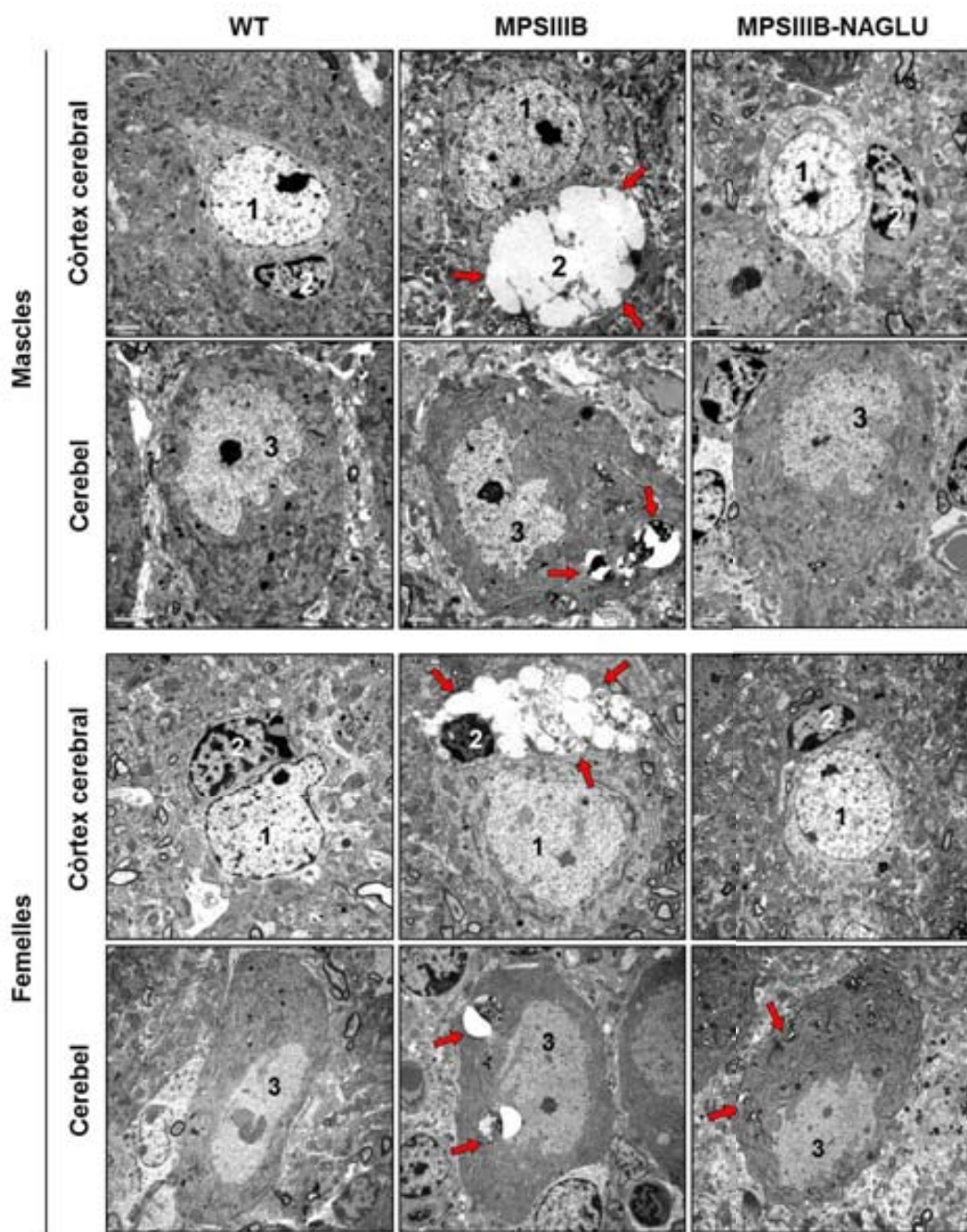


**Figura 28. Normalització de la distensió lisosòmica al cervell de ratolins MPSIIIB femelles.** Imatges representatives **(A)** i quantificació del marcatge contra LIMP-2 **(B)** en diferents zones del cervell de ratolins femelles de 5 mesos d'edat. El marcatge contra LIMP-2 en ratolins MPSIIIB després de 3 mesos de tractament amb el vector viral AAV9-mNAGLU es va veure normalitzat en diferents àrees del cervell, indicatiu de la disminució del contingut en GAGs presents als lisosomes. Els resultats que es mostren als gràfics corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM de 2-3 animals per grup. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. MPSIIIB-Nul; la barra d'escala indica 25  $\mu$ m.

La quantificació del marcatge positiu per LIMP-2 va permetre observar una normalització de la senyal en totes les regions cerebrals analitzades de ratolins administrats al LCR amb el vector viral terapèutic (Figures 27 i 28), mentre que els ratolins MPSIIIB tractats amb el vector Nul presentaven un aspecte patològic indistingible al dels ratolins MPSIIIB no tractats (dades no mostrades).

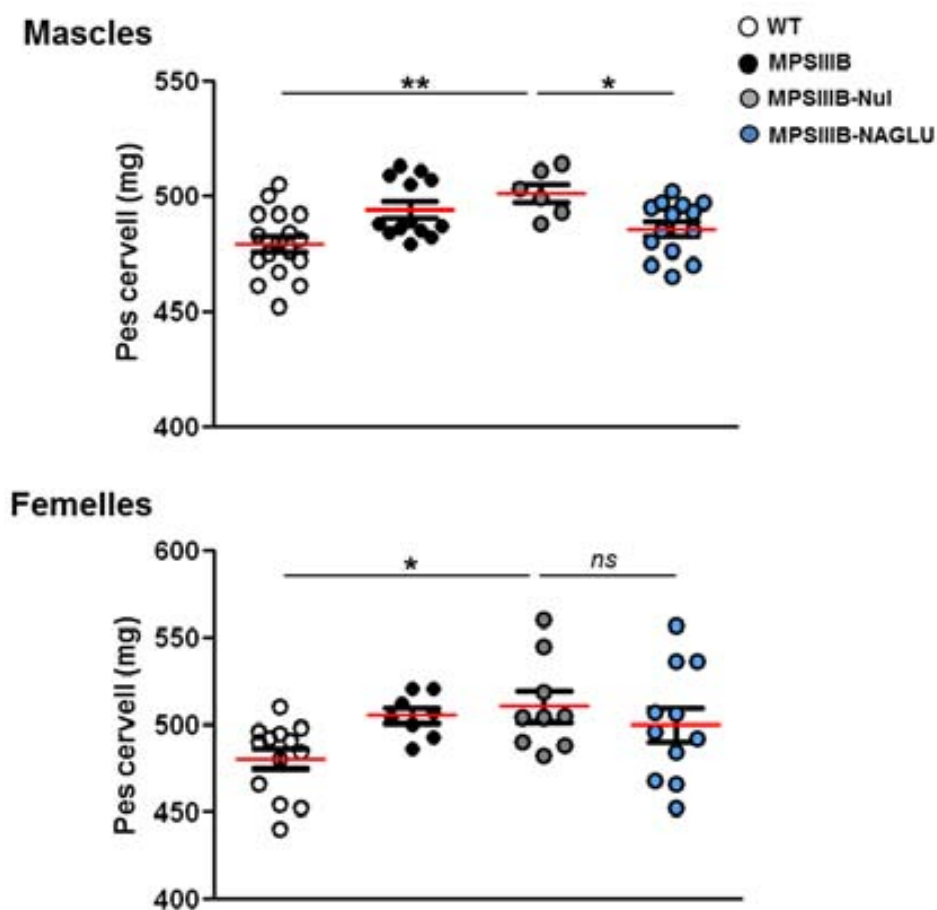
L'acumulació intralisosòmica de GAGs al cervell es va poder observar també amb més detall en les imatges d'ultraestructura de còrtex cerebral i de cerebel per mitjà de Microscòpia Electrònica de Transmissió (MET). Les imatges obtingudes mostraven, tant en femelles com en mascles MPSIIIB no tractats, la presència de grans vesícules d'acumulació de GAGs en les cèl·lules glials perineuronals (Figura 29, panells de còrtex cerebral). Es va poder observar també la correcció d'aquesta presència de vesícules poc electrodenses en els ratolins MPSIIIB tractats amb el vector terapèutic, on no s'hi van observar vesícules d'acumulació a les cèl·lules glials perineuronals. De la mateixa manera, quan es va analitzar l'acumulació lisosòmica al cerebel, es va comprovar que les cèl·lules de Purkinje dels ratolins MPSIIIB no tractats d'ambdós sexes també presentaven vesícules poc electrodenses de mida i nombre augmentat respecte a les mateixes cèl·lules d'animals WT (Figura 29, panells de cerebel). El tractament amb el vector viral AAV9-mNAGLU no va revertir totalment el fenotip en el grup de femelles, ja que algunes cèl·lules de Purkinje seguien presentant petites vesícules d'acumulació, tot i que comparativament amb les vesícules presents en els ratolins MPSIIIB no tractats, les vesícules havien reduït significativament el seu contingut (Figura 29, panells de cerebel de femelles).





**Figura 29. Anàlisi del cervell per Microscòpia Electrònica de Transmissió.** Imatges representatives de còrtex cerebral i cerebel de ratolins WT, MPSIIIB no tractats i MPSIIIB-NAGLU on s'hi observa una normalització del contingut en vesícules d'acumulació de material poc electrodens (fletxes vermelles) a les cèl·lules glials perineuronals després de 3 mesos de tractament amb el vector viral AAV9-mNAGLU. Al cerebel, la correcció del contingut en vesícules d'acumulació va ser parcial en el grup de femelles tractades. Magnificacions originals 5000x pel còrtex cerebral i 6000x pel cerebel (1: Neurona; 2: Cèl·lula glial perineuronal; 3: Cèl·lula de Purkinje).

Per tal de valorar l'efecte macroscòpic de l'acumulació progressiva de GAGs al cervell, es va mesurar també el pes d'aquest òrgan en ratolins de 5 mesos d'edat. Es va poder comprovar que els ratolins MPSIIIB no tractats o MPSIIIB administrats amb el vector Nul presentaven un pes de cervell significativament més elevat que els ratolins WT de la mateixa edat (Figura 30). Per conta, el tractament intracisterna amb el vector viral AAV9-mNAGLU va aconseguir corregir el pes d'aquest òrgan en el grup de ratolins MPSIIIB administrats amb aquest vector. De tota manera, la disminució únicament va ser estadísticament significativa en el grup de mascles, mentre que en el grup de femelles també s'hi va observar una disminució de pes, tot i que no amb significança estadística (Figura 30).



**Figura 30. Correcció del pes del cervell.** El pes total del cervell es va mesurar en ratolins WT, MPSIIIB, MPSIIIB-Nul i MPSIIIB-NAGLU d'ambdós sexes. Únicament en ratolins MPSIIIB mascles tractats amb AAV9-mNAGLU es va observar una disminució significativa del pes total del cervell; en el cas de les femelles, la disminució no va mostrar significança estadística. Les dades que es mostren corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM de 6-19 animals per grup. A les gràfiques s'hi mostra l'interval de variació estàndard de la mitjana (en negre) i la mitjana (en vermell) per a cadascun dels grups. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs. MPSIIIB-Nul; ns: no significatiu.

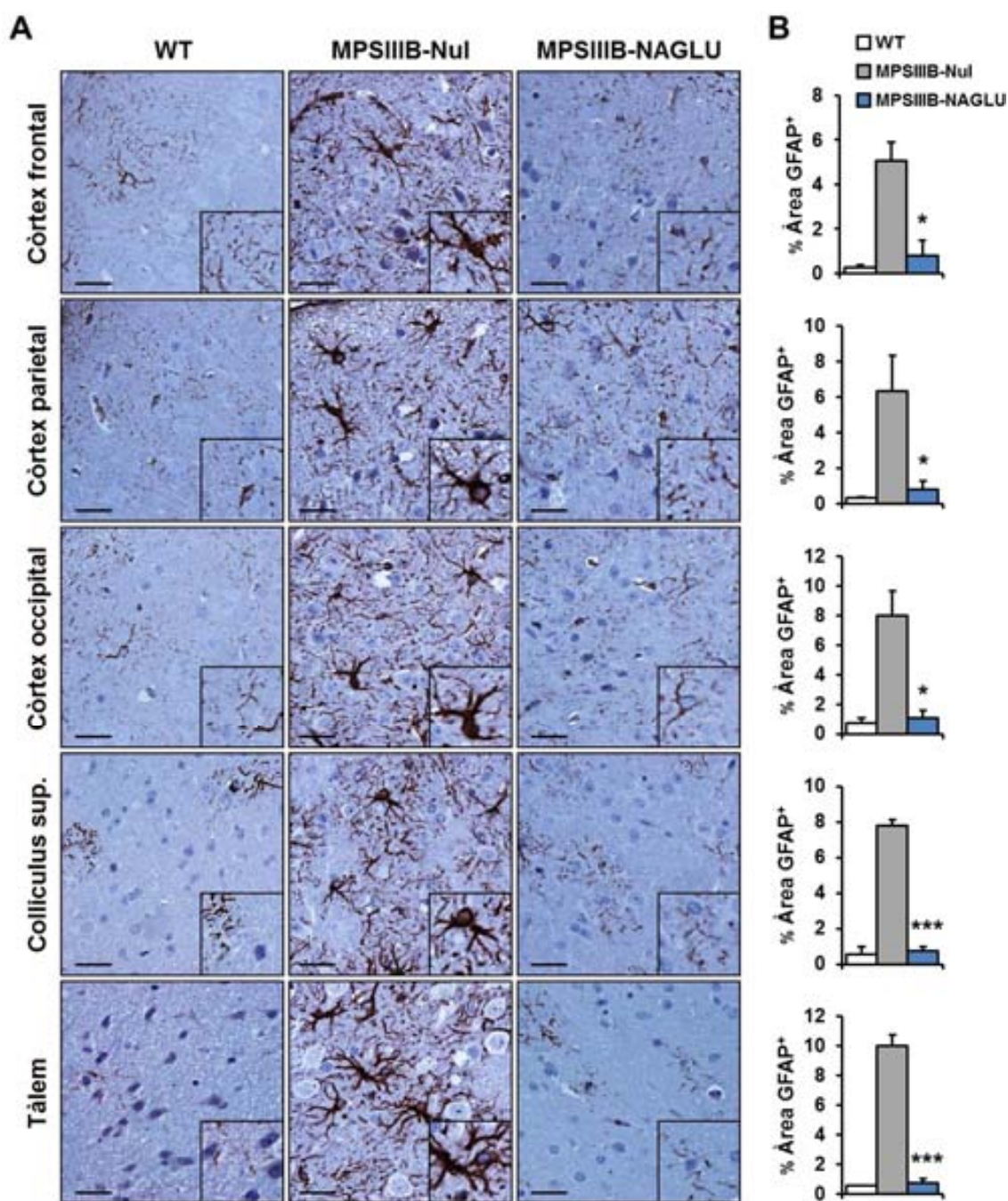
Aquesta observació està d'acord amb els resultats observats per mitjà de MET, en els quals les cèl·lules de Purkinje de les femelles no presentaven una correcció del 100% en l'acumulació de GAGs. Així, aquest fet podria suggerir que el tractament amb AAV9-mNAGLU en ratolins MPSIIIB femelles durant 3 mesos no és suficient i que requereix d'un major període de temps per donar lloc a una correcció total de l'acumulació de GAGs.

### **3.2. Correcció de la neuroinflamació**

Per tal d'avaluar l'efecte sobre el procés neuroinflamatori del tractament intracisterna magna amb el vector viral AAV9-mNAGLU, es van analitzar en paral·lel cervells de ratolins MPSIIIB d'ambdós sexes administrats amb el vector terapèutic o el vector Nul, 3 mesos després de l'administració viral. Es va dur a terme una anàlisi immunohistoquímica de seccions de teixit cerebral de diverses àrees del cervell utilitzant marcatges específics per a la proteïna GFAP i la lectina Bsi-B4, marcadors d'astròcits i micròglia activada, respectivament. La tinció per a GFAP va mostrar la correcció de l'astrocitosi en els cervells d'aquells ratolins MPSIIIB tractats amb el vector AAV9-mNAGLU respecte dels tractats amb vector Nul (Figures 31A i 32A). De manera similar, el marcatge amb la lectina Bsi-B4 va permetre observar l'absència de cèl·lules de la micròglia activades en els cervells de ratolins MPSIIIB mascles i femelles tractats amb el vector viral AAV9-mNAGLU (Figures 33A i 34A).

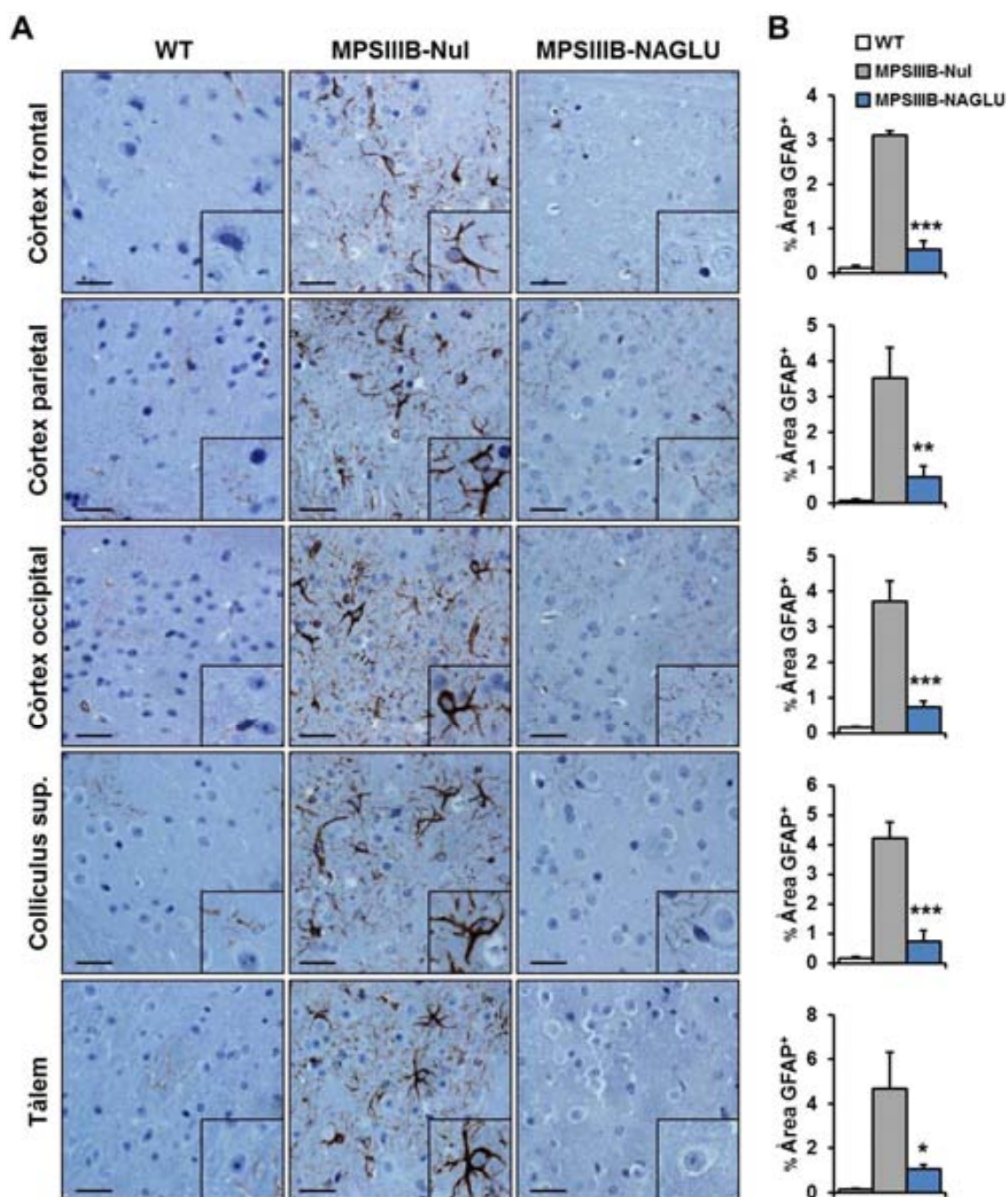
En tots els casos es va quantificar la senyal positiva tant per a GFAP com per a Bsi-B4 en totes les àrees del cervell analitzades, mostrant una clara correcció del fenotip neuroinflamatori en aquells cervells de ratolins MPSIIIB tractats amb el vector viral terapèutic, fent-los indistingibles dels cervells de ratolins WT (Figures 31B, 32B, 33B i 34B). La quantificació de l'àrea GFAP positiva va permetre observar una major astrocitosi en el grup de ratolins mascles MPSIIIB-Nul en comparació amb les femelles, fet que suggereix una major activació astrocitària en ratolins malalts mascles (Figures 31B i 32B).

Per tant, l'administració intracisterna magna del vector viral AAV9-mNAGLU va donar lloc també a la correcció de la neuroinflamació.

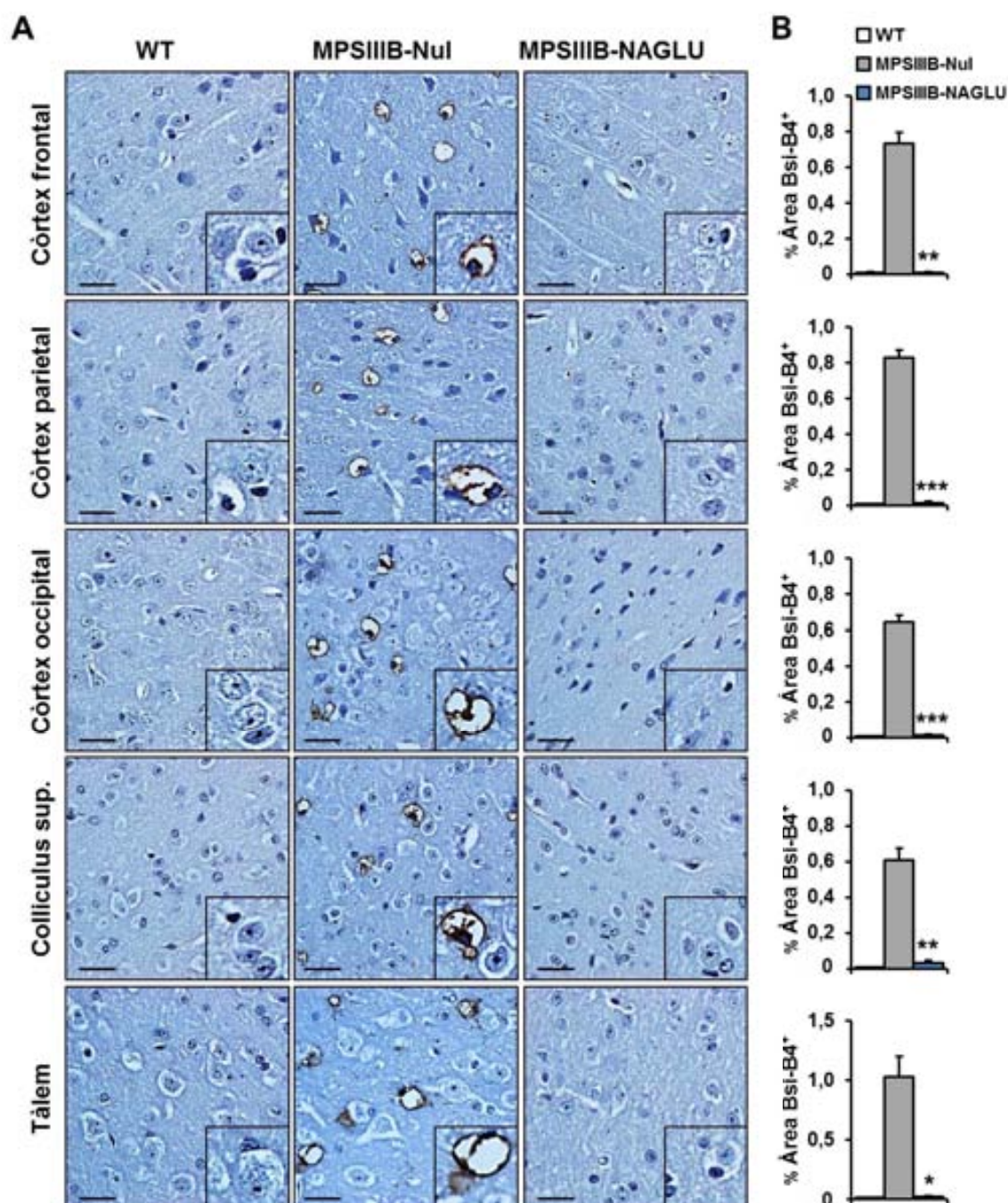


**Figura 31. Correcció de l'astrocitosi al cervell de ratolins MPSIIIB mascles. (A)** Imatges representatives del marcatge per a GFAP en diferents zones del cervell. **(B)** La normalització del marcatge en ratolins MPSIIIB tractats amb el vector viral terapèutic, indicatiu de l'absència d'astrocitosi, es va observar en totes les zones de cervell analitzades de mascles MPSIIIB 3 mesos després d'haver rebut una única injecció intracisterna amb el vector AAV9-mNAGLU. Els resultats que es mostren als gràfics corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM de 2-3 animals per grup. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. MPSIIIB-Nul; la barra d'escala indica 25  $\mu$ m.



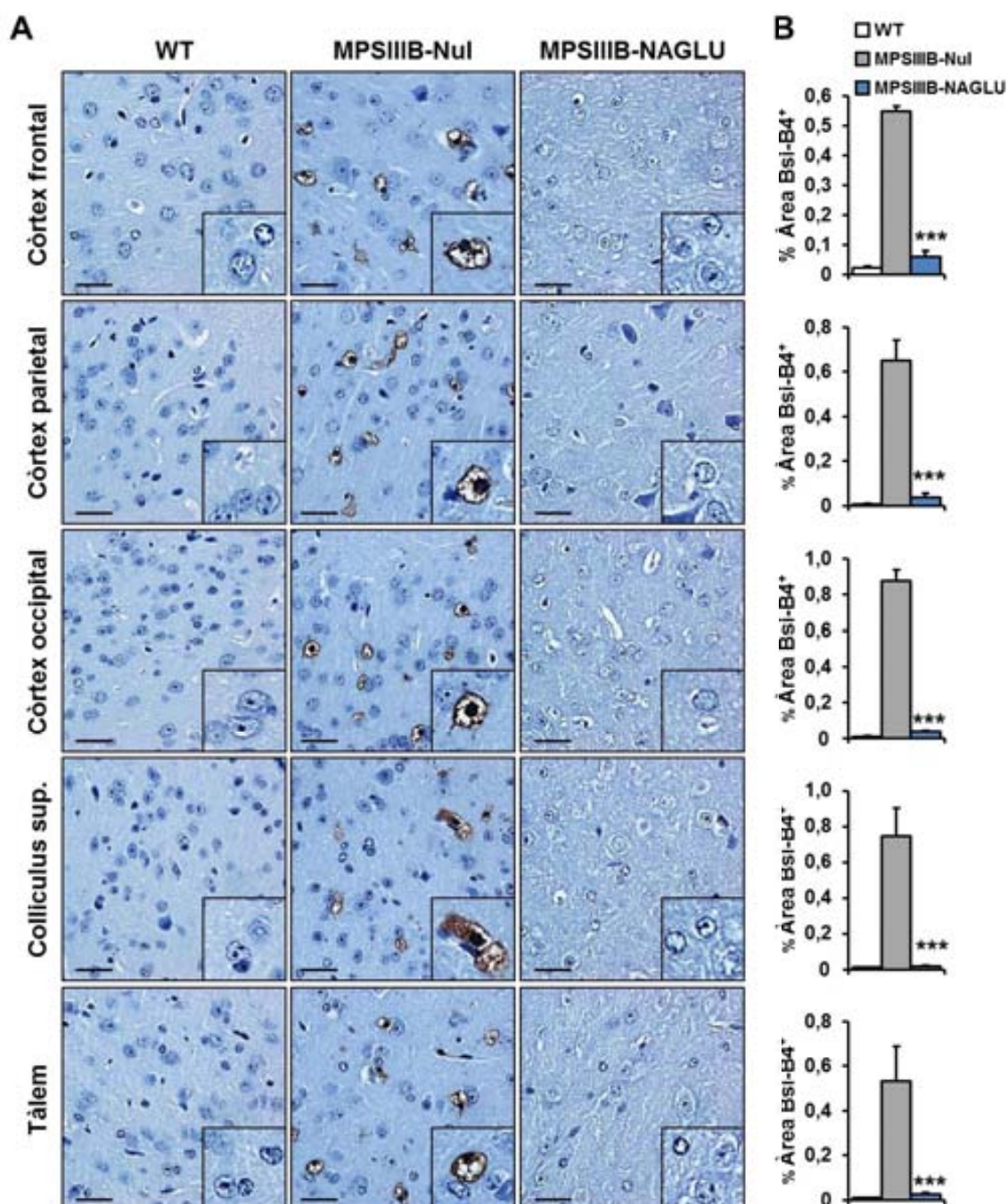


**Figura 32. Correcció de l'astrocitosi al cervell de ratolins MPSIIIB femelles.** (A) Imatges representatives del marcatge per a GFAP en diferents zones del cervell. (B) La normalització del marcatge en ratolins MPSIIIB tractats amb el vector viral terapèutic, indicatiu de l'absència d'astrocitosi, es va observar en totes les zones de cervell analitzades de femelles MPSIIIB 3 mesos després d'haver rebut una única injecció intracisterna amb el vector AAV9-mNAGLU. Els resultats que es mostren als gràfics corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM de 2-3 animals per grup. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. MPSIIIB-Nul; la barra d'escala indica 25  $\mu\text{m}$ .



**Figura 33. Correcció de la microgliosi al cervell de ratolins MPSIIIB mascles. (A)** Imatges representatives del marcatge per a Bsi-B4 en diferents zones del cervell. **(B)** La normalització del marcatge en ratolins MPSIIIB tractats amb el vector viral terapèutic, indicatiu de l'absència de microglia activada, es va observar en totes les zones de cervell analitzades de mascles MPSIIIB 3 mesos després d'haver rebut una única injecció intracisterna amb el vector AAV9-mNAGLU. Els resultats que es mostren als gràfics corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM de 2-3 animals per grup. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. MPSIIIB-Nul; la barra d'escala indica 25  $\mu$ m.





**Figura 34. Correcció de la microgliosi al cervell de ratolins MPSIIIB femelles. (A)** Imatges representatives del marcatge per a Bsi-B4 en diferents zones del cervell. **(B)** La normalització del marcatge en ratolins MPSIIIB tractats amb el vector viral terapèutic, indicatiu de l'absència de microglia activada, es va observar en totes les zones de cervell analitzades de femelles MPSIIIB 3 mesos després d'haver rebut una única injecció intracisterna amb el vector AAV9-mNAGLU. Els resultats que es mostren als gràfics corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM de 2-3 animals per grup. \*\*\* $p < 0,001$  vs. MPSIIIB-Nul; la barra d'escala indica 25  $\mu$ m.

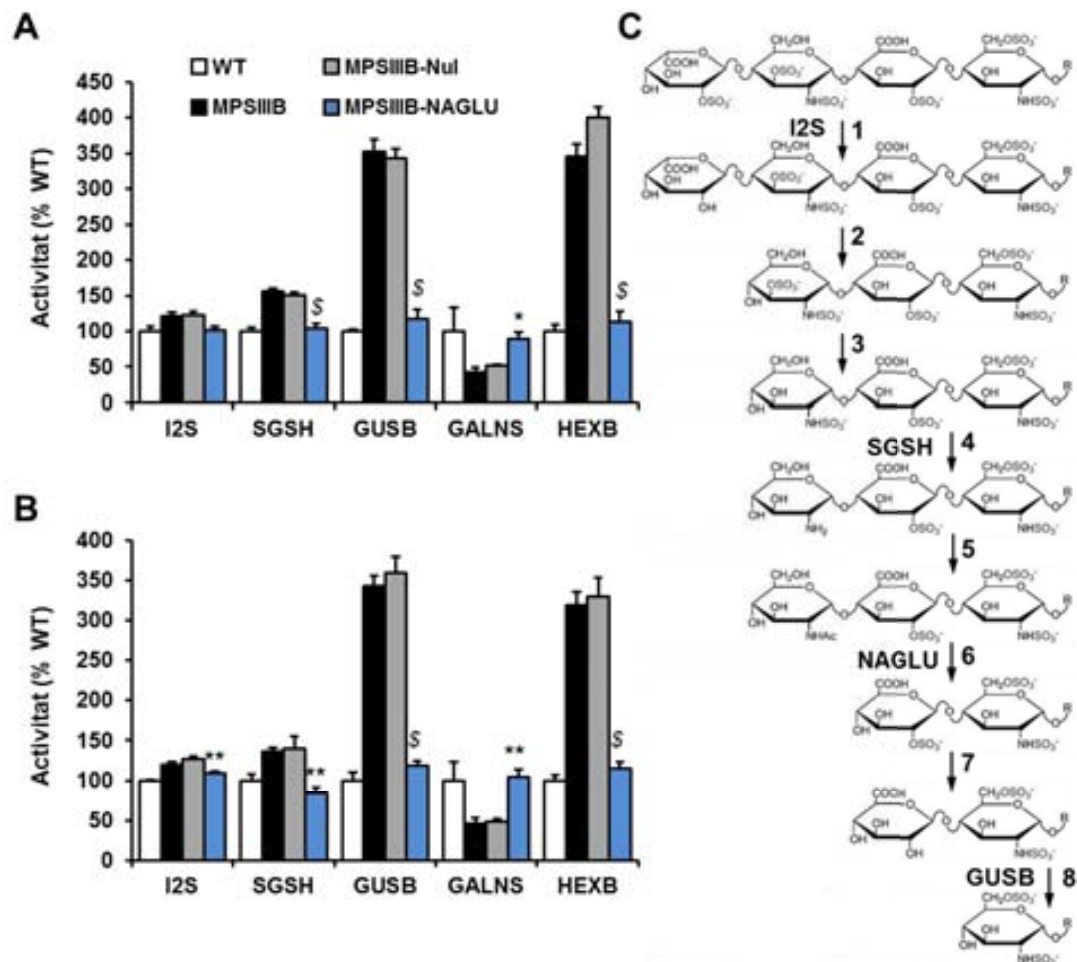
### 3.3. Normalització de l'activitat enzimàtica d'altres enzims lisosòmics

Com a alteració secundària a la pèrdua de funció de l'enzim NAGLU i a l'acumulació patològica de HS, es dona lloc a una disfunció lisosòmica que té com a conseqüència una alteració en l'homeòstasi d'aquests orgànuls. Així, altres enzims lisosòmics veuen alterada la seva expressió per tal de compensar la progressiva acumulació del HS. No exclusivament enzims implicats en la via de degradació d'aquest GAG, sinó que enzims lisosòmics de degradació d'altres macromolècules veuen també alterada la seva expressió com a mecanisme de compensació per tal de contrarestar l'alteració en l'homeòstasi lisosòmica. Conseqüentment, el ratolí MPSIIIB mostra sobreexpressió d'alguns d'aquests enzims tant al cervell com al fetge (Li, 1999).

En aquest sentit, es van mesurar les activitats enzimàtiques d'altres enzims lisosòmics per valorar la capacitat del tractament amb el vector AAV9-mNAGLU per restaurar l'homeòstasi lisosòmica al cervell dels ratolins MPSIIIB. La determinació d'activitat enzimàtica en extractes de cervell de ratolins WT, MPSIIIB, MPSIIIB-Nul i MPSIIIB-NAGLU d'ambdós sexes va permetre observar que el tractament amb AAV9-mNAGLU era capaç de corregir totes les activitats enzimàtiques alterades en els ratolins MPSIIIB i MPSIIIB-Nul, i mantenir-les en valors indistingibles dels observats en ratolins WT (Figura 35). La normalització es va donar tant en les activitats enzimàtiques d'enzims pertanyents a la via de degradació del HS (Iduronat-2-sulfatasa, Sulfamidasa,  $\beta$ -glucuronidasa) com d'enzims implicats en la degradació d'altres compostos, tals com la  $\beta$ -hexosaminidasa (implicada en la via de degradació del gangliòsid GM2) o la Galactosamina-6-sulfatasa (implicada en la via de degradació del Keratan i del Condroitin sulfat) (Figura 35).

Aquesta correcció, també observada a nivell de l'activitat de diferents enzims lisosòmics, corrobora el fet que l'estratègia terapèutica consistent en l'administració directa al LCR del vector viral AAV9-mNAGLU no únicament corregeix l'acumulació patològica de GAGs, sinó que també és la responsable de restaurar l'homeòstasi lisosòmica normalitzant les activitats enzimàtiques alterades al cervell de ratolins MPSIIIB-Nul.





**Figura 35. Correcció de les activitats enzimàtiques lisosòmiques alterades al cervell. (A,B)** Mesura d'activitats enzimàtiques dels enzims lisosòmics Idronat-2-sulfatasa (I2S), Sulfamidasa (SGSH), Galactosamina-6-sulfatasa (GALNS),  $\beta$ -glucuronidasa (GUSB) i  $\beta$ -hexosaminidasa (HEXB) en extractes de cervell de ratolins WT, MPSIIIB, MPSIIIB-Nul i MPSIIIB-NAGLU mascles i femelles. La correcció de la majoria d'activitats enzimàtiques lisosòmiques al cervell de ratolins MPSIIIB tractats amb el vector AAV9-mNAGLU va indicar la restauració de l'homeòstasi lisosòmica en aquest òrgan. **(C)** Via de degradació del HS. Els resultats que es mostren als gràfics corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM de 3-4 animals per grup. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \$ $p < 0,001$  vs. MPSIIIB-Nul.

### 3.4. Avaluació del tractament amb el vector viral AAV9-mNAGLU sobre el perfil d'expressió gènica

A nivell d'expressió gènica al cervell, el ratolí MPSIIIB ha estat un dels models murins de LSDs més estudiats. Al cervell de ratolins MPSIIIB de 6 a 7 mesos d'edat s'hi ha observat un augment d'expressió de gens característics de cèl·lules de la micròglia (Ohmi, 2003; Parente, 2012), gens relacionats amb immunitat (innata i cel·lular) i inflamació (DiRosario, 2009; Parente, 2012), gens d'estrès oxidatiu (Villani, 2007; Villani, 2009) i gens estretament lligats amb neurodegeneració (Naughton,

2013). La inflamació del cervell juntament amb l'activació de cèl·lules de la micròglia i la producció de citoquines pro-inflamatòries també s'ha descrit en d'altres malalties molt divergents entre elles (Wu i Proia, 2004; Kadiu, 2005), suggerint el paper clau que juguen aquests processos en el desenvolupament de la neuroinflamació i la neurodegeneració (Villani, 2007).

L'expressió gènica no només s'ha trobat alterada a nivell del SNC del ratolí MPSIIIB, sinó que també a nivell circulant, on s'han identificat possibles biomarcadors sanguinis del procés de neurodegeneració característic d'aquest model animal (Naughton, 2013).

Per tant, amb la finalitat d'avaluar els efectes de l'administració intracisterna magna del vector viral AAV9-mNAGLU en ratolins MPSIIIB a nivell d'expressió gènica, es va dur a terme un estudi de l'expressió gènica diferencial en cervells de ratolins WT i MPSIIIB administrats intracisterna magna amb els vectors virals AAV9-Nul i AAV9-mNAGLU. Per aquesta finalitat, es van obtenir encèfals de ratolins WT, MPSIIIB-Nul i MPSIIIB-NAGLU de 5 mesos d'edat (3 mesos post-administració intracisterna) dels quals se'n va extreure i purificar el mRNA, que posteriorment va ser hibridat amb els microxips d'expressió *MoGene 2.1* (Affymetrix®), basats en la detecció tant de mRNA com de transcrits intergènics de RNA no codificants (lincRNA: *long intergenic non-coding RNA*).

Es van identificar un total de 94 gens diferencialment expressats al cervell de ratolins MPSIIIB-Nul respecte dels ratolins WT, dels quals 4 van presentar una expressió comparativament disminuïda, mentre que la resta (90 gens) es trobaven sobreexpressats. La majoria dels gens amb expressió alterada en els ratolins MPSIIIB-Nul van mostrar correcció en els cervells dels ratolins MPSIIIB tractats amb el vector viral AAV9-mNAGLU (Figura 36, Taula 7).

Dels 94 gens identificats, una gran proporció (~50%) es van agrupar com a gens marcadors i característics de macròfags i cèl·lules de la micròglia (Taula 7). Un segon grup amb expressió alterada va agrupar gens participants en la resposta immunitària, principalment implicats en inflamació i en processos d'immunitat innata (Taula 7). El tractament intracisterna amb AAV9-mNAGLU va donar lloc a la normalització de l'expressió de la majoria d'ells, fet que estava d'acord amb les observacions realitzades amb les anàlisis immunohistoquímiques que valoraven la neuroinflamació (Figures 33 i 34).

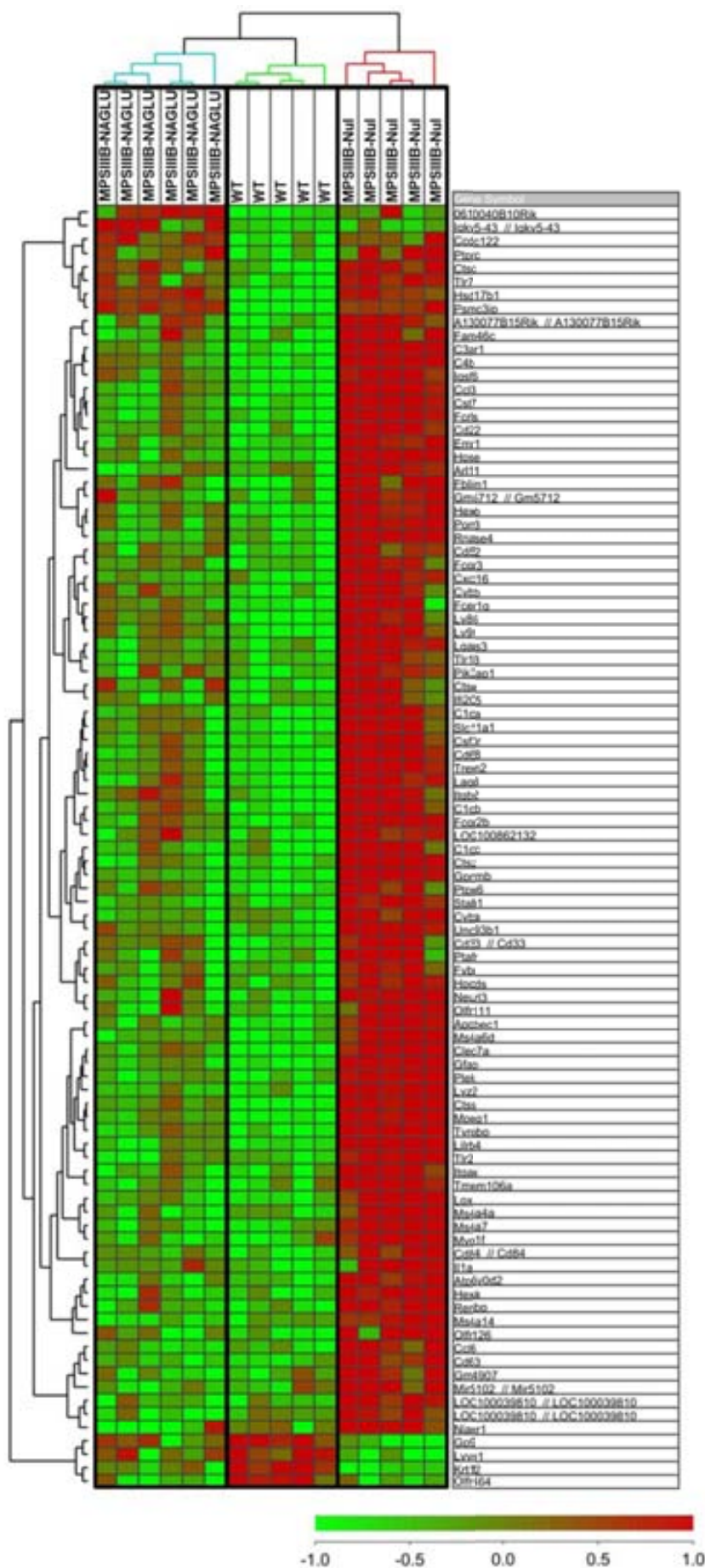


Figura 36. Efecte del tractament intracisterna sobre l'expressió gènica. Perfil d'expressió gènica per a cadascuna de les condicions (WT, MPSIIIB-Nul, MPSIIIB-NAGLU). El tractament amb el vector AAV9-mNAGLU va mostrar un elevat nivell de correcció de l'expressió gènica. Els tons vermells indiquen sobreexpressió; els tons verds indiquen expressió disminuïda.

Taula 7. Expressió gènica diferencial al cervell

Gen	Nom	Fold-change (vs. WT)		ANOVA p-valor
		MPSIIIB- Nul	MPSIIIB- NAGLU	
<b>Immunitat innata</b>				
<i>Clec7a</i>	<i>C-type lectin domain family 7, member a</i>	7,9	2,0	<1,0E-07
<b>Ccl3</b>	<b>Chemokine (C-C motif) ligand 3</b>	5,0	1,7	1,0E-07
<b>C4b</b>	<b>Complement component 4b</b>	3,0	1,6	1,0E-07
<i>Ms4a7</i>	<i>Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7</i>	2,6	1,0	5,1E-06
<i>C3ar1</i>	<i>Complement component 3a receptor 1</i>	2,6	1,4	<1,0E-07
<i>Igsf6</i>	<i>Immunoglobulin superfamily, member 6</i>	2,5	1,5	3,0E-07
<b>C1qa</b>	<b>Complement component 1q, alpha polypeptide</b>	2,0	1,2	6,4E-06
<b>C1qb</b>	<b>Complement component 1q, beta polypeptide</b>	1,9	1,3	2,8E-06
<i>Il1a</i>	<i>Interleukin 1 alpha</i>	1,9	1,3	7,0E-04
<b>C1qc</b>	<b>Complement component 1q, C chain</b>	1,8	1,1	4,2E-05
<i>Myo1f</i>	<i>Myosin IF</i>	1,7	1,0	2,5E-05
<i>Tlr13</i>	<i>Toll-like receptor 13</i>	1,7	1,1	3,6E-04
<i>Tlr7</i>	<i>Toll-like receptor 7</i>	1,7	1,4	1,4E-04
<i>Ptpn6</i>	<i>Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6</i>	1,6	1,2	2,6E-04
<b>Tlr2</b>	<b>Toll-like receptor 2</b>	1,5	1,0	1,2E-05
<b>Marcadors de macròfags i de cèl·lules de la micròglia</b>				
<i>Mpeg1</i>	<i>Macrophage expressed gene 1</i>	3,7	1,5	<1,0E-07
<i>GpnmB</i>	<i>Glycoprotein (transmembrane) nmb</i>	3,6	1,2	<1,0E-07
<b>Cd68</b>	<b>CD68 antigen</b>	3,3	1,3	1,0E-07
<i>Cd84</i>	<i>CD84 antigen</i>	2,4	1,3	6,5E-06
<i>Lgals3</i>	<i>Lectin, galactose binding, soluble 3</i>	2,1	1,1	9,2E-06
<i>Cd52</i>	<i>CD52 antigen</i>	1,9	1,3	2,2E-04
<i>Itgax</i>	<i>Integrin alpha X</i>	1,8	1,1	3,0E-05
<i>Cd33</i>	<i>CD33 antigen</i>	1,8	1,3	5,8E-04
<i>Ccl6</i>	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 6</i>	1,7	1,0	3,8E-05
<i>Itgb2</i>	<i>Integrin beta 2</i>	1,7	1,3	7,5E-04
<i>Ptpn6</i>	<i>Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6</i>	1,6	1,2	2,6E-04
<i>Fcgr3</i>	<i>Fc receptor, IgG, low affinity III</i>	1,6	1,2	4,3E-04
<i>Ly86</i>	<i>Lymphocyte antigen 86</i>	1,6	1,3	6,8E-05
<i>Stab1</i>	<i>Stabilin 1</i>	1,5	1,0	8,3E-06
<i>Cd63</i>	<i>CD63 antigen</i>	1,5	1,0	4,3E-05
<b>Estrès oxidatiu</b>				
<i>Cybb</i>	<i>Cytochrome b-245, beta polypeptide</i>	2,8	1,6	1,3E-04
<i>Csf3r</i>	<i>Csf3r protein</i>	1,9	1,2	5,3E-06
<i>Cyba</i>	<i>Cytochrome b-245, alpha polypeptide</i>	1,6	1,0	8,9E-05
<i>Pon3</i>	<i>Paraoxonase 3</i>	1,6	1,1	2,7E-05
<b>Enzims/proteïnes lisosomals</b>				
<i>Atp6v0d2</i>	<i>ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit D2</i>	2,4	1,1	1,2E-06
<b>Ctss</b>	<b>Cathepsin S</b>	2,3	1,4	<1,0E-07
<b>Ctse</b>	<b>Cathepsin E</b>	1,8	1,3	7,1E-04
<b>Ctsz</b>	<b>Cathepsin Z</b>	1,8	1,1	8,0E-07
<i>Slc11a1</i>	<i>Solute carrier family 11, member 1</i>	1,7	1,2	2,1E-05
<b>Ctsc</b>	<b>Cathepsin C</b>	1,7	1,4	4,2E-05
<i>Hexb</i>	<i>Hexosaminidase B</i>	1,6	1,2	5,0E-06
<i>Hexa</i>	<i>Hexosaminidase A</i>	1,5	1,0	3,9E-05
<b>Altres</b>				
<i>Hpse</i>	<i>Heparanase</i>	3,7	1,4	1,0E-07
<b>Gfap</b>	<b>Glial fibrillary acidic protein</b>	2,2	1,2	<1,0E-07
<i>Cd22</i>	<i>CD22 antigen; hypothetical protein LOC100047973</i>	2,6	1,4	6,0E-07

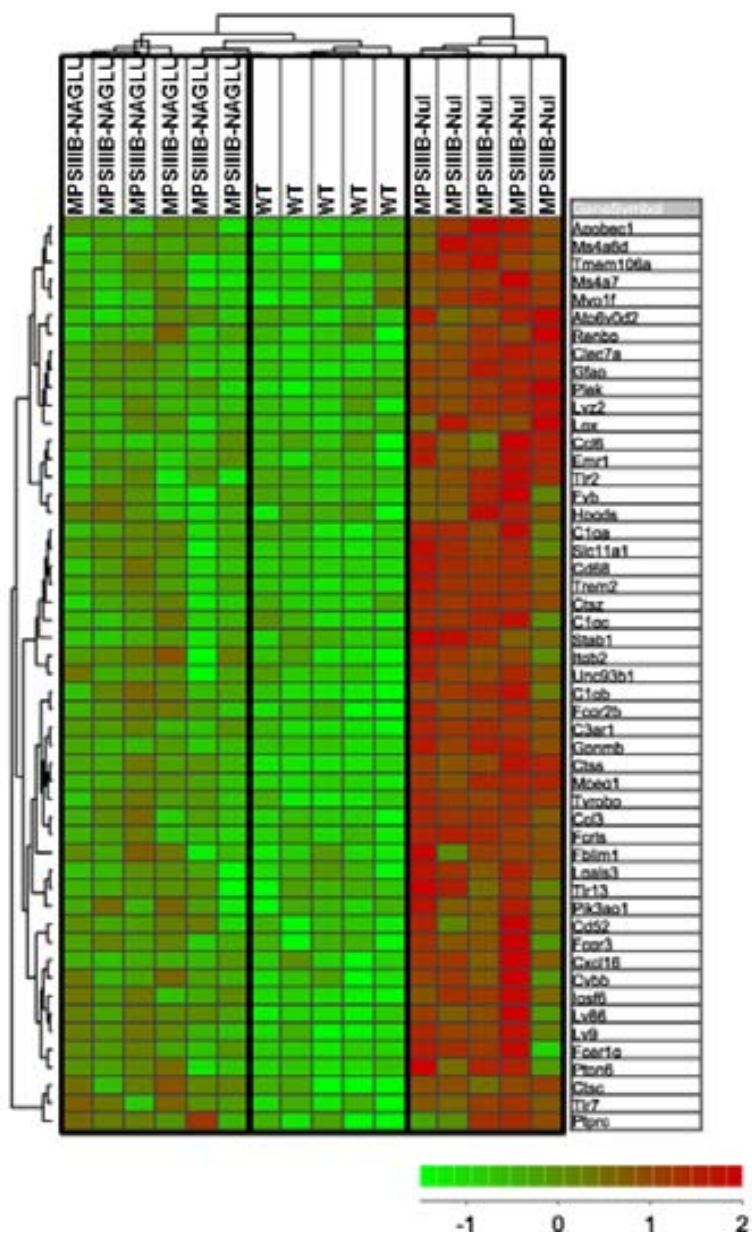
Relació dels principals gens expressats diferencialment al cervell de ratolins MPSIIIB-Nul de 5 mesos d'edat. L'expressió de la majoria d'ells es va veure corregida/disminuïda al cervell de ratolins MPSIIIB després de 3 mesos de tractament amb el vector viral AAV9-mNAGLU. L'expressió dels gens en negreta també s'ha vist alterada en altres estudis realitzats en el mateix model animal. *Fold-change* indica l'expressió relativa, prenent el valor 1 com a valor normal d'expressió gènica en WT.

A banda de la neuroinflamació, l'estrès oxidatiu també ha demostrat tenir un paper rellevant en el transcurs de la patologia cerebral del ratolí MPSIIIB (Villani, 2007). En aquest sentit, al cervell de ratolins MPSIIIB-Nul també es va veure alterada l'expressió d'un tercer grup de gens implicats en estrès oxidatiu, la qual es va veure disminuïda amb el tractament amb el vector viral terapèutic (Taula 7).

Un quart grup de gens amb expressió alterada va ser el de determinats enzims lisosomals, tots ells amb expressió augmentada en cervells de ratolins MPSIIIB-Nul, i corregida després del tractament amb el vector viral terapèutic. Cal destacar en aquest grup l'augment d'expressió del gen codificant per la  $\beta$ -hexosaminidasa, enzim del qual ja se n'havia mesurat un increment d'activitat al cervell de ratolins MPSIIIB-Nul (Figura 35). En ambdós casos, el tractament amb AAV9-mNAGLU va donar lloc tant a la correcció de l'expressió gènica (Taula 7) com de l'activitat enzimàtica (Figura 35).

D'entre tots els gens identificats, una petita part d'ells (mostrats en negreta a la Taula 7) ja havien estat prèviament identificats en d'altres treballs basats en l'estudi de l'expressió gènica al cervell del ratolí MPSIIIB, i en models murins d'altres LSDs com la MPSI i la MPSVII (Ohmi, 2003; Villani, 2007; DiRosario, 2009; Parente, 2012). De la mateixa manera, el paper clau de la immunitat innata i de les cèl·lules de la micròglia ja havia estat prèviament descrita en aquests mateixos estudis.

El nombre significatiu de gens diferencialment expressats marcadors de cèl·lules de la micròglia i/o macròfags, va posar de manifest el paper clau d'aquest tipus cel·lular en la patologia del SNC de la MPSIIIB, com ja havien suggerit prèviament altres autors (Ohmi, 2003; DiRosario, 2009). Degut a la rellevància d'aquest tipus cel·lular en la patologia neurològica, també es va dur a terme una anàlisi d'expressió gènica addicional basat en l'enriquiment per tipus cel·lular (*Cell Type Enrichment Analysis, CTen*) (Shoemaker, 2012). Aquesta anàlisi permet identificar els tipus cel·lulars enriquits, a partir dels gens diferencialment expressats en un microxip. D'aquesta manera, i d'acord amb les dades prèviament observades, l'anàlisi *CTen* va permetre elaborar un *heatmap* d'expressió dels gens relacionats amb la micròglia en ratolins WT, MPSIIIB-Nul i MPSIIIB-NAGLU. Tots els gens sobreexpressats al cervell de ratolins MPSIIIB-Nul van veure normalitzada la seva expressió al cervell de ratolins tractats amb el vector viral AAV9-mNAGLU (Figura 37), confirmant novament l'efecte terapèutic de l'administració intracisterna del vector terapèutic.



**Figura 37. Expressió gènica de gens relacionats amb macròfags i micròglia.** Perfil d'expressió de gens marcadors de micròglia i macròfags. A la figura s'hi mostren tots els gens específics de micròglia i macròfags amb expressió diferencial en cervells de ratolins MPSIIIB-Nul respecte dels WT. La majoria d'aquests gens veuen normalitzada la seva expressió després del tractament amb AAV9-mNAGLU. Els tons vermells indiquen sobreexpressió; els tons verds indiquen expressió disminuïda.

Per tant, l'estudi de l'efecte del tractament intracisterna amb el vector viral AAV9-mNAGLU sobre l'expressió gènica al cervell de ratolins MPSIIIB va permetre concloure que el tractament amb el vector terapèutic era també capaç de reduir i/o normalitzar l'expressió gènica alterada observada al cervell dels ratolins MPSIIIB-Nul.

## 4. EFECTE TERAPÈUTIC DE L'ADMINISTRACIÓ INTRACISTERNA MAGNA DEL VECTOR VIRAL AAV9-mNAGLU ALS TEIXITS SOMÀTICS

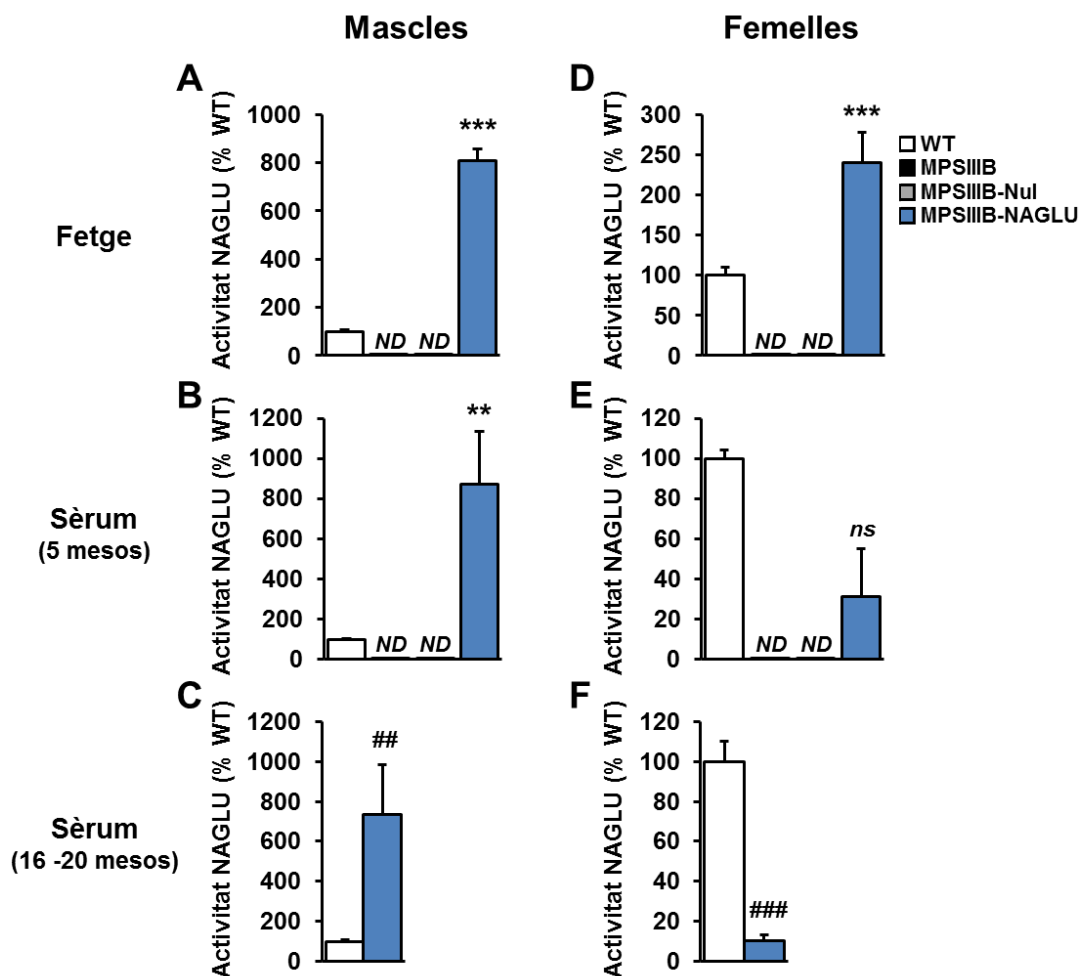
### 4.1. Restabliment de l'activitat NAGLU i correcció de la distensió lisosòmica

Amb la finalitat d'avaluar l'efecte del tractament intracisterna amb el vector viral AAV9-mNAGLU en ratolins MPSIIIB a nivell somàtic, es va mesurar l'activitat NAGLU hepàtica i circulant, i es va quantificar el contingut de GAGs de diferents òrgans i teixits de ratolins WT, MPSIIIB, MPSIIIB-Nul i MPSIIIB-NAGLU (Figura 38).

Després de 3 mesos de tractament, l'activitat NAGLU hepàtica i circulant assolida en ratolins MPSIIIB mascles tractats amb el vector viral AAV9-mNAGLU es va restaurar i fins i tot augmentar fins a 8 vegades respecte de l'activitat WT (Figura 38A-C). Aquests valors d'activitat NAGLU circulant es van mantenir constants al llarg de la vida dels ratolins, fins i tot en ratolins de 20 mesos d'edat (18 mesos després de rebre l'administració intracisterna del vector viral terapèutic) (Figura 38C). La correlació entre els valors d'activitat NAGLU hepàtica i circulant suggerien que el fetge podria ser la principal font d'enzim circulant, observació que concorda amb el fet que aquest és el principal òrgan transduït pel vector viral a nivell somàtic (Taula 6).

Al grup de femelles MPSIIIB tractades també es va veure incrementada l'activitat NAGLU hepàtica, tot i que l'augment no va ser tan significatiu com en el cas dels mascles, ja que va mostrar un augment d'aproximadament 2,5 vegades respecte dels ratolins WT (Figura 38D). Les diferències de gènere en l'eficàcia de transducció hepàtica en ratolins per vectors AAV estan d'acord amb estudis anteriors (Davidoff, 2003; Ruzo, 2012a; Ruzo, 2012b). Però contràriament als mascles, a nivell circulant l'activitat NAGLU en femelles tractades amb el vector AAV9-mNAGLU es va veure notablement reduïda, assolint valors d'aproximadament el 30% respecte de ratolins WT de la mateixa edat (Figura 38E), fet que està en concordança amb altres estudis similars observats al nostre laboratori amb femelles del model murí de la MPSIIIA (Haurigot, 2013). Tot i aquests nivells més baixos d'activitat presents als 5 mesos d'edat, en femelles MPSIIIB de 16 mesos (14 mesos després de l'administració intracisterna), l'activitat NAGLU circulant es mantenia en valors d'aproximadament el 10% respecte dels ratolins WT de la mateixa edat. En principi, aquests nivells d'activitat enzimàtica serien suficients com per donar lloc a un efecte terapèutic, ja que es troben per sobre del llindar d'activitat considerat com a terapèutic en les LSDs.



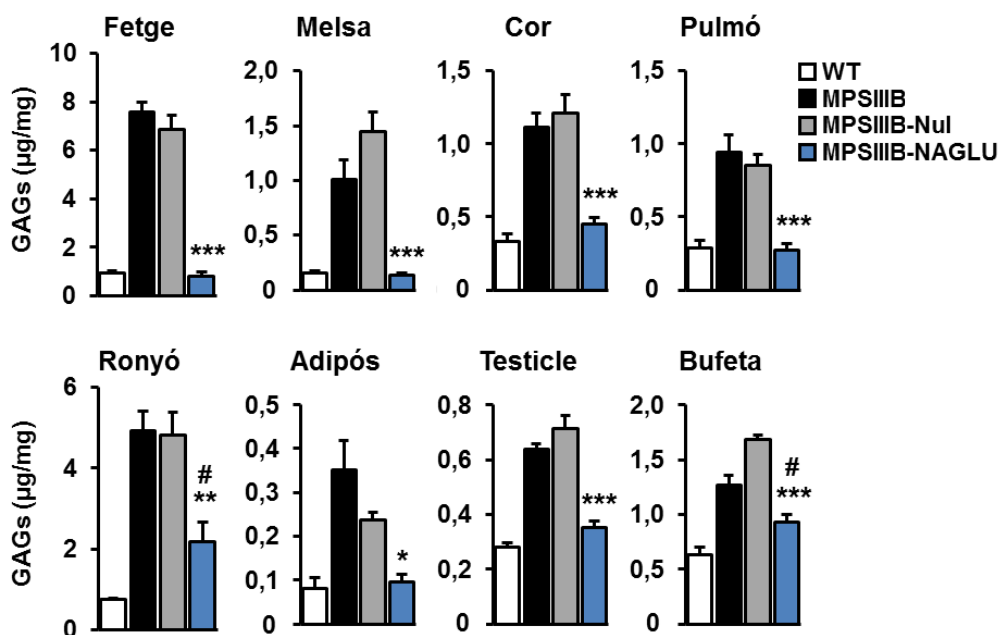


**Figura 38. Activitat NAGLU hepàtica i circulant.** Determinació d'activitat NAGLU hepàtica (A,D) i circulant (B,E) en ratolins de 5 mesos d'edat, i activitat NAGLU circulant en ratolins d'edat avançada (C,F). L'augment d'activitat NAGLU hepàtica i circulant en els ratolins mascles després de 3 mesos de tractament va ser de 8 vegades l'observada en WT, increment que es va mantenir estable al llarg de la vida dels animals. En les femelles tractades, l'augment hepàtic no va ser tan significatiu, mentre que a nivell circulant no es van assolir els valors observats en els WT. Nivells d'aproximadament el 10% d'activitat es van detectar en femelles d'edat avançada. Els resultats que es mostren corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM de 4-5 animals per grup. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. MPSIIIB-Nul; ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  vs. WT. ND: No detectable, ns: no significatiu.

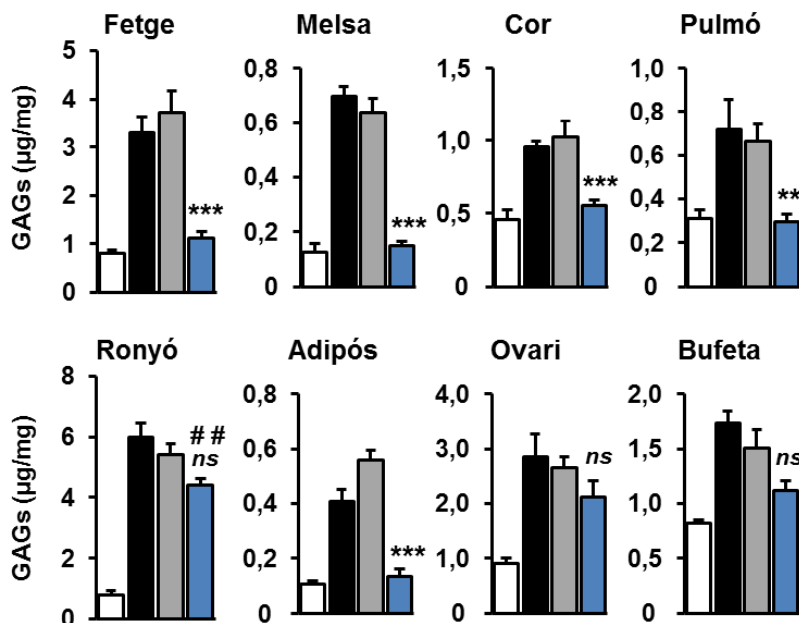
Així, en el grup de femelles MPSIIIB tractades amb el vector AAV9-mNAGLU, tot i no restablir-s'hi els valors d'activitat NAGLU circulant, el 30% d'activitat va ser suficient com per reduir i/o corregir l'acumulació patològica de GAGs en la majoria d'òrgans i teixits somàtics (Figura 39). Aquests resultats corroboren el fet que una única injecció viral al LCR seria suficient com per donar lloc a una expressió sostinguda en el temps de la proteïna deficitària a nivell circulant, permetent mantenir la malaltia controlada o disminuir-ne la progressió.



## Mascles



## Femelles

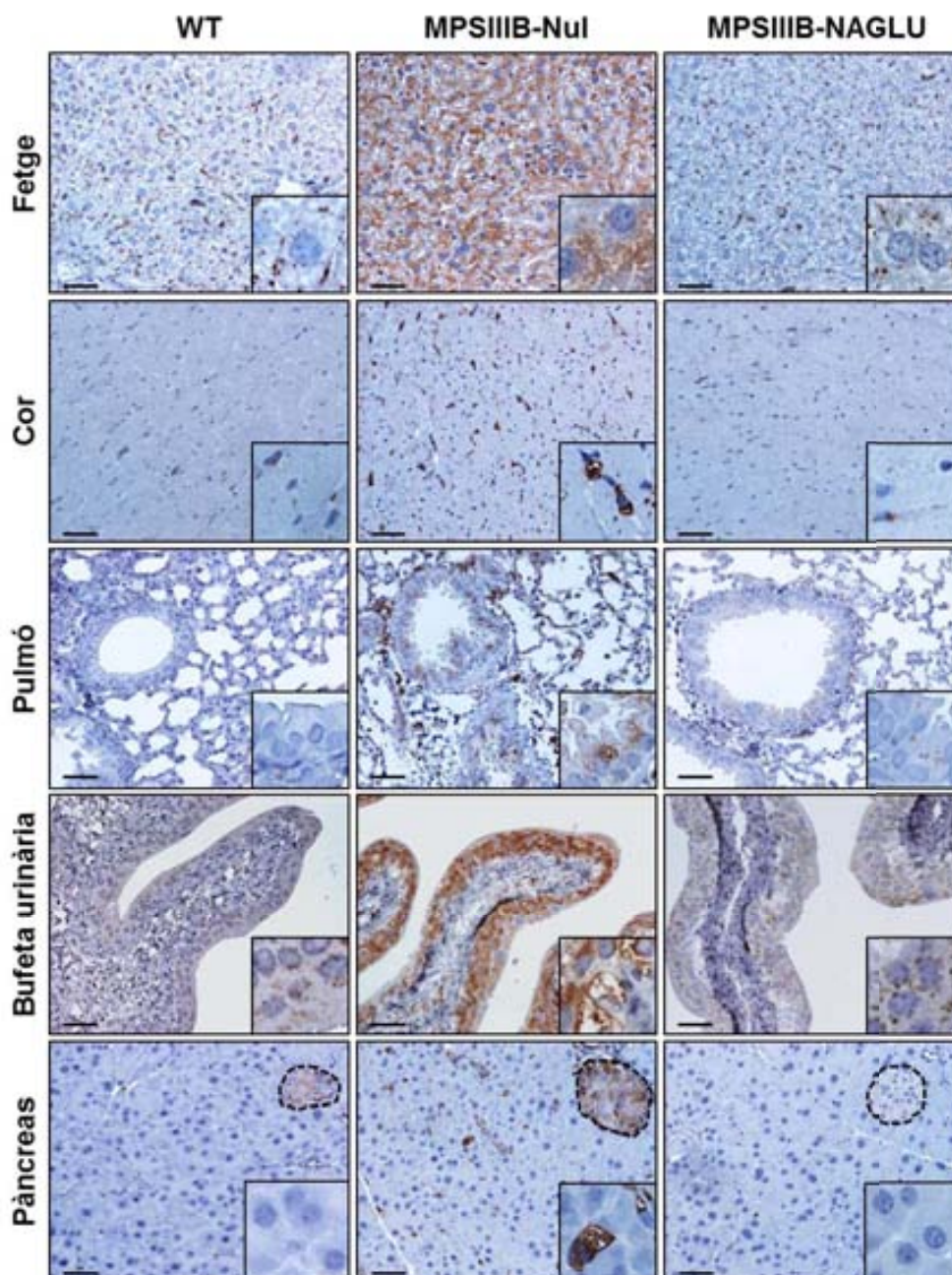


**Figura 39. Reducció en els nivells de GAGs en òrgans i teixits somàtics.** Quantificació del contingut de GAGs en òrgans i teixits somàtics de ratolins WT, MPSIIIB, MPSIIIB-Nul i MPSIIIB-NAGLU mascles i femelles de 5 mesos d'edat. La normalització en els nivells de GAGs es va donar en la majoria de teixits analitzats de ratolins MPSIIIB mascles i femelles després de 3 mesos de tractament amb el vector viral terapèutic. Els resultats que es mostren corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM de 5 animals per grup. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. MPSIIIB-Nul; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  vs. WT; ns: no significatiu.

En el grup dels mascles tractats amb el vector viral AAV9-mNAGLU, únicament al ronyó i a la bufeta urinària no s'hi va observar una correcció completa, tot i haver-hi una disminució significativa del nivell de GAGs. En aquest cas, el tractament intracisterna amb el vector viral AAV9-mNAGLU va donar lloc a una correcció parcial en el contingut de GAGs sense assolir els nivells de GAGs d'un ratolí WT. En la resta de teixits i òrgans analitzats, el contingut de GAGs es va veure corregit en els ratolins tractats amb el vector viral terapèutic, assolint nivells indistingibles dels observats en ratolins WT de la mateixa edat (Figura 39).

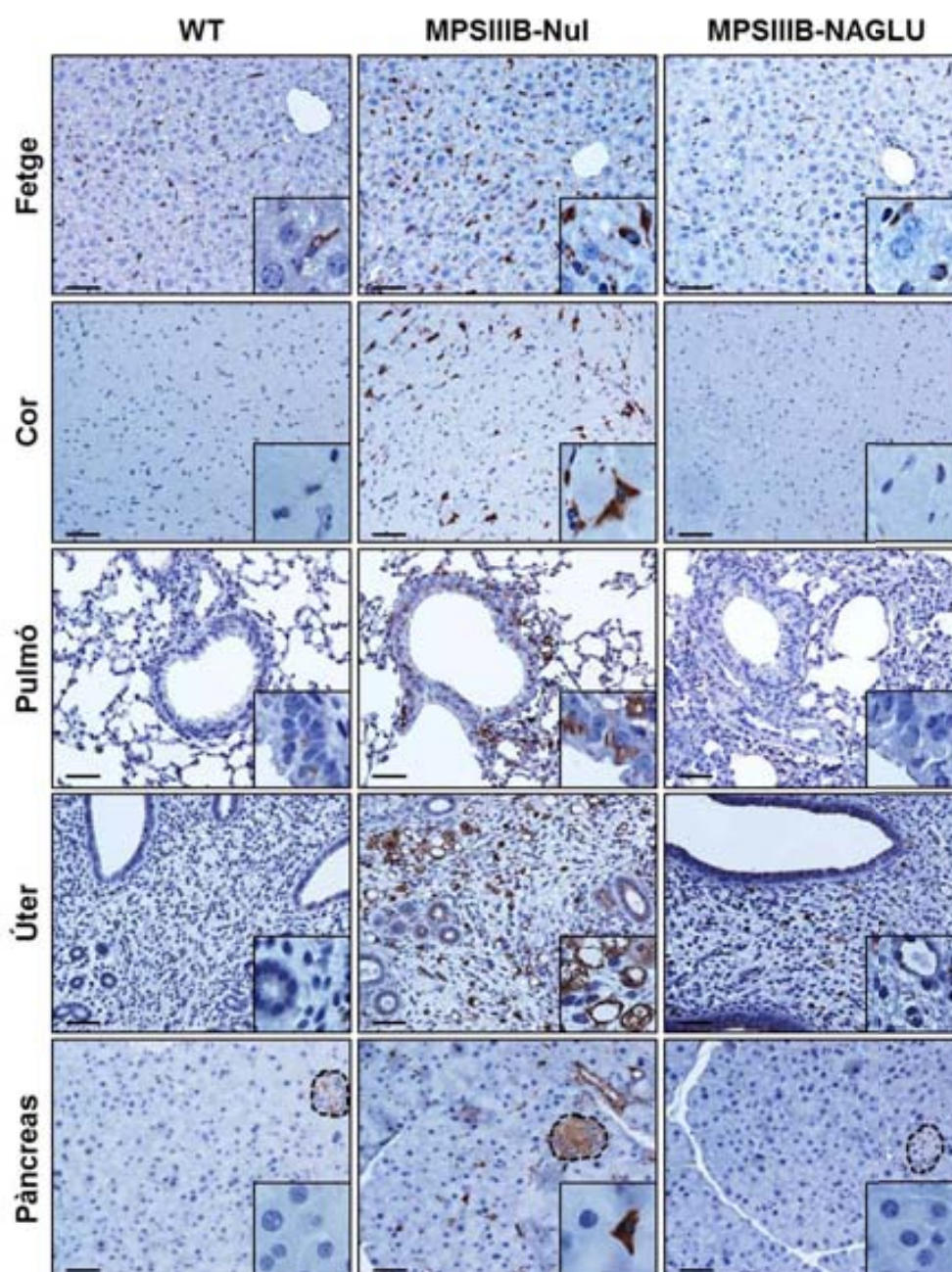
En el cas de les femelles, els resultats obtinguts van ser similars als observats en mascles. En les femelles MPSIIIB tractades amb el vector viral terapèutic, la correcció en els nivells de GAGs es va assolir a tots els teixits analitzats a excepció del ronyó, l'ovari i la bufeta urinària. A diferència del què s'havia observat en mascles, tot i observar-s'hi una tendència a la disminució dels nivells de GAGs, aquesta disminució no era estadísticament significativa respecte dels nivells de GAGs mesurats en els mateixos teixits de ratolins MPSIIIB tractats amb el vector Nul (Figura 39). D'aquests tres teixits, és conegut que el ronyó és refractari a ésser corregit en MPSIIIB i en d'altres LSDs (Dickson, 2008; Donsante, 2007; Garcia, 2007; McCarty, 2009; Ruzo, 2012a; Haurigot, 2013), i també en aquesta aproximació terapèutica basada en l'administració intracisterna del vector AAV9-mNAGLU, l'acumulació patològica de GAGs als ronyons no va ser totalment corregida.

La correcció de l'acumulació de GAGs a nivell somàtic en mascles i femelles també es va observar mitjançant anàlisi immunohistoquímica contra el marcador lisosòmic LAMP-1 (Figures 40 i 41). Les imatges representatives de les tincions respectives van mostrar l'efecte del tractament intracisterna amb el vector AAV9-mNAGLU en la normalització de la distensió lisosòmica en diferents òrgans i teixits somàtics, en comparació amb els ratolins MPSIIIB administrats amb el vector viral Nul.



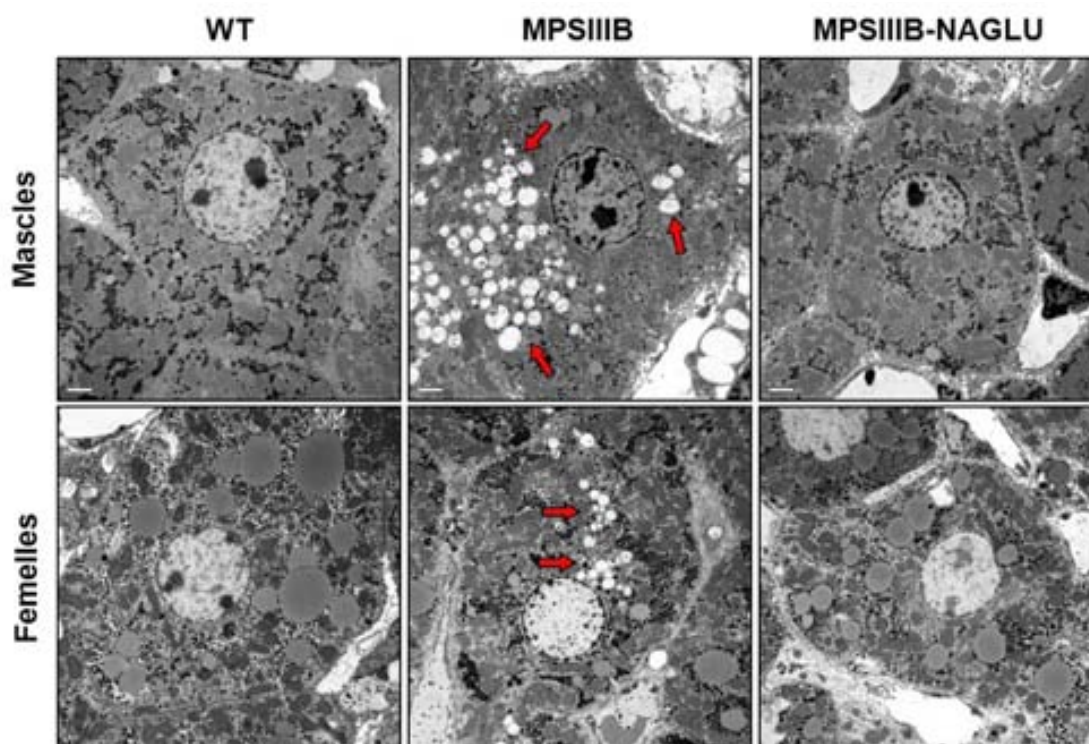
**Figura 40. Correcció de la distensió lisosòmica en òrgans i teixits somàtics de ratolins MPSIIIB mascles.** Imatges representatives del marcatge per a LAMP-1 a fetge, cor, pulmó, bufeta urinària i pàncreas (la línia discontinua delimita un illot pancreàtic). Una marcada reducció en la senyal de LAMP-1, indicativa de la reducció de la mida lisosòmica, es va observar en seccions de teixits de ratolins MPSIIIB mascles després de ser tractats amb el vector AAV9-mNAGLU. La barra d'escala indica 50  $\mu$ m.





**Figura 41. Correcció de la distensió lisosòmica en òrgans i teixits somàtics de ratolins MPSIIIB femelles.** Imatges representatives del marcatge per a LAMP-1 en fetge, cor, pulmó, úter i pàncreas (la línia discontinua delimita un illot pancreàtic). Una marcada reducció en la senyal de LAMP-1, indicativa de la reducció de la mida lisosòmica, es va observar en seccions de teixits de ratolins MPSIIIB femelles després de ser tractades amb el vector viral AAV9-mNAGLU. La barra d'escala indica 50  $\mu$ m.

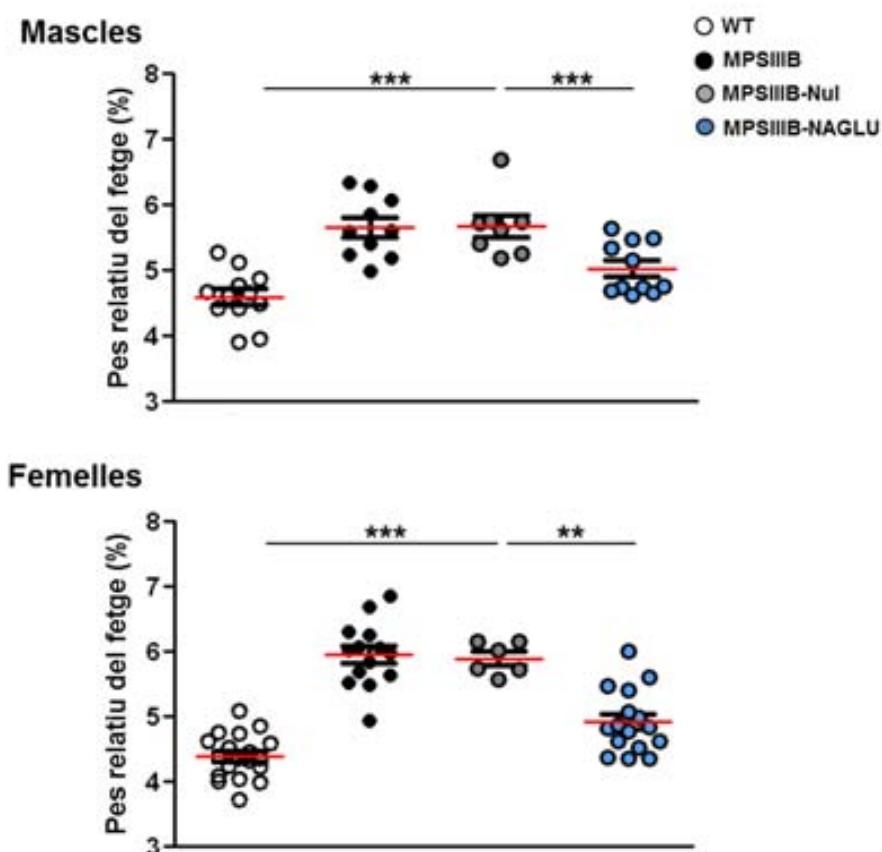
A més a més, per mitjà de MET es va avaluar la ultraestructura del fetge, i s'hi observava també la correcció de la distensió lisosòmica en hepatòcits de ratolins MPSIIIB d'ambdós sexes tractats amb el vector terapèutic (Figura 42), corroborant la correcció dels nivells de GAGs hepàtics ja quantificats anteriorment (figura 39) i observats també per anàlisi immunohistoquímica (Figures 40 i 41). De la mateixa manera, tant els ratolins mascles com femelles MPSIIIB no tractats presentaven grans vesícules citoplasmàtiques d'acumulació poc electrodenses als hepatòcits, representatives de l'acumulació intralisosòmica de GAGs (Figura 42).



**Figura 42. Microscòpia Electrònica de Transmissió mostrant la correcció de la patologia lisosòmica al fetge.** Imatges representatives de ratolins WT, MPSIIIB no tractats i MPSIIIB-NAGLU mostrant la correcció de la distensió lisosòmica a nivell hepàtic (fletxes vermelles). En els hepatòcits de ratolins MPSIIIB tractats amb AAV9-mNAGLU s'hi va observar una correcció de la presència de grans lisosomes d'acumulació de GAGs. Magnificacions originals 5000x.

## 4.2. Correcció d'organomegàlies

L'hepatomegàlia i una moderada esplenomegàlia estan àmpliament descrites en el model murí i en pacients de la MPSIIIB (Neufeld i Muenzer, 2001). Per aquesta raó també es va voler avaluar l'efecte del tractament amb AAV9-mNAGLU sobre la capacitat de corregir les organomegàlies en el model animal. Es va avaluar el pes relatiu del fetge, de la melsa i del cor respecte del pes corporal de ratolins WT, MPSIIIB, MPSIIIB-Nul i MPSIIIB-NAGLU després de 3 mesos de tractament, i es va observar que únicament en els ratolins MPSIIIB tractats amb el vector viral AAV9-mNAGLU hi havia una correcció de l'hepatomegàlia (Figura 43). D'entre les organomegàlies avaluades, únicament es va observar hepatomegàlia en ratolins MPSIIIB no tractats o tractats amb el vector viral Nul, ja que aquests no van presentar esplenomegàlia ni cardiomegàlia als 5 mesos d'edat (dades no mostrades).

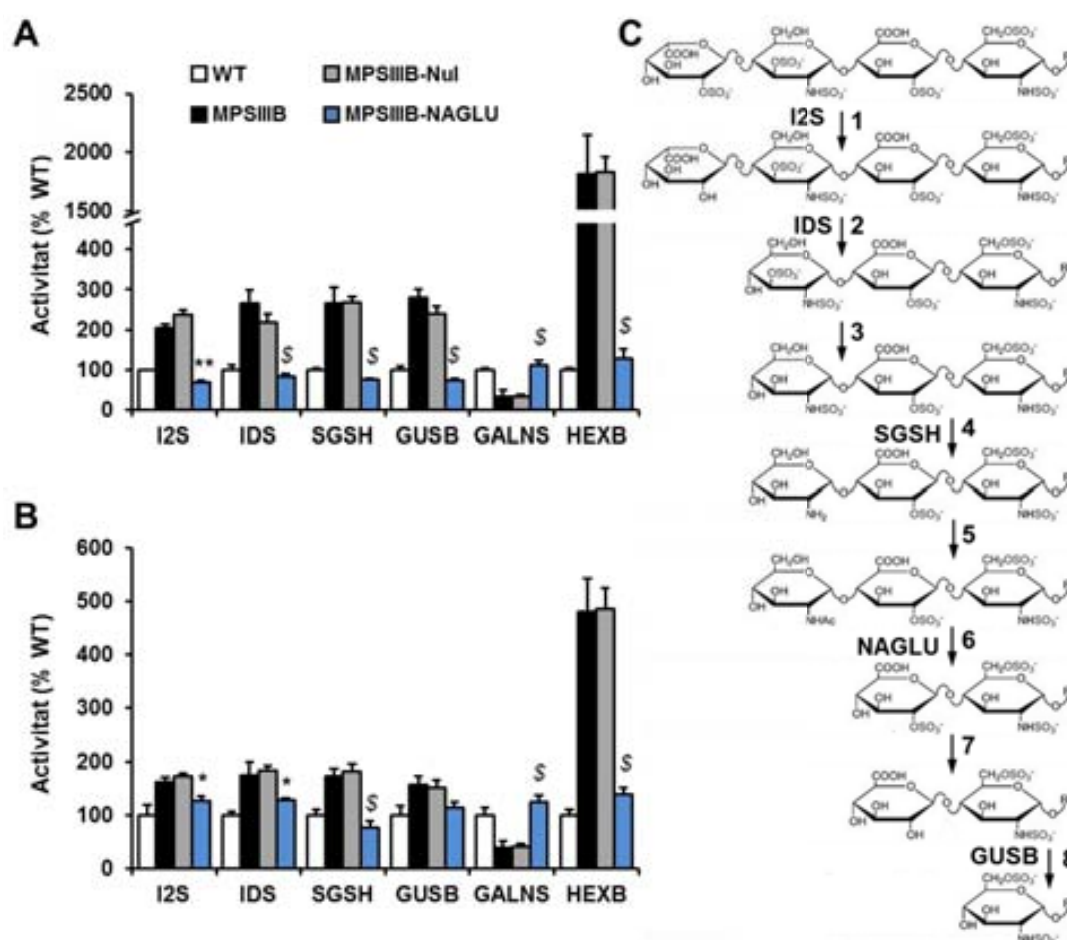


**Figura 43. Correcció de l'hepatomegàlia.** El pes relatiu del fetge respecte del pes corporal es va determinar en ratolins WT, MPSIIIB, MPSIIIB-Nul i MPSIIIB-NAGLU. Després de 3 mesos de tractament, els ratolins MPSIIIB d'ambdós sexes tractats amb AAV9-mNAGLU van mostrar una disminució significativa en el pes relatiu del fetge. Les dades que es mostren corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM de 6-19 animals per grup. A les gràfiques s'hi mostra l'interval de variació estàndard de la mitjana (en negre) i la mitjana (en vermell) per a cadascun dels grups. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. MPSIIIB-Nul.



### 4.3. Normalització de l'activitat enzimàtica d'altres enzims lisosòmics

Es va avaluar l'efectivitat del tractament amb el vector AAV9-mNAGLU sobre les activitats enzimàtiques d'altres enzims lisosòmics i per a restaurar l'homeòstasi lisosòmica a nivell hepàtic. La determinació d'activitat enzimàtica en extractes de fetge de ratolins WT, MPSIIIB, MPSIIIB-Nul i MPSIIIB-NAGLU d'ambdós sexes va permetre observar que el tractament amb AAV9-mNAGLU també en aquest teixit era capaç de corregir totes les activitats enzimàtiques alterades en els ratolins MPSIIIB i MPSIIIB-Nul, i mantenir-les en valors indistingibles dels observats en ratolins WT (Figura 44).



**Figura 44. Correcció de les activitats enzimàtiques lisosòmiques alterades al fetge. (A,B)** Mesura d'activitat enzimàtica dels enzims lisosòmics Iduronat-2-sulfatasa (I2S), α-iduronidasa (IDS), Sulfamidasa (SGSH), Galactosamina-6-sulfatasa (GALNS), β-glucuronidasa (GUSB) i β-hexosaminidasa (HEXB) al fetge de ratolins WT, MPSIIIB, MPSIIIB-Nul i MPSIIIB-NAGLU mascles i femelles. La correcció de la majoria d'activitats enzimàtiques en ratolins MPSIIIB tractats amb el vector viral AAV9-mNAGLU va ser indicativa de la restauració de l'homeòstasi lisosòmica en aquest òrgan. **(C)** Via de degradació del HS. Els resultats que es mostren als gràfics corresponen a la mitjana ± SEM de 3-4 animals per grup. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \$ $p < 0,001$  vs. MPSIIIB-Nul.

#### 4.4. Efecte del tractament intracisterna sobre el comportament

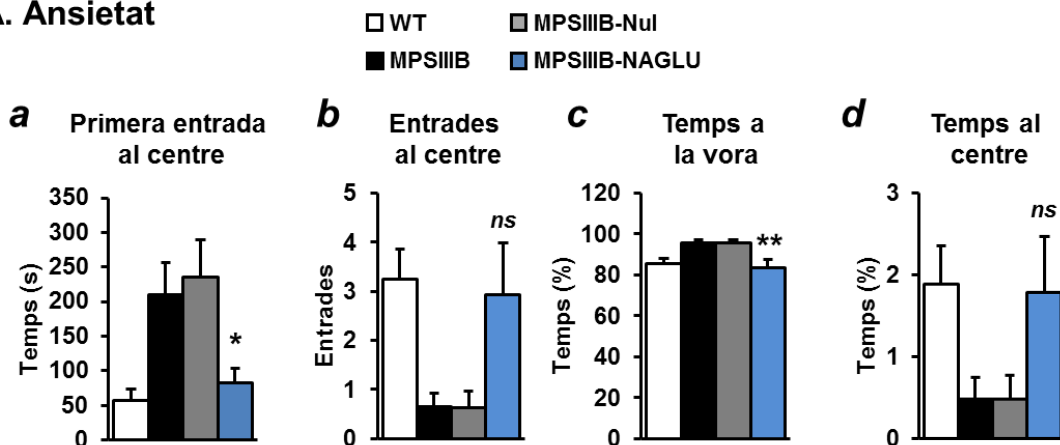
L'efecte de la injecció al LCR del vector AAV9-mNAGLU en el comportament dels ratolins MPSIIIB d'ambdós sexes després de 3 mesos de tractament es va avaluar mitjançant la prova de comportament de l'*Open-field*, destinada a posar de manifest comportaments ansiògens i dèficits en l'activitat locomotora i exploratòria.

Als 2 i 5 mesos d'edat es va demostrar que els ratolins MPSIIIB presentaven un comportament més ansiogen i una menor activitat locomotora i exploratòria (Figures 19 a 22). Als 5 mesos d'edat (3 mesos després del tractament) i independentment del sexe, els ratolins MPSIIIB injectats amb vector viral Nul seguien presentant el mateix patró de comportament (Figures 45 i 46). D'aquesta manera, el temps d'entrada a la part central de l'arena també es va veure significativament augmentat en els ratolins MPSIIIB no tractats o tractats amb el vector Nul (Figures 45Aa i 46Aa). Aquest fet, combinat amb un augment en el temps transcorregut a la part adjacent a les parets i amb una disminució tant en el temps com en les entrades a la part central (Figures 45Ab-Ad i 46Ab-Ad), va permetre concloure que durant els 2 primers minuts de prova a l'interior de l'arena, els ratolins MPSIIIB i MPSIIIB-Nul presentaven, igual que als 2 mesos, un comportament clarament ansiogen. En canvi, el tractament intracisterna amb el vector AAV9-mNAGLU va ser capaç de revertir aquest fenotip tant en mascles com en femelles. Tot i que alguns dels paràmetres no van mostrar una correcció estadísticament significativa, sí que s'hi va observar una tendència.

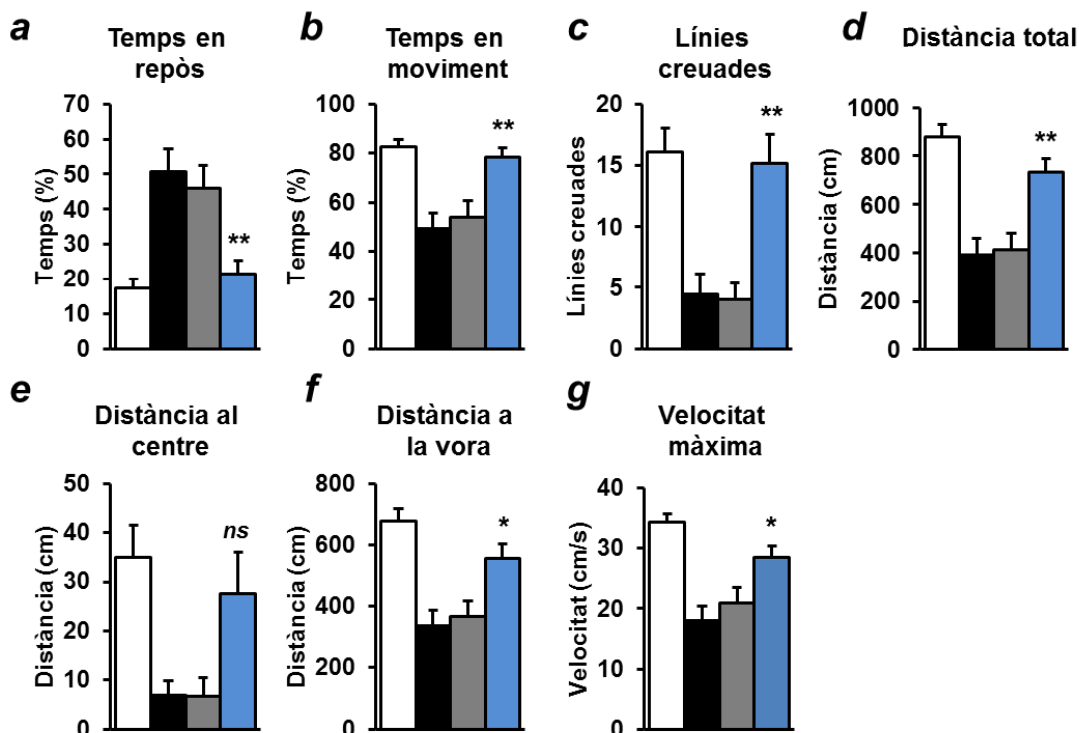
Les alteracions en l'activitat locomotora observades en ratolins MPSIIIB de 2 mesos d'edat també es van fer evidents a l'edat de 5 mesos en ratolins administrats amb vector Nul. En aquest sentit, aquests ratolins van presentar un major temps en repòs en comparació amb els ratolins WT sans de la mateixa edat, indicatiu d'una menor activitat locomotora i exploratòria (Figures 45Ba i 46Ba). En conseqüència, el temps en moviment, el nombre total de línies creuades i la distància total recorreguda durant els 2 primers minuts es van veure reduïts (Figures 45Bb-Bd i 46Bb-Bd). Altres paràmetres com la distància transcorreguda al centre o a la vora de l'arena així com la velocitat màxima assolida, també es van veure alterats (Figures 45Be-Bg i 46Be-Bg). Pel que fa a l'activitat locomotora, el tractament intracisterna amb AAV9-mNAGLU també va permetre corregir les alteracions de comportament dels ratolins MPSIIIB tractats, fent-lo indistingible en molts casos dels ratolins WT de la mateixa edat. Alguns d'aquests paràmetres, tot i no presentar una correcció estadísticament significativa, van mostrar una clara tendència a la correcció.



## A. Ansietat

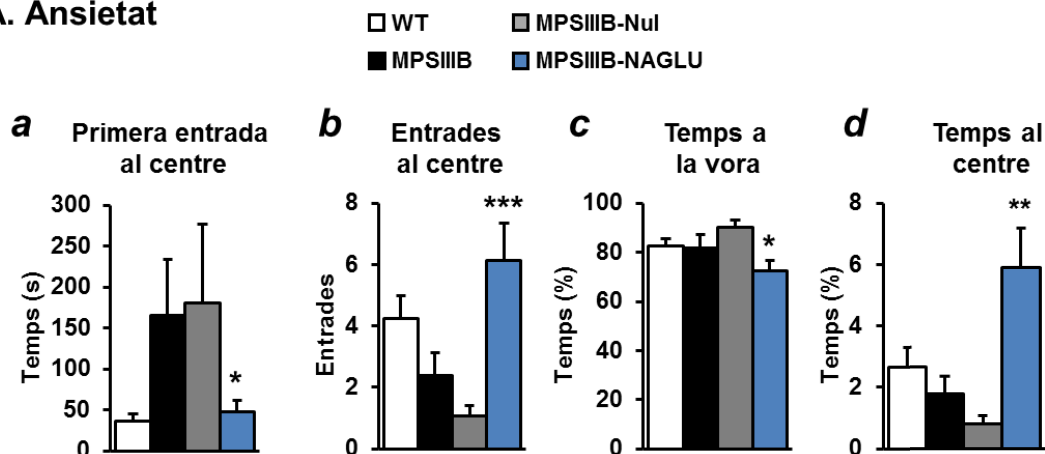


## B. Activitat locomotora

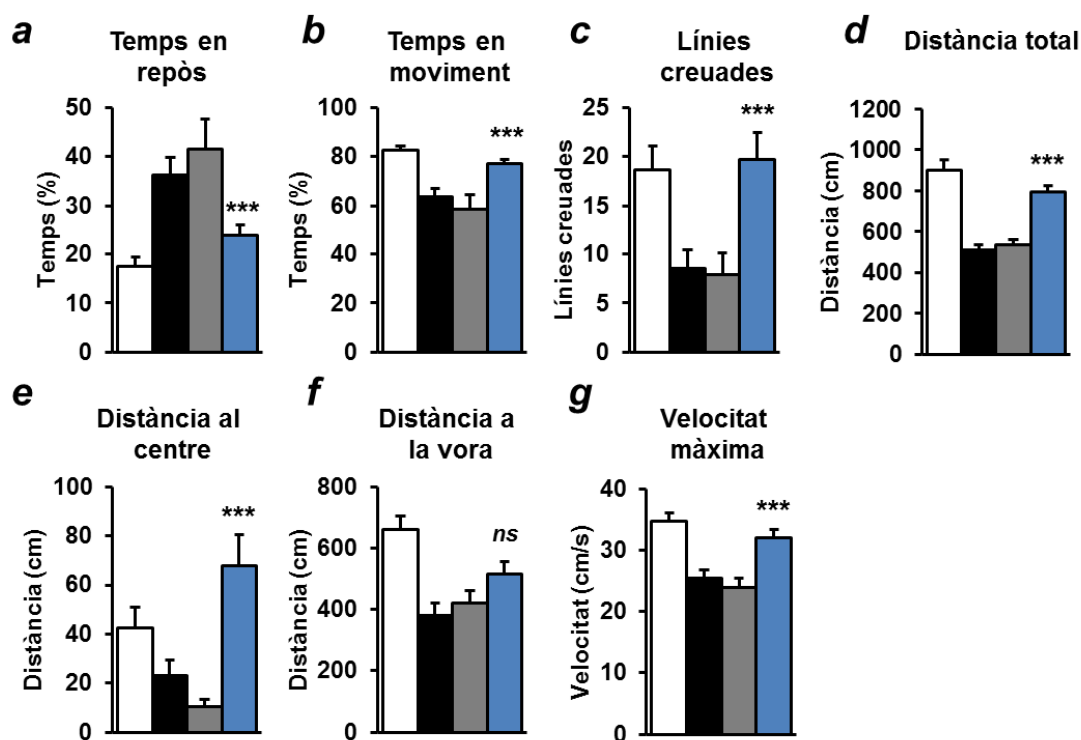


**Figura 45. Correcció de les alteracions del comportament en ratolins MPSIIIB mascles.** Tres mesos després del tractament intracisterna amb el vector viral AAV9-mNAGLU els ratolins MPSIIIB mascles mostraven una correcció gairebé total tant dels paràmetres corresponents al comportament ansiogen (A) com dels paràmetres corresponents a l'activitat locomotora (B). Les dades que es mostren corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM de 12-19 animals per grup. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs. MPSIIIB-Nul; ns: no significatiu.

## A. Ansietat



## B. Activitat locomotora



**Figura 46. Correcció de les alteracions del comportament en ratolins MPSIIIB femelles.** Tres mesos després del tractament intracisterna amb el vector viral AAV9-mNAGLU els ratolins MPSIIIB femelles van mostrar una correcció dels paràmetres corresponents al comportament ansiogen (A), tot i observar-s'hi certa variabilitat entre els grups WT i MPSIIIB no tractats. La correcció de l'activitat locomotora va ser més evident (B). Les dades que es mostren corresponen a la mitjana  $\pm$  SEM de 12-19 animals per grup. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. MPSIIIB-NuI; <sup>ns</sup>: no significatiu.

Per tant, la prova de l'Actímetre va posar de manifest l'efecte de l'administració intracisterna del vector viral AAV9-mNAGLU sobre la correcció tant de l'activitat locomotora i exploratòria (Figures 45B i 46B) com del comportament ansiogen (Figures 45A i 46A).

D'aquesta manera, de l'estudi d'alteracions conductuals a 5 mesos d'edat se'n va poder deduir que el tractament amb el vector viral AAV9-mNAGLU donava lloc a la correcció del comportament patològic en aquells ratolins MPSIIIB tractats amb el vector codificant per l'enzim NAGLU murí optimitzat en comparació amb els ratolins MPSIIIB tractats amb el vector viral Nul.

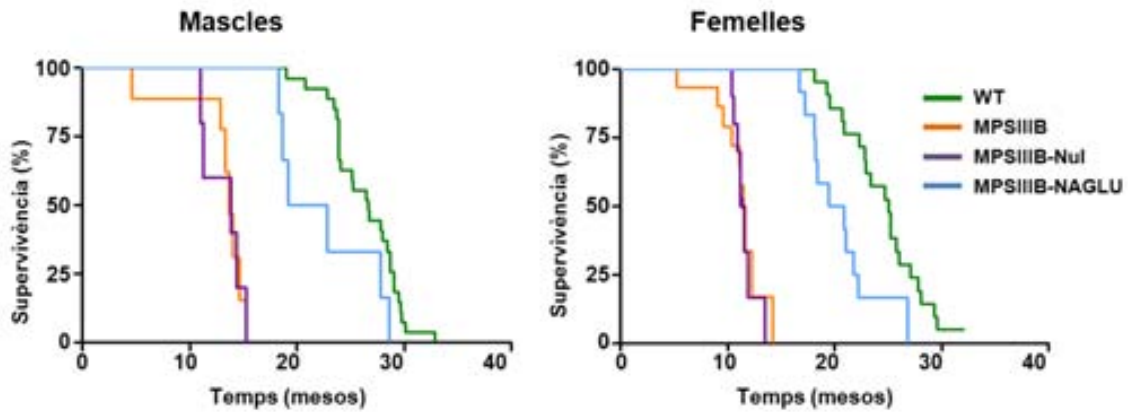
#### **4.5. Supervivència**

L'efecte de qualsevol tractament sobre la supervivència és un dels paràmetres clau a l'hora de valorar-ne l'eficàcia a llarg termini. Per tant, es va avaluar l'efecte del tractament intracisterna amb el vector viral AAV9-mNAGLU sobre la longevitat dels ratolins MPSIIIB administrats amb aquest vector, i es va poder observar una supervivència més elevada en aquest grup, en comparació amb el grup MPSIIIB no tractat o tractat amb vector Nul (Figura 47).

Els ratolins MPSIIIB mascles tractats amb el vector terapèutic van mostrar una supervivència mediana de 21 mesos, en comparació amb els 13,63 mesos i 13,87 mesos dels ratolins MPSIIIB no tractats o tractats amb vector Nul, respectivament. Tot i així, no van arribar a assolir la supervivència mediana de 26,6 mesos dels ratolins WT sans (Figura 47).

El grup de femelles va seguir un patró semblant a l'observat en mascles, essent les supervivències medianes de 25,07 mesos per a WT, 11,67 mesos per a MPSIIIB, 11,39 mesos per a MPSIIIB tractades amb AAV9-CAG-Nul i 20,2 mesos per a MPSIIIB tractades amb AAV9-mNAGLU (Figura 47).

En qualsevol cas, els ratolins MPSIIIB tractats amb el vector viral AAV9-mNAGLU van presentar una supervivència significativament més elevada que la dels ratolins MPSIIIB no tractats o tractats amb el vector Nul.



**Figura 47. Efecte del tractament intracisterna amb AAV9-mNAGLU sobre la supervivència.**

Representacions de Kaplan-Meier mostrant les corbes de supervivència de ratolins WT, MPSIIIB, MPSIIIB-Nul i MPSIIIB-NAGLU d'ambdós sexes. Les dades que es mostren corresponen a la supervivència de 5-20 animals per grup. Supervivències medianes en mesos per mascles: 26,6 (WT), 13,63 (MPSIIIB), 13,87 (MPSIIIB-Nul), 21,02 (MPSIIIB-NAGLU). Supervivències medianes per femelles: 25,1 (WT), 11,67 (MPSIIIB), 11,34 (MPSIIIB-Nul), 20,2 (MPSIIIB-NAGLU);  $p=0,0007$  en mascles i  $p<0,0001$  en femelles MPSIIIB-NAGLU vs. MPSIIIB-Nul.

La normalització de les alteracions de comportament així com també la millora de la supervivència, tant en ratolins mascles com femelles, va representar una nova demostració de l'eficàcia terapèutica de l'administració directa al LCR del vector viral AAV9-mNAGLU per corregir les alteracions no només a nivell cel·lular, sinó que també a nivell funcional. Aquest estudi va suportar la translació d'aquesta aproximació terapèutica cap a estudis preclínics amb animals més grans.

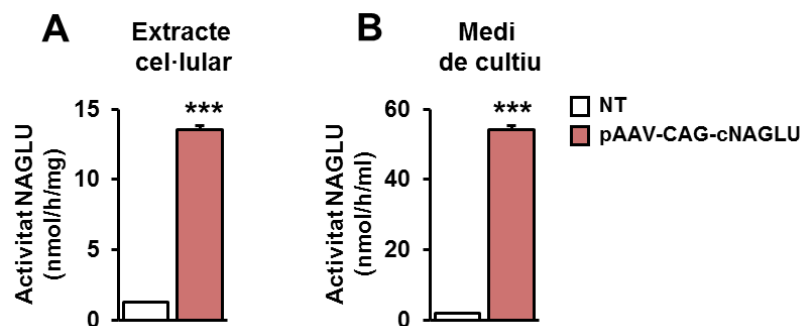
***Part 3. Translacionabilitat de l'aproximació de  
teràpia gènica cap a models animals grans***

## 1. CONSTRUCCIÓ D'UN VECTOR VIRAL ADENOASSOCIAT CODIFICANT PER LA PROTEÏNA NAGLU CANINA

Un cop provada l'efectivitat del tractament intracisterna amb AAV9-mNAGLU en el model murí de la MPSIIIB, es va voler avaluar la translacionabilitat del procés en un model animal més gran. Aquest pas és essencial per tal de valorar i justificar la viabilitat en l'escalabilitat del procés, així com també per tal de valorar la tolerabilitat del tractament intracisterna en animals grans, i poder establir una predicció més precisa de cara al tractament de pacients humans. En aquest sentit, el model escollit va ser el gos, ja que tot i no ser filogenèticament proper a l'espècie humana com ho podrien ser els primats no humans, la mida del cervell caní adult és molt semblant a la dels pacients de MPSIIIB en edat pediàtrica als quals aniria dirigit un possible tractament basat en l'administració al LCR del vector viral AAV9 codificant per la proteïna NAGLU.

Per al disseny i construcció d'un vector viral adenoassociat codificant per la proteïna NAGLU canina, es va partir de la seqüència codificant del gen *Naglu* caní (Gene ID: 490965; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). La seqüència de DNA de què es disposava a la base de dades pública estava basada en un model predictiu, ja que el genoma complet del gos (*Canis lupus familiaris*) encara no ha estat seqüenciat al 100%. Per tant, davant la impossibilitat de disposar de la seqüència validada, es va dur a terme l'optimització del gen caní seguint la mateixa estratègia utilitzada per a la NAGLU murina.

Degut a aquest fet, i prèviament a la construcció del vector viral, es va fer necessari produir la proteïna NAGLU canina i fer-ne una prova *in vitro* per tal de comprovar que la proteïna codificada per la seqüència optimitzada era funcional i capaç de ser secretada. Per tant, en primer lloc es va clonar la seqüència codificant optimitzada de la NAGLU canina al plasmidi d'expressió pAAV-CAG. El constructe resultant es va anomenar pAAV-CAG-cNAGLU (on la *c* indica l'origen caní), i posteriorment va ser utilitzat per transfectar la línia cel·lular HEK-293 (cultiu cel·lular de cèl·lules renals humanes: *Human Embryonic Kidney*). La transfecció dels cultius cel·lulars amb el plasmidi pAAV-CAG-cNAGLU va donar lloc a un augment significatiu d'activitat NAGLU tant al medi de cultiu (Figura 48B) com a l'extracte cel·lular (Figura 48A). Aquest fet va indicar, d'una banda que la proteïna codificada pel plasmidi d'expressió pAAV-CAG-cNAGLU era funcional i, d'altra banda, que era capaç de ser secretada al medi extracel·lular (Figura 48).



**Figura 48. Determinació d'activitat NAGLU en cultius cel·lulars.** Cultius cel·lulars HEK-293 es van transfectar amb 4 µg de DNA plasmídic i l'activitat NAGLU es va determinar al medi de cultiu i als extractes cel·lulars. En ambdós casos es va observar un augment significatiu de l'activitat NAGLU en comparació amb els cultius cel·lulars no transfectats. Les dades que es mostren a les gràfiques corresponen a la mitjana ± SEM. \*\*\* $p < 0,001$  vs. NT. NT: cultiu cel·lular no transfectat.

Per tant, la transfecció de cultius cel·lulars amb el plasmidi pAAV-CAG-cNAGLU va permetre concloure que l'optimització de la seqüència codificant predita de la NAGLU canina donava lloc a la proteïna NAGLU funcional i amb la capacitat de ser secretada al medi de cultiu.

Un cop demostrada la funcionalitat *in vitro* del plasmidi d'expressió codificant per l'enzim NAGLU caní, es va dur a terme la producció del vector viral adenoassociat corresponent, i com en el cas de la NAGLU murina, es va escollir el AAV9, degut al seu ampli tropisme i biodistribució quan és administrat a la cisterna magna de gossos *Beagle* adults (Haurigot, 2013). La producció del vector adenoassociat de serotip 9 corresponent es va dur a terme com s'especifica en l'apartat de Materials i Mètodes. El vector viral resultant es va anomenar AAV9-cNAGLU (Figura 49)



**Figura 49. Representació esquemàtica del constructe codificant per la proteïna NAGLU canina optimitzada.** CAG: promotor híbrid basat en el promotor de la β-actina de pollastre i l'*enhancer* del Citomegalovirus; ITR: *Inverted Terminal Repeats*; Poly A: seqüència de poliadenilació.

## 2. ADMINISTRACIÓ INTRACISTERNA MAGNA DEL VECTOR VIRAL AAV9-cNAGLU EN GOSSOS ADULTS

Un dels principals inconvenients que comporta l'administració de vectors AAV en pacients humans és l'existència de la immunitat preexistent en forma d'anticossos neutralitzants (NAb) circulants contra determinats serotips, entre ells el AAV9, que es troben de forma natural a la població humana. L'existència d'aquesta immunitat podria limitar i fins i tot minimitzar l'eficàcia terapèutica d'un tractament amb vectors AAV9.

Així doncs, es va valorar l'efecte de la immunitat preexistent contra AAV9 sobre l'administració al LCR del vector viral AAV9-cNAGLU a través de la cisterna magna. En primer lloc, a 2 gossos *Beagle* adults se'ls va administrar el vector viral AAV9-Nul per via intravascular a través de la vena cefàlica dreta a una dosi de  $1 \times 10^{11}$  vg/kg. L'objectiu d'aquesta administració va ser la d'induir la generació de NAb circulants contra la càpsida del vector. Transcorregudes 6 setmanes, es va administrar als 2 gossos immunitzats i a 2 gossos nous no immunitzats (també *Beagle* adults) el vector viral AAV9-cNAGLU al LCR a través de la cisterna magna (Taula 8 i Figura 50), a una dosi de  $6,5 \times 10^{12}$  vg/gos. Aquesta dosi va ser extrapolada a partir de la dosi emprada en l'estudi amb el model murí de la MPSIIIB i en funció del volum mitjà del cervell d'ambdues espècies.

Taula 8. Grup experimental caní

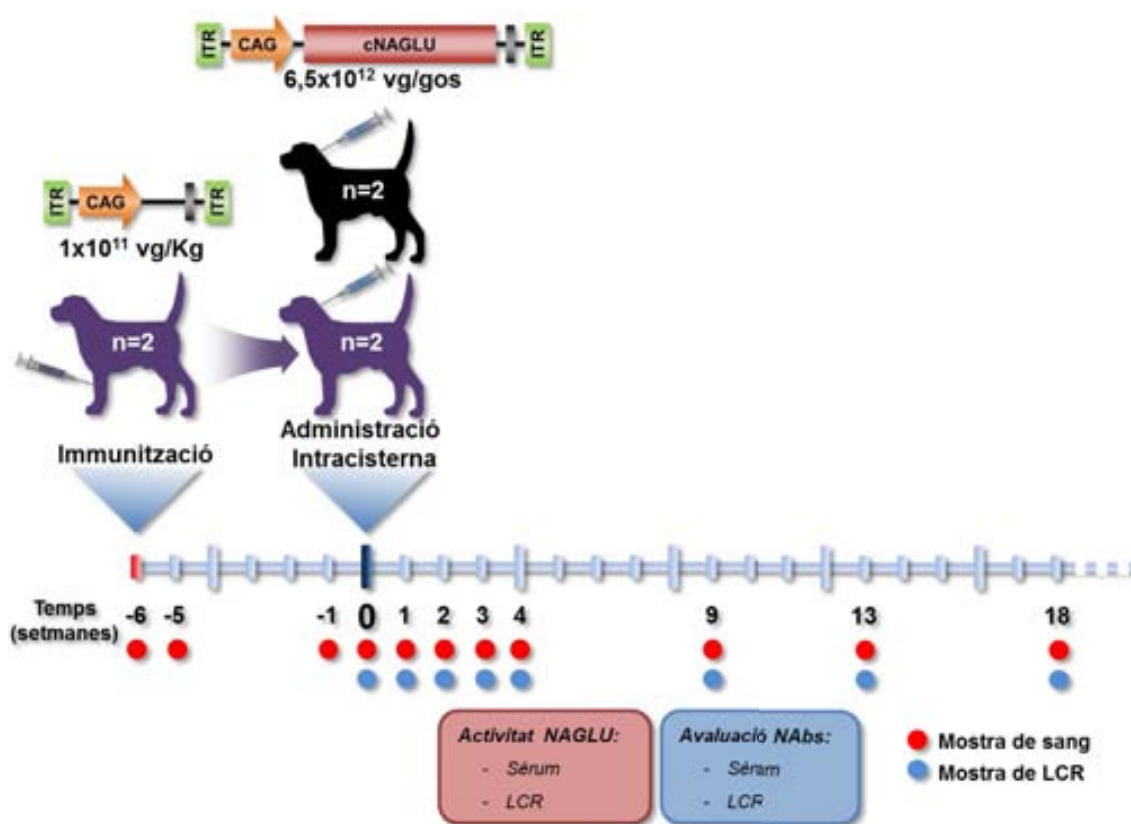
Identificació			
animal	Pes	Edat	Tractament
Gos 1	16,5 kg	7 mesos	IC AAV9-CAG-cNaglu <b>sense</b> immunització
Gos 2	12,5 kg	14 mesos	IC AAV9-CAG-cNaglu <b>sense</b> immunització
Gos 3	13,5 kg	14 mesos	IC AAV9-CAG-cNaglu <b>amb</b> immunització
Gos 4	15,0 kg	7 mesos	IC AAV9-CAG-cNaglu <b>amb</b> immunització

El grup experimental el van formar 4 gossos *Beagle* als quals se'ls va administrar el vector viral AAV9-cNAGLU directament al LCR per via intracisterna. Dos d'aquests gossos (Gos 3 i Gos 4) havien estat prèviament immunitzats per via intravenosa amb el vector viral AAV9-Nul. IC: Intracisterna



Tant l'administració intravascular com intracisterna dels diferents vectors AAV9 va ser tolerada correctament pels animals, sense alteracions en els paràmetres hematològics ni bioquímics.

Durant el primer mes post-administració intracisterna, es van prendre mostres setmanals de sèrum i de LCR per tal de determinar-hi els títols de NAb i l'activitat NAGLU. També es van realitzar anàlisis bioquímiques i hematològiques amb la finalitat de seguir i monitoritzar l'estat dels 4 gossos. A partir del primer mes, les mostres es van prendre mensualment (Figura 50)



**Figura 50. Disseny experimental.** Per a la inducció de NAb circulants contra AAV9 es va administrar el vector AAV9-Nul per via intravenosa a dos gossos *Beagle* adults. Passat un mes, es va administrar el vector AAV9-cNAGLU al LCR per punció directa a la cisterna magna als dos gossos prèviament immunitzats i a dos gossos *Beagle* adults sense prèvia immunització. Durant el primer mes post-injecció intracisterna es van obtenir mostres setmanals de sang i de LCR, i a partir d'aquest punt, les extraccions es van dur a terme mensualment.

## 2.1. Detecció d'anticossos neutralitzants contra AAV9 circulants i al LCR

Els NAbs circulants contra diferents serotips de AAV presenten una elevada prevalença en la població humana (Boutin, 2010). En canvi, a diferència de la sang, els títols de NAbs al LCR són comparativament més baixos en individus sans (Haurigot, 2013). Aquesta asimetria en els títols de NAbs és en gran deguda a la presència de la BHE, que per la seva permeabilitat selectiva, en condiciona el seu pas des de la sang cap al SNC.

Per tal de valorar el possible efecte inhibitori dels NAbs presents al LCR sobre la transducció cerebral del vector viral després de l'administració intracisterna, als 4 gossos se'ls va determinar el seu títol tant al sèrum com al LCR (Taula 9).

Abans de l'administració dels vectors virals (setmana 0 pels gossos 1 i 2, setmana -6 pels gossos 3 i 4), tots els animals del grup experimental no van mostrar nivells circulants detectables de NAbs contra AAV9 (Taula 9). A la setmana -6, es va administrar el vector viral Nul als gossos 3 i 4, la qual cosa va donar lloc a la generació d'elevats títols de NAbs circulants contra la càpsida viral (Taula 9).

Taula 9. Nivells de NAbs contra AAV9 al sèrum i al LCR

Setmana	Gossos no immunitzats				Gossos immunitzats			
	Gos 1		Gos 2		Gos 3		Gos 4	
	Sèrum	LCR	Sèrum	LCR	Sèrum	LCR	Sèrum	LCR
➔ S -6	-	-	-	-	1:1	-	1:1	-
S -5	-	-	-	-	1:1000	-	1:316	-
S -1	-	-	-	-	1:100	-	1:100	-
➔ S 0	<1:1	1:1	<1:1	1:1	1:100	1:1	1:1000	1:1
S 1	1:1000	1:1	1:3160	1:1	1:1000	1:3,1	1:1000	1:1

Títols de NAbs al sèrum i al LCR de gossos *Beagle* amb i sense prèvia immunització contra AAV9. La fletxa vermella indica la setmana d'immunització; la fletxa blava indica la setmana d'administració intracisterna.

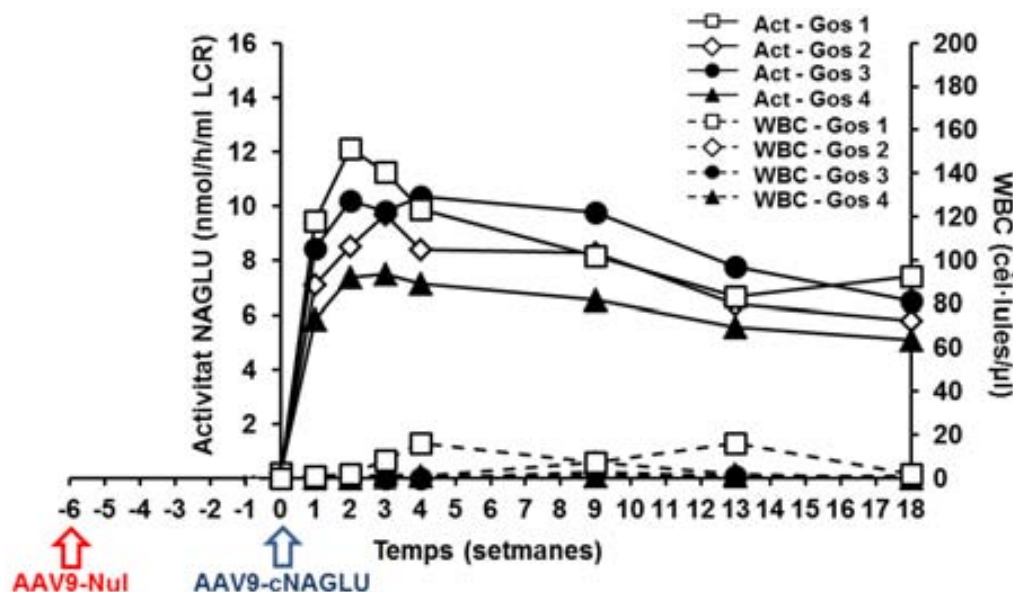
Passades 6 setmanes de la immunització amb AAV9-Nul, es va administrar el vector viral AAV9-cNAGLU als 4 gossos a la cisterna magna (setmana 0). En aquest moment, els títols de NAbs al LCR eren indetectables, fins i tot als gossos prèviament immunitzats i amb elevats títols circulants de NAbs (Taula 9). Passada una setmana

de l'administració intracisterna (setmana 1), els NAbs al LCR es van mantenir en títols pràcticament indetectables en els 4 gossos. Aquest fet confirma l'asimetria entre els títols de NAbs circulants i del LCR atribuïda a la presència de la BHE. Per contra, els nivells de NAbs circulants dels gossos 1 i 2 que fins aquell moment havien estat indetectables, una setmana després de l'administració intracisterna magna van augmentar significativament, i equiparant-se als títols mesurats en els gossos 3 i 4 immunitzats setmanes abans (Taula 9). L'augment de NAbs circulants en els gossos 1 i 2 va ser indicatiu que, com en el cas de l'administració intracisterna magna en ratolins, el vector AAV9-cNAGLU administrat al LCR dels gossos també tenia la capacitat de passar a circulació sanguínia, on alhora es va generar una resposta en forma de NAbs. Aquest fet ja s'havia observat prèviament al nostre laboratori, on també es van detectar títols elevats de NAbs circulants contra AAV9 quan aquest vector havia estat administrat a la cisterna magna de gossos adults (Haurigot, 2013).

## **2.2. Efecte de la immunitat preexistent sobre l'activitat NAGLU del LCR**

L'absència de NAbs contra la càpsida del AAV9 al LCR dels 4 gossos, va permetre observar elevats nivells d'activitat NAGLU al LCR després de l'administració intracisterna magna del vector viral AAV9-cNAGLU (Figura 51).

L'activitat NAGLU es va veure augmentada significativament una setmana després de l'administració intracisterna, podent-se diferenciar clarament de l'activitat NAGLU endògena (Figura 51). D'aquesta manera, l'activitat NAGLU va assolir un pic d'activitat durant les primeres setmanes, i va anar disminuint progressivament durant les setmanes successives, arribant a nivells estables i significativament elevats respecte dels nivells inicials previs a l'administració intracisterna, i fins al final del període d'estudi (18 setmanes). En aquest punt, la transducció del cervell per part del vector viral AAV9-cNAGLU va donar lloc a la detecció de nivells d'activitat NAGLU al LCR d'entre 25 i 40 vegades superiors respecte dels valors basals.



**Figura 51. Evolució de l'activitat NAGLU i del contingut en cèl·lules blanques al LCR.** Determinació d'activitat NAGLU i contingut en cèl·lules blanques (WBC) al LCR dels gossos administrats intracisterna amb el vector viral AAV9-cNAGLU amb i sense prèvia immunització. La fletxa vermella indica la setmana d'immunització; la fletxa blava indica la setmana d'administració intracisterna del vector viral AAV9-cNAGLU. Valor d'activitat NAGLU al LCR =  $0,183 \pm 0,010$  nmol/h/ml de LCR (valor referent a la mitjana d'activitat NAGLU mesurada al LCR dels 4 gossos prèviament a l'administració intracisterna).

Per tant, en aquest estudi es va demostrar una expressió estable i perllongada en el temps de la proteïna NAGLU canina al LCR 18 setmanes després de l'administració intracisterna magna del vector viral AAV9-cNAGLU. Aquest fet va ser indicatiu de la transducció del cervell caní per part del vector AAV9-cNAGLU administrat al LCR, que alhora també està d'acord amb observacions realitzades prèviament al nostre laboratori (Haurigot, 2013).

Paral·lelament a la determinació d'activitat NAGLU, també es va avaluar la possible reacció inflamatòria post-administració intracisterna magna. Excepte en el Gos 1, l'increment d'activitat NAGLU al LCR no va anar acompanyat de pleocitosi (Figura 51) ni tampoc d'un augment en la concentració de proteïnes totals (dades no mostrades). Ambdós paràmetres, l'alteració dels quals és indicativa d'una possible reacció inflamatòria, es van mantenir dins els valors normals de referència ( $<5$  cèl·lules/ $\mu$ l i  $<25$  mg/dl de proteïna total). Tot i així, l'augment en el nombre de cèl·lules blanques (WBC) al LCR del Gos 1 va ser moderat (16 cèl·lules/ $\mu$ l de LCR), i es va veure normalitzat al final del període d'estudi (Figura 51). Aquest augment podria ser degut a la contaminació amb sang de la mostra de LCR de la setmana 2, atribuïda a la punció accidental d'algun vas sanguini durant l'extracció.

Així, els nivells comparables d'activitat NAGLU al LCR assolits en tots 4 gossos suggerien una eficiència de transducció cerebral similar i comparable, independentment dels títols de NAbs circulants específics per a AAV9.

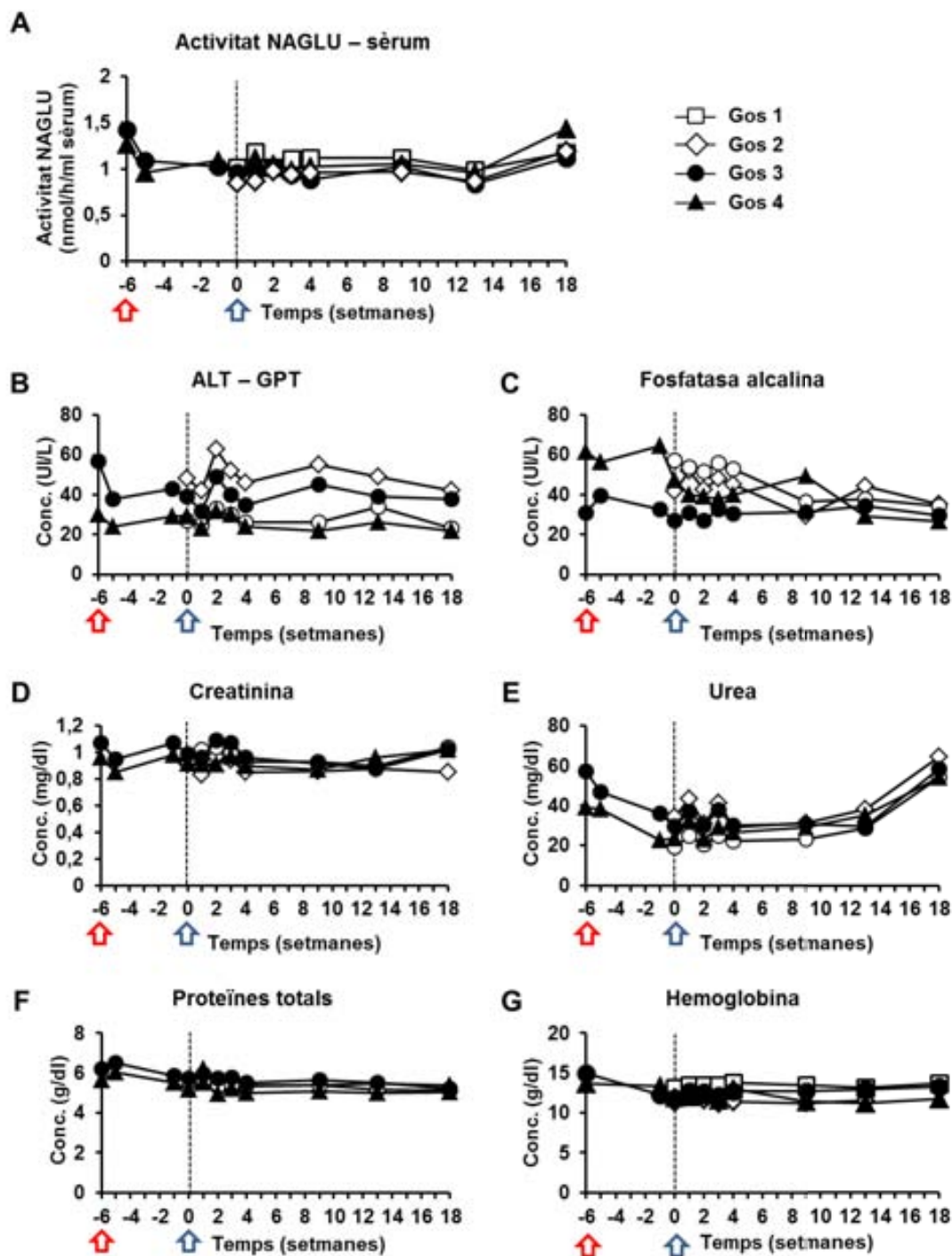
### **2.3. Efecte de l'administració intracisterna de AAV9-cNAGLU a nivell somàtic**

Prèviament, el nostre grup ja havia descrit que l'administració intracisterna de vectors AAV9 al LCR de gossos *Beagle* adults dona lloc a una transfecció hepàtica difusa (Haurigot, 2013). Per tant, es va voler estudiar l'efecte de l'administració intracisterna del vector viral AAV9-cNAGLU sobre la transducció hepàtica. Per avaluar-ne el grau de transducció es va mesurar l'activitat NAGLU circulant en els 4 gossos, però a diferència de l'augment d'activitat NAGLU observat al LCR, l'activitat NAGLU circulant no es va veure modificada després de l'administració intracisterna (Figura 52A) en comparació als nivells d'activitat mesurats prèviament a l'administració viral (setmana 0). Cal tenir en compte que els gossos utilitzats en aquest estudi eren gossos sans amb activitat NAGLU endògena, per la qual cosa l'activitat NAGLU derivada de la transducció hepàtica podria no ser suficient com per fer augmentar significativament els valors sèrics normals.

D'altra banda, l'administració intracisterna va ser ben tolerada per tots 4 gossos, ja que cap d'ells va experimentar canvis en els paràmetres bioquímics ni hematològics mesurats. Aquests es van mantenir dins els intervals normals de referència durant el període de duració de l'experiment (Figura 52 B-G).

Per tant, l'absència d'alteracions secundàries derivades de l'administració viral, posen de manifest la tolerabilitat del tractament i la viabilitat de l'administració intracisterna magna del vector AAV9-cNAGLU independentment de la presència de NAbs circulants contra la càpsida.

Així, els resultats obtinguts amb l'administració al LCR del vector AAV9 codificant per la proteïna NAGLU en els models murí i caní de la MPSIIIB, posen de manifest el potencial terapèutic de l'aproximació de teràpia gènica proposada en aquesta tesi doctoral, i obren una possible via d'estudi per a la translacionabilitat de la teràpia cap a la clínica humana.



**Figura 52. Evolució de l'activitat NAGLU circulant i dels paràmetres sanguinis.** Determinació d'activitat NAGLU circulant (A), ALT (B), Fosfatasa alcalina (C), Creatinina (D), Urea (E), Proteïnes totals (F) i Hemoglobina (G) en els gossos administrats intracisterna amb el vector viral AAV9-cNAGLU amb i sense immunització. Tots els paràmetres sanguinis es van mantenir dins els intervals de normalitat. La fletxa vermella indica la setmana d'immunització; la fletxa blava indica la setmana d'administració intracisterna del vector viral AAV9-cNAGLU.

## ***V. Discussió***

La Mucopolisacaridosi tipus III, o Síndrome de Sanfilippo, és una malaltia minoritària genètica d'herència autosòmica recessiva, la qual s'estima que es presenta amb una incidència combinada d'un entre 70.000 naixements, essent el subtipus A el més freqüent, seguit dels subtipus B, C i D, amb petites variacions segons l'àrea geogràfica estudiada. En concret, la MPSIIIB és més prevalent en els països sud-europeus, a excepció de l'Estat Espanyol, on el subtipus predominant és l'A, el qual s'hipotetitza que podria ser degut a un efecte migratori de la població centre-nord europea, ja que en aquesta àrea geogràfica, el subtipus A també és el més freqüent (Delgadillo, 2013).

La MPSIIIB és una d'entre les 6000 i 8000 malalties minoritàries que s'estima que existeixen, i una entre les prop de 50 LSDs descrites. Actualment no hi ha cap tractament eficaç ni definitiu per a la MPSIIIB, ni per la majoria de LSDs, i els tractaments actuals dels quals es disposa són merament simptomàtics i destinats a la millora de la qualitat de vida tant dels pacients com del seu entorn familiar. La ERT és actualment la teràpia més exitosa per al tractament de la simptomatologia somàtica d'algunes LSDs (de Ruijter, 2011), però presenta l'inconvenient que l'enzim recombinant és incapaç de creuar la BHE i, per tant, d'actuar sobre la patologia del SNC. Aquest fet, juntament amb la necessitat de realitzar administracions periòdiques de l'enzim i l'elevat cost econòmic que suposen aquest tipus de teràpies, fa necessari el desenvolupament d'altres aproximacions terapèutiques per a LSDs amb afectació del SNC com la MPSIIIB. La limitació en l'accessibilitat al SNC deguda a la presència de la BHE, pot ser superada per molècules de baix pes molecular que poden creuar lliurement aquesta barrera. Així, la propietat de difusió lliure a través de la BHE que presenten els compostos de baix pes molecular és aprofitada per les teràpies basades en suplementos alimentaris rics en isoflavones, concretament en Genisteïna. Tot i la seva capacitat per creuar la BHE (Tsai, 2005; Kloska, 2012), la genisteïna ha demostrat una limitada eficàcia (en alguns casos nul·la) en millorar la funció cognitiva de pacients afectats de la Síndrome de Sanfilippo (Piotrowska, 2011; Delgadillo, 2011; de Ruijter, 2012). Altres tractaments alternatius actualment en desenvolupament com el transplantament de HSC, de hUCB o les teràpies d'augment d'activitat enzimàtica basades en xaperones es troben encara en fases experimentals i els resultats preliminars que se n'han publicat no mostren millores significatives respecte de la ERT en el tractament de la Síndrome de Sanfilippo (Ficko-Blean, 2008; Garvuzova-Davis, 2009; Lau, 2013).

Davant la necessitat de desenvolupar noves teràpies per al tractament de LSDs amb afectació del SNC, la teràpia gènica viral, concretament la teràpia gènica *in vivo*



basada en vectors AAV, es postula com una de les alternatives més atractives. Recentment, el nostre grup ha demostrat l'eficàcia terapèutica de l'administració al LCR d'un vector AAV9 codificant per l'enzim sulfamidasa en ratolins models de la MPSIIIA (Haurigot, 2013). Degut a la similitud entre la MPSIIIA i la MPSIIIB en quant a etiologia, patofisiologia i simptomatologia, el principal objectiu de la present tesi doctoral es va centrar en desenvolupar una aproximació de teràpia gènica basada en l'administració del vector viral AAV9 codificant per l'enzim NAGLU murí (AAV9-mNAGLU) a la cisterna magna de ratolins models de la MPSIIIB.

En primer lloc, es va dur a terme una avaluació de la biodistribució del vector viral AAV9-mNAGLU administrat directament al LCR via cisterna magna. Tant en ratolins mascles com femelles MPSIIIB, després de l'administració de  $3 \times 10^{10}$  vg/ratolí, es van detectar genomes virals a tot el SNC així com també en òrgans i teixits somàtics com el fetge o la melsa, responent a l'àmplia biodistribució i capacitat del serotip 9 per accedir a la circulació sanguínia quan és administrat al LCR. Es desconeix la via i el mecanisme exacte pel qual aquest vector viral pot passar a la circulació sanguínia un cop administrat al LCR, tot i que degut a l'estreta comunicació entre aquests dos medis, el pas es podria donar per diferents vies. Una d'elles podria ser a través de la BHE, ja que el AAV9 és capaç de creuar-la, i d'aquesta manera arribar a circulació sanguínia i distribuir-se per tot l'organisme. Un segon punt de comunicació entre el LCR i el torrent circulatori és a través de la barrera sang-LCR (Lattera, 1999), que ve donada pels capil·lars sanguinis localitzats als plexes coroïdals (Figura 9), encarregats de la producció del LCR. En aquest punt, també hi ha estreta comunicació entre el LCR i la sang, de manera que el plexes coroïdals suposen una important ruta per a l'intercanvi de substàncies entre aquests dos medis (Lattera, 1999). Aquest estret contacte, el podrien aprofitar els vectors virals per creuar aquesta barrera i assolir la circulació sanguínia. Una tercera via de comunicació és a través del sistema limfàtic (Boulton, 1996; Zakharov, 2003), ja que part del LCR també drena cap a aquest sistema, que alhora, acaba comunicant-se amb el sistema circulatori. Les partícules virals administrades al LCR podrien passar al sistema limfàtic, on una part podrien ser retingudes als nòduls limfàtics, com suggereixen els resultats de biodistribució del vector AAV9-mNAGLU, en què una part del vector és detectat als nòduls limfàtics mandibulars (Taula 6). Una altra part del vector podria seguir pel sistema limfàtic i acabar drenant a la sang. Per últim, el LCR també drena directament a la sang a través de les granulacions aracnoïdals del sinus sagital, fet que també podrien aprofitar els vectors virals per passar al sistema circulatori. De totes maneres, la via o

vies per les quals té lloc aquest pas són encara desconegudes i calen més estudis per tal d'elucidar-ne els mecanismes.

L'àmplia transducció observada a nivell de genomes virals al SNC del ratolí MPSIIIB es va traduir en un augment significatiu de l'activitat enzimàtica NAGLU al cervell, d'entre 4 a 8 vegades respecte de l'activitat mesurada en ratolins WT. Aquesta activitat incrementada al SNC va donar lloc a la normalització del contingut en GAGs de totes les zones del cervell analitzades. Aquest fet es va observar en més detall mitjançant imatges d'ultraestructura, on la disminució dels nivells de GAGs es va observar també en les cèl·lules glials perineuronals, que van veure corregides les inclusions citoplasmàtiques en ratolins MPSIIIB administrats amb el vector viral terapèutic en comparació amb els ratolins control de la injecció, administrats amb el vector viral Nul. La correcció de la distensió lisosòmica va ser quantificada a través d'anàlisis immunohistoquímiques contra la proteïna marcador de lisosomes LIMP-2. La quantificació de la senyal positiva per LIMP-2 va ser normalitzada en totes les regions del cervell analitzades de ratolins MPSIIIB tractats amb el vector viral terapèutic. El tractament també va donar lloc a la reversió de l'homeòstasi lisosòmica, normalitzant les activitats enzimàtiques d'altres enzims lisosòmics de degradació. A banda de la patologia d'acumulació lisosòmica, el tractament amb AAV9-mNAGLU també va permetre corregir la neuroinflamació característica del model animal, normalitzant la microgliosi i l'astrocitosi, aquesta última també descrita en avaluacions *post mortem* de pacients humans afectats de MPSIIIB (Tamagawa, 1985).

Els processos neuroinflamatoris amb activació de la micròglia han estat prèviament descrits i caracteritzats en el model murí de la MPSIIIB (Ohmi, 2003). Aquests estudis han demostrat l'existència d'estrès oxidatiu i de processos autoimmunitaris amb activació de cèl·lules de la micròglia com a processos clau en el desenvolupament de la patologia del SNC. L'anàlisi de l'expressió gènica al cervell de ratolins MPSIIIB duta a terme en la present tesi doctoral, també va posar de manifest el paper clau d'aquest tipus cel·lular en el desenvolupament de la patologia del SNC. Tot i observar-se una desregulació de gens implicats en estrès oxidatiu, immunitat o en la funció degradativa lisosòmica, prop del 50% dels gens diferencialment expressats al cervell de ratolins MPSIIIB-Nul estaven significativament enriquits en gens característics de cèl·lules de la micròglia. No obstant, el tractament intracisterna magna amb el vector AAV9-mNAGLU va donar lloc també a la normalització de l'expressió de la majoria d'aquests gens, de tal manera que el perfil d'expressió gènica dels ratolins MPSIIIB tractats va ser molt similar al perfil dels ratolins WT.

D'altra banda, estudis més recents d'expressió gènica al cervell i a nivell sanguini realitzats en el mateix model animal, demostren una desregulació significativa de gens relacionats amb la neurodegeneració (Naughton, 2013). Tot i que la patologia neurodegenerativa ha estat descrita en el ratolí MPSIIIB, amb l'anàlisi d'expressió gènica duta a terme en la present tesi doctoral, no es va poder observar cap gen amb expressió alterada relacionat amb aquest procés en el grup de ratolins MPSIIIB-Nul. Aquest fet podria ser degut a què la marcada sobreexpressió de gens immunitaris i de la micròglia puguin emmascarar variacions d'expressió més moderades de gens associats amb processos de neurodegeneració.

Alhora, molts dels gens sobreexpressats al cervell del ratolí MPSIIIB també s'han observat augmentats en models animals d'altres malalties com la MPSI (Ohmi, 2003) i la MPSVII (Parente, 2012), suggerint la participació de processos similars en el desenvolupament de la patologia del SNC en aquestes LSDs. Tot i així, el fenotip més sever s'ha observat en el ratolí MPSIIIB, en comparació amb els altres dos models (Parente, 2012). La diferència entre aquests 3 subtipus de MPS és el GAG acumulat, que en el cas de la MPSIIIB és el HS, fet que el situa com el possible desencadenant del major grau de severitat observat. Està descrit que el HS, a diferència d'altres GAGs, juga un paper important en la regulació de la plasticitat neuronal, que alhora està alterada en el cervell del ratolí MPSIIIB implicant una pèrdua en la capacitat de resposta al dany cel·lular (Li, 2002). A més, el HS també pot actuar com a receptor de baixa afinitat per FGF-2 (Factor de Creixement de Fibroblasts tipus 2) regulant el creixement i la proliferació astrocitària (Yayon, 1991). El FGF-2 té també una funció neuroprotectora i activadora de la proliferació neuronal, i s'ha trobat disminuït al cervell del ratolí MPSIIIB, el què explicaria l'elevada taxa d'apoptosi i la reducció de la proliferació neuronal observades en aquesta malaltia (Li, 2002). Per tant, aquestes observacions suggereixen un paper important del HS tant en el procés de neurodegeneració com en el de neuroinflamació.

Tot i així, l'estratègia terapèutica basada en l'administració intracisterna magna del vector viral AAV9-mNAGLU al LCR de ratolins MPSIIIB va permetre corregir la patologia del cervell, que alhora és l'òrgan més severament afectat en aquesta patologia.

L'elecció de l'administració del vector directament al LCR enlloc de fer-ho per via sistèmica es va fer principalment degut a l'impossibilitat de la majoria de serotips de AAV per creuar la BHE. Així, l'administració directa al SNC (intraparènquima o directament al LCR) resulta la via més efectiva per a l'administració dels vectors virals

terapèutics. Estudis previs en ratolins de la MPSIIIA mostren com l'administració intramuscular del serotip 1 o intravascular del serotip 8, codificants per la sulfamidasa murina, són capaços d'alleujar o de revertir la patologia somàtica, respectivament, tot i que sense eficàcia terapèutica al SNC (Ruzo, 2012a). Contràriament, la correcció somàtica sí que es veu acompanyada per una millora en la funció cognitiva dels ratolins models de MPSIIIA (Ruzo, 2012b) i MPSIIIB (Fu, 2011) quan són administrats per via intravenosa amb vectors AAV9 codificants per les corresponents proteïnes deficitàries. Aquesta correcció és atribuïble a la capacitat d'aquest serotip per creuar la BHE i transduir el SNC (Foust, 2009; Duque, 2009).

L'administració intravenosa de vectors virals, tot i tractar-se d'un mètode d'administració poc invasiu i que no requereix de procediments quirúrgics especials, no es presenta com la millor opció terapèutica per a malalties del SNC. D'una banda, hi ha l'inconvenient de l'escalabilitat de dosi per al tractament de pacients humans, ja que es fan necessàries elevades dosis virals. Aquest fet implica la producció de preparacions virals amb elevats títols de vectors AAV que alhora porten associat un elevat cost econòmic de producció. D'altra banda, un segon inconvenient recau en el fet que els vectors AAV administrats per aquesta via, poden ser retirats de circulació abans d'arribar al teixit diana degut a la presència de NAb's circulants contra determinats serotips de AAV, habituals en l'espècie humana (Boutin, 2010). Un tercer inconvenient implica l'activació del sistema immunitari degut a l'exposició sistèmica d'una elevada càrrega viral d'aquest tipus de vectors, que pot promoure una resposta immunitària amb activació de respostes cel·lulars amb limfòcits T CD8<sup>+</sup> (Manno, 2006; Mingozzi, 2007; Mingozzi i High, 2011) o limfòcits T CD4<sup>+</sup> (Murrey, 2014). La resposta cel·lular contra els AAV, però, és depenent de dosi (Manno, 2006) quan els vectors són administrats per via intravenosa, essent les dosis baixes capaces de no donar lloc a una resposta cel·lular citotòxica (Mingozzi i High, 2011).

Una segona raó per la qual es va escollir l'administració directa al LCR del vector AAV9-mNAGLU, va ser la de disminuir la dosi viral administrada per animal. Aquest tipus d'administracions resulten una bona alternativa tant per disminuir considerablement les dosis virals necessàries per obtenir un efecte terapèutic similar o comparable –la qual cosa també es tradueix amb un abaratiment significatiu dels costos i temps de producció dels vectors–, com per evitar l'activació del sistema immunitari, ja que el SNC es tracta d'un òrgan immunoprivilegiat. L'administració de vectors virals al SNC es pot dur a terme a través de dues vies principals: per punció al parènquima cerebral o bé per administració directa al LCR. El primer cas presenta la limitació de la difusió del vector viral respecte del punt d'injecció, ja que aquesta es veu

restringida, la qual cosa es tradueix amb un menor efecte terapèutic a igualtat de dosi en comparació a una administració directa al LCR (Cressant, 2004; Ciron, 2006; Ciron, 2009; Souweidane, 2010; Ellinwood, 2011). A més, degut a l'existència d'un límit en el nombre d'injeccions i de zones cerebrals en les quals la injecció es pot realitzar de forma segura, l'administració intraparènquima resulta poc eficient per a la transducció d'estructures més profundes del SNC (Souweidane, 2010). En aquest sentit, en un assaig clínic per a la malaltia de Canavan basat en l'administració intraparènquima de AAV2 codificant per l'enzim *Aspartoacilasa* (deficitari en aquesta malaltia) en pacients de la malaltia, no es va observar recuperació del cerebel ni del tronc encefàlic, fet atribuïble a la limitada difusió del vector viral i a la incapacitat per fer arribar l'enzim fins a aquestes estructures. En conseqüència, es va veure limitada l'eficàcia terapèutica a llarg termini (Leone, 2012). Per tant, les aproximacions de teràpia gènica basades en aquesta via d'administració fan necessàries múltiples injeccions a diferents profunditats del parènquima cerebral per tal d'assolir la màxima biodistribució i, conseqüentment, un major efecte terapèutic.

A diferència de la via intraparènquima, l'administració directa al LCR, molt menys invasiva, permet una major biodistribució del vector viral a tot el SNC (Passini, 2003; Fraldi, 2007; Fu, 2010; Samaranch, 2012; Dayton, 2012; Samaranch, 2013; Haurigot, 2013; Dirren, 2014; Bucher, 2014). En aquest tipus d'aproximacions, el LCR, que es troba envoltant tot el SNC, actua com a medi de transport per tal de facilitar la distribució del vector viral. Un dels punts més accessibles al LCR és la cisterna magna, localitzada a la part posterior del cervell dels vertebrats, entre la base del crani i la primera vèrtebra cervical, i a la qual s'hi pot accedir fàcilment a través del *foramen magnum*. La cisterna magna és fàcilment accessible en ratolins i gossos i la seva punció és utilitzada en medicina veterinària de forma rutinària per fer extraccions de LCR. En canvi, aquest no és un procediment estàndard en medicina pediàtrica humana degut a la petita mida de la cisterna magna en comparació a la dels animals i a la seva proximitat a centres vitals. D'aquesta manera, una via alternativa i segura per accedir i administrar compostos directament al LCR, entre ells vectors virals, és a través dels ventricles cerebrals laterals, ja que la ventriculostomia s'utilitza amb freqüència com a eina diagnòstica i terapèutica en medicina humana (American Association of Neurological Surgeons, 2006). En models animals i en termes de biodistribució de vectors virals al SNC quan són administrats al LCR, les administracions per via intracisterna o intraventricular són comparables i equivalents (Haurigot, 2013), facilitant la possible translacionabilitat d'aquesta ruta d'administració per a la clínica humana.

D'altra banda, a nivell somàtic, l'administració de vectors AAV9 al LCR també s'ha vist que és capaç de donar lloc a la transducció hepàtica i a la correcció de la patologia somàtica en el model murí de la MPSIIIA (Haurigot, 2013). De la mateixa manera, el tractament amb el vector viral AAV9-mNAGLU descrit en la present tesi doctoral va donar lloc a la transducció hepàtica i, conseqüentment, a un augment d'activitat NAGLU circulant. En el cas dels ratolins MPSIIIB mascles tractats amb el vector viral terapèutic, l'activitat enzimàtica tant hepàtica com circulant va experimentar un augment de 8 vegades respecte de l'activitat NAGLU mesurada en ratolins WT. En canvi, en el grup de femelles tractades, l'augment d'activitat hepàtica va ser de 2,5 vegades respecte de les femelles WT. Aquest augment, contràriament a l'observat en mascles, únicament va donar lloc a un increment d'activitat moderat del 30% respecte de l'activitat WT. La discordança entre l'activitat hepàtica i circulant ja ha estat prèviament descrita en el model murí de la MPSIIIA al nostre laboratori en una aproximació de teràpia gènica similar (Haurigot, 2013). Tot i aquestes diferències, l'enzim circulant en ratolins d'ambdós sexes (majoritàriament produït pel fetge) es va fer accessible a la resta d'òrgans i teixits somàtics, donant lloc a la normalització dels nivells de GAGs de la majoria d'ells. Tot i així, als ronyons i a la bufeta urinària només s'hi va observar una disminució del contingut en GAGs, sense assolir els nivells normals dels ratolins sans. Els ronyons ja han demostrat ser refractaris al tractament basat en aproximacions de teràpia gènica en aquest i d'altres models animals de LSDs (Dickson, 2008; Donsante, 2007; Fu, 2007; Garcia, 2007; McCarty, 2009; Fu, 2011; Ruzo, 2012a; Haurigot, 2013). Com en el cas del cervell, el tractament intracisterna magna també va donar lloc a la normalització de l'homeòstasi lisosòmica hepàtica, mostrant la correcció d'activitats enzimàtiques d'altres hidrolases àcides implicades en els processos de degradació lisosòmica.

Per tant, el fet d'observar correcció de la patologia somàtica tot i els baixos nivells d'activitat enzimàtica circulant posa de manifest que no cal assolir els valors d'activitat dels individus sans per donar lloc a una reversió de la patologia. Diversos estudis suggereixen l'existència d'un llindar d'activitat enzimàtica mínim en moltes LSDs per sobre del qual l'enzim lisosòmic és capaç de corregir l'acumulació lisosòmica patològica (Desnick, 2004; Donsante, 2007; Garcia, 2007; Valstar, 2010b). Aquest llindar se situa entre l'1% i el 10% de l'activitat normal tant en cultius cel·lulars (Desnick, 2004) com en models murins de MPSVII (Donsante, 2007) i MPSII (Garcia, 2007), així com també en pacients humans de MPSIIIA amb fenotip lleu (Valstar, 2010a). Per tant, s'acostuma a relacionar un llindar mínim del 5%-10% d'activitat enzimàtica com a mínima i necessària per donar lloc a una correcció o alentiment de la

patologia lisosòmica. L'existència d'aquest llindar explicaria l'evolució més lenta observada en els malalts amb les variants de MPSIIIB de fenotip atenuat (Moog, 2007; Valstar, 2010b), on l'activitat residual NAGLU seria capaç de fer front a l'acumulació sostinguda de GAGs lisosòmics i disminuir la progressió de la patologia.

L'activitat NAGLU circulant de ratolins MPSIIIB d'ambdós sexes administrats intracisterna magna amb el vector viral AAV9-mNAGLU es va mantenir en nivells estables i constants al llarg del temps. Així, ratolins MPSIIIB mascles de 20 mesos d'edat i femelles de 16 mesos (després de 18 mesos i 14 mesos d'haver rebut l'administració del vector viral, respectivament) seguien mostrant nivells circulants d'activitat NAGLU comparables als mesurats després de 3 mesos de tractament. Aquest fet està d'acord amb que una única administració del vector viral al LCR dona lloc a nivells constants i a llarg termini de producció de la proteïna terapèutica, la qual cosa implica que aquesta estratègia pot suposar el tractament de per vida, sense necessitat d'haver de realitzar re-administracions.

L'elevat increment suprafisiològic entre 4 i 8 vegades d'activitat NAGLU al SNC i al fetge, així com també al sèrum de ratolins mascles no van suposar un problema de toxicitat derivat de l'augment d'activitat enzimàtica i degradació excessiva de HS, ja que com totes les hidrolases àcides lisosòmiques, únicament esdevenen actives al pH àcid que els ofereix l'entorn lisosòmic, mentre que al pH sanguini o citosòlic es mantenen inactives (Cooper, 2000). Tot i així, davant els elevats nivells d'activitat NAGLU assolits, es fa necessari realitzar un estudi de dosi-resposta per tal de trobar la mínima dosi terapèutica que permeti disminuir la dosi viral fins a assolir aquella que doni lloc a una activitat enzimàtica suficient com per observar efectes terapèutics i correcció de la patologia tant somàtica com del SNC.

D'altra banda, cal destacar les diferències entre ratolins MPSIIIB mascles i femelles observades en l'activitat NAGLU circulant i hepàtica, degut a la seva importància de cara a la clínica humana. A nivell hepàtic, els nivells d'activitat NAGLU de les femelles tractades amb la mateixa dosi de vector que els mascles, mostren un augment més moderat, de 2,5 vegades respecte de les femelles WT. Alhora, aquest fet es tradueix en una disminució significativa de l'activitat NAGLU circulant, que no arriba a assolir els nivells normals d'un ratolí WT. Aquesta disminució ha estat ja prèviament observada en d'altres estudis similars amb transducció hepàtica de vectors AAV al fetge de models animals murins i canins (Ruzo, 2012b; Wang, 2005; Haurigot, 2013), on la disminució d'activitat associada a un menor grau de transducció hepàtica és independent del promotor o de la soca utilitzada (Ruzo, 2012a i 2012b; Davidoff,

2003). A més, estudis amb ratolins mascles castrats i consegüentment, amb baixos nivells de testosterona, mostren una disminució en la transducció hepàtica per AAV, mentre que femelles tractades amb testosterona mostren nivells de transducció hepàtica comparables als de mascles WT. Per tant, l'estudi suggereix un efecte androgènic en la transducció hepàtica per AAV (Davidoff, 2003). Tot i aquests estudis previs descrivint una menor transducció hepàtica, en els resultats presentats en aquesta tesi doctoral no s'observen diferències significatives entre mascles i femelles en la biodistribució del AAV9-mNAGLU al fetge. Per tant, tot i mostrar uns nivells de partícules virals hepàtiques similars, l'activitat NAGLU en aquest òrgan i circulant es veu reduïda en les femelles en comparació amb el grup de mascles. Aquest resultat està d'acord amb els resultats obtinguts recentment pel nostre grup en el model murí de la MPSIIIA (Haurigot, 2013), on tot i presentar nivells comparables de genomes virals al fetge entre mascles i femelles, l'activitat enzimàtica tant hepàtica com circulant també es veuen reduïdes.

Les diferències de gènere en la transducció del fetge podrien suposar un inconvenient a l'hora de tractar nenes afectades de MPSIIIB. Tot i així, un estudi recent realitzat en primats no humans mostra com la els nivells de transducció hepàtica assolits amb vectors AAV administrats per via intravenosa no es veuen alterats entre mascles i femelles (Binny, 2012). Aquests resultats juntament amb la proximitat filogenètica entre els l'espècie humana i els primats no humans, suggereixen que no cal dissenyar protocols específics amb andrògens en pacients femenines per tal d'assolir nivells de transducció hepàtica similars als de pacients masculins (Binny, 2012). Per tant, es posa de manifest la importància a l'hora d'escollir l'espècie animal d'estudi en els assajos preclínics.

La correcció dels problemes de comportament associats a la patologia així com també la millora en la supervivència són dos dels paràmetres que es tenen en major consideració a l'hora d'avaluar l'efectivitat d'una teràpia, i que alhora tenen un major impacte clínic. En aquest estudi s'ha demostrat com a partir d'una única administració al LCR del vector viral AAV9-mNAGLU s'ha assolit un augment significatiu de la supervivència dels ratolins MPSIIIB tractats a més de veure's corregides també les principals alteracions de comportament, després de 3 mesos de tractament. Per tant, a banda de la correcció observada a nivell cel·lular, aquesta també es va donar a nivell funcional. Tot i així, cal destacar que els resultats obtinguts amb la prova de l'*Open-field* són oposats als observats per gran part dels grups amb el mateix model animal o en models animals d'altres MPS (Cressant, 2004; Heldermon, 2007; Canal, 2010; Langford-Smith, 2011), en particular pel què fa a l'activitat exploratòria. Aquests grups



han descrit un comportament més hiperactiu dels ratolins malalts en comparació amb els ratolins control, característica oposada a les observacions obtingudes en la present tesi doctoral. Les diferències d'edat, de sexe i sobretot, les diferents condicions ambientals d'establució i les condicions en les quals es realitzen aquests estudis de comportament podrien explicar les diferències observades entre grups.

D'aquesta manera, el conjunt de resultats observats en el model murí de la MPSIIIB, van mostrar com la teràpia gènica pot oferir una via alternativa per al tractament de la MPSIIIB, extrapolable a d'altres LSDs. L'avantatge d'aquesta aproximació resideix en el fet que no cal una transducció del vector viral del 100% de les cèl·lules afectades, ja que els enzims lisosòmics solubles, gràcies als residus de M6P que els caracteritzen, poden ser secretats al torrent circulatori i ser reconeguts pels receptors de M6P de totes les cèl·lules de l'organisme que expressin aquest receptor a la membrana plasmàtica (Desnik i Schuchman, 2002; Enns i Huhn, 2008). Tot i així, un dels inconvenients d'aquest tipus de teràpies recau en el tractament de les LSDs causades per defectes en enzims lisosòmics de membrana, que al no adquirir la M6P terminal, no són secretats al medi extracel·lular, i per tant no poden ser captats per cèl·lules veïnes. En aquests casos, caldria desenvolupar una estratègia terapèutica diferent destinada a la transducció del màxim nombre de cèl·lules afectades possible, tant a nivell central com somàtic, per tal d'assolir el major nombre possible de cèl·lules amb la còpia correcta del gen deficitari.

Un segon inconvenient que es pot presentar en les teràpies basades en el subministrament de la forma corregida de la proteïna deficitària (ja sigui per ERT o per aproximacions de teràpia gènica), és el rebuig d'aquesta en pacients amb mutacions sense sentit. La proteïna corregida pot exposar epítops que el sistema immunitari del pacient no reconegui com a propis, i en conseqüència es podria generar una resposta immunitària humoral contra l'enzim lisosòmic, eliminant-lo de l'organisme i disminuint els efectes terapèutics fent inútil la teràpia.

Un cop provada l'eficàcia terapèutica del tractament intracisterna amb AAV9-mNAGLU en el model murí de la MPSIIIB, es va voler avaluar la translacionabilitat del procés en un model animal més gran. La validació en models animals grans de les aproximacions de teràpia gènica que hagin demostrat la seva eficàcia en models murins com el ratolí, suposa un pas essencial i necessari per tal d'avançar cap a la clínica humana. El gos, com a model animal, ha estat àmpliament utilitzat per a aquestes finalitats, principalment com a bon model per a l'estudi de la farmacocinètica i

biodistribució de vectors AAV9 quan aquests són administrats directament al LCR per via intracisterna o als ventricles laterals del cervell (Haurigot, 2013).

A banda dels models canins, altres models animals han estat utilitzats per a estudis farmacocinètics i de biodistribució dels AAV quan són administrats directament al LCR (Samaranch, 2012; Gray, 2013; Passini, 2014). Aquests estudis s'han realitzat en primats, i en conjunt suggereixen que l'administració directa de AAV al LCR permet la transducció difusa de diferents àrees del cervell i de la medul·la espinal amb unes dosis que són escalables per a animals més grans i per a humans. L'inconvenient d'utilitzar els primats com a model animal per a l'estudi de la transducció del SNC amb AAV és la seva mida. En general són animals petits (d'entre 3 i 6 kg), la qual cosa també comporta una mida de cervell més petita respecte del cervell humà, que alhora permet una difusió dels AAV cap a zones més profundes del cervell. Aquest fet dificulta establir una bona correlació de la difusió d'aquests vectors virals en cervells d'animals més grans i, en conseqüència, també en cervells humans. En aquest sentit, també s'han dut a terme administracions intratecals de AAV9 a nivell lumbar en animals de major mida, concretament en porcs, on s'ha observat una àmplia biodistribució del vector al llarg de la medul·la espinal, tot i que els màxims nivells de transducció es localitzen al voltant del punt d'administració, amb una disminució progressiva de cèl·lules transduïdes en relació a la distància al punt d'injecció (Federici, 2011). Aquest fet suggereix també una menor transducció del cervell.

El gos ofereix certes avantatges respecte d'altres models. En primer lloc, el gos ha demostrat ser un bon model que permet predir els resultats obtinguts posteriorment en assajos clínics de protocols de teràpia gènica en humans, com en el cas de l'hemofília o l'Amaurosi Congènita de Leber (Gonin i Gaillard, 2004; Manno, 2006; Casal i Haskins, 2006). En segon lloc, la mida mitjana d'un gos adult (12 kg) és més rellevant de cara a la població d'estudi, en aquest cas nens afectats per la MPSIIIB, que d'altres models animals, com ho poden ser els porcs o els models primats no-humans. A més, els gossos suposen el pas lògic entre els 25 grams de pes d'un ratolí i els 13 – 17 kg de pes d'un nen d'entre 2 i 5 anys. En tercer lloc, la punció intracisterna magna en gossos és una pràctica veterinària relativament comú. Per últim, a diferència del cervell murí, la mida del cervell d'un gos adult, més semblant a la d'un nen, pot suposar una predicció més acurada dels efectes de la penetració i biodistribució dels AAV al parènquima cerebral després de la seva administració directa al LCR. Per aquestes raons, la predicció en la biodistribució del vector viral administrat a la cisterna magna en el gos seria més propera que en models primats no humans.

En el cas dels humans, tot i no haver-hi dades de biodistribució de AAV9 quan és administrat al LCR, sí que es disposa de dades de biodistribució de compostos dipositats al LCR que podria significar una primera aproximació per tal de predir la localització dels vectors virals al LCR. En un estudi en el qual s'avalua l'eficàcia de les teràpies basades en l'administració d'aminoglicòsids, aquests són detectats en molt baixa quantitat als ventricles cerebrals quan són administrats al LCR a nivell lumbar, mentre que quan són administrats als ventricles cerebrals, es poden detectar a elevades concentracions tant a nivell dels propis ventricles com a nivell lumbar, indicant que la via intraventricular pot donar lloc a una millor distribució dels productes administrats per aquesta via al LCR (Cook, 2009).

Recentment, el nostre grup ha publicat un estudi on es demostra que el patró de biodistribució del vector viral AAV9 quan és administrat directament al LCR a través de la cisterna magna de gossos *Beagle* adults, és molt semblant a l'observat en el model murí (Haurigot, 2013). S'observa transducció de diferents tipus cel·lulars del cervell i del fetge així com també la detecció al cervell de la proteïna per la qual codifiquen (Haurigot, 2013). En el mateix estudi es demostra la capacitat de transducció del vector AAV9 al SNC quan és administrat al LCR, independentment de l'existència d'anticossos neutralitzants (NAbs) circulants contra les proteïnes de la càpsida viral.

Els AAV són virus no patogènics però que no obstant, una gran majoria de la població és seropositiva per algun dels serotips, amb prevalença variable de NAbs en funció del serotip. Sembla que hi ha un fenomen de seroconversió amb l'edat, de manera que els nens menors de 2 anys solen ser seronegatius per la majoria de serotips i els títols de NAbs augmenten progressivament amb l'edat, generalment a l'inici de l'escolarització (Calcedo, 2011). El AAV que mostra una major seropositivitat a la població sana és el AAV2, amb aproximadament el 60% de la població seropositiva per aquest serotip, mentre que només un 30% ho és per AAV9, i amb títols de NAbs significativament més reduïts (Boutin, 2010).

La presència de NAbs circulants contra determinats serotips de AAV, suposa el principal factor limitant en els tractaments de teràpia gènica basats en l'administració intravenosa de AAV (Manno, 2006; Scallan, 2006), ja que dóna lloc a l'eliminació del vector viral circulant, evitant així la transducció d'òrgans i teixits, i consegüentment impedeix l'expressió de la proteïna terapèutica a nivell sistèmic, com suggereixen estudis recents realitzats en models animals primats no humans després de ser administrats per via intravenosa amb AAV9 (Gray, 2011; Murrey, 2014). En el cas concret de la teràpia basada en l'administració d'un vector viral AAV9 codificant per la

NAGLU humana directament al LCR, la neutralització de les partícules virals de la sang, comportaria la impossibilitat de corregir la patologia somàtica en tots aquells òrgans i teixits somàtics no transduïts pel vector. Per aquesta raó, és de vital importància evadir la resposta immune iniciada per aquests anticossos per tal d'assegurar la màxima biodistribució del vector.

La principal alternativa per tal d'evitar o atenuar la resposta immunitària en el tractament de pacients humans és la immunosupressió dels mateixos prèvia a l'administració del vector viral, com ja es duu a terme en diferents estudis clínics basats en l'administració de AAV (Ferreira, 2014; Tardieu, 2014). Aquesta immunosupressió, a diferència del transplantament d'òrgans o de les malalties autoimmunitàries, és transitòria. Tot i així, hi ha d'altres alternatives que han mostrat ser efectives. D'una banda, el disseny de nous vectors virals amb petites variacions de les proteïnes de la càpsida proteica s'estan desenvolupant per tal de superar aquest inconvenient (Bartel, 2011). Recentment també s'estan desenvolupant estratègies alternatives per tal de disminuir al màxim els títols de NAbs circulants. Una d'aquestes estratègies consisteix en fer varis cicles de plasmafèresi previs a l'administració del vector viral, que ha demostrat ser efectiva en reduir els títols circulants de NAbs (Monteilhet, 2011). Una segona alternativa recentment avaluada es basa en la co-administració de càpsides buides juntament amb els vectors virals codificants per la proteïna terapèutica (Mingozzi, 2013). D'aquesta manera, les càpsides buides administrades a nivell sistèmic actuarien unint el màxim nombre d'anticossos circulants permetent una major biodisponibilitat de vectors virals terapèutics. Aquesta estratègia permetria una millora en la transducció viral a nivell somàtic. Tot i així, dosis elevades de càpsides podrien donar lloc a una activació immunitària de cèl·lules T contra la càpsida proteica, la qual cosa limitaria i eliminaria la duració d'una posterior expressió gènica (Mingozzi i High, 2013). A més a més, la co-administració genera una situació de competència per unió el receptor cel·lular del AAV, per la qual cosa la transducció cel·lular per part del vector terapèutic es podria donar de forma menys eficient (Masat, 2013).

Per tant, es fa imprescindible la recerca de mètodes basats en evadir la resposta immunitària contra els tractaments de teràpia gènica per tal de minimitzar l'aparició d'efectes secundaris no desitjats i poder incloure en els diferents estudis al major nombre de malalts possible. Per aquest raó, és necessari detectar i diagnosticar la malaltia amb celeritat i a una edat primerenca, quan els nens encara no han tingut contacte amb els AAV salvatges i no han desenvolupat encara anticossos contra els diferents serotips.

Tot i així, l'asimetria entre el contingut de NAbs de la sang i del LCR, essent molt més baixos i pràcticament indetectables al LCR (Gray, 2013; Haurigot, 2013), permet que les aproximacions de teràpia gènica basades en l'administració al LCR de AAV sigui factible i suposi un nou avantatge respecte de l'administració intravascular.

Per aquesta raó, en l'última part de la present tesi doctoral es va escollir el gos *Beagle* com a espècie intermèdia entre la murina i la humana per a l'estudi d'expressió de la proteïna NAGLU quan aquesta es administra a través d'un AAV9 directament al LCR. En aquest sentit, el vector codificant per la NAGLU canina optimitzada es va administrar per via intracisterna magna i se'n va valorar la seva expressió a llarg termini al LCR de gossos *Beagle* adults amb i sense prèvia immunització contra AAV9.

Els resultats obtinguts van demostrar com la presència d'elevats títols de NAbs circulants contra AAV9 no tenien efecte inhibitori en els nivells de transducció del SNC, ja que els l'activitat NAGLU canina assolida al LCR va ser indistingible en tots els gossos. Els nivells d'activitat NAGLU al LCR van assolir un pic d'expressió passades 2 setmanes post-administració intracisterna del vector viral AAV9-cNAGLU, disminuint lleugerament en les setmanes següents fins assolir un estat de *plateau*, que es va mantenir fins al final del període d'estudi. Aquest resultat està d'acord amb altres estudis realitzats tant en models canins com també en primats, en els quals la presència de NAbs tot i ser elevada a nivell sanguini, és molt més reduïda o inexistent al LCR, per la qual cosa no es veu disminuïda la transducció del SNC (Gray, 2013; Haurigot, 2013; Passini, 2014). En l'estudi de Haurigot i col·laboradors, també es van mesurar els títols de NAbs contra AAV9 en pacients de MPSIIIA, on es va poder observar l'asimetria entre els títols sanguinis i del LCR. Aquest fet posa de manifest la integritat de la BHE en aquesta patologia, fet que ha estat en controvèrsia, ja que alguns estudis apunten a alteracions en aquesta estructura en pacients de MPSIII (Garbuzova-Davis, 2013).

Els resultats obtinguts amb el model caní van demostrar que l'administració del vector viral AAV9-cNAGLU a la cisterna magna era segura, ben tolerada i va donar lloc a la transducció del SNC, la qual va ser independent dels títols circulants de NAbs contra aquest serotip. Alhora, el tractament va permetre l'expressió a llarg termini i secreció al LCR de la proteïna NAGLU específica d'espècie.

Així, el conjunt de resultats observats tant en el model murí com en el caní demostren l'eficàcia de la teràpia gènica per a la MPSIIIB, basada en l'administració directa al LCR a través de la cisterna magna del vector viral AAV9 codificant per l'enzim NAGLU. De tota manera, la teràpia en ratolins MPSIIIB s'ha dut a terme en

animals joves, de 2 mesos d'edat, en els quals la malaltia ja està totalment establerta a aquesta edat. Un ratolí de dos mesos s'estima que equivaldria a un ésser humà adolescent d'entre 12 i 16 anys (Barrow, 2007), per la qual cosa el tractament descrit podria aplicar-se en pacients d'aquesta edat donant lloc a una possible reversió del fenotip. No és possible, però dur a terme una predicció dels possibles efectes de la teràpia en pacients amb la patologia en estat més avançat. En aquests pacients on les alteracions somàtiques i la mort neuronal ja es troben en un estadi més avançat, es desconeix si el tractament proposat podria donar lloc a una possible reversió o millora. En aquest sentit, caldria realitzar estudis preclínic en models animals de la malaltia d'edat avançada i determinar quin efecte tindria el tractament intracisterna sobre el contingut en GAGs dels diferents teixits, però principalment caldria determinar l'efecte a nivell funcional i cognitiu, i sobretot l'efecte sobre la supervivència.

Per tant, la correcció observada tant al SNC com a nivell somàtic en el model murí de la MPSIIIB després d'una única administració al LCR del vector viral AAV9-mNAGLU, suggereix un efecte capaç de revertir la patologia quan aquesta ja està establerta. En concordança amb aquests resultats, la teràpia gènica també ha donat lloc a la reversió del fenotip en el context d'altres LSDs, com en el cas de l'Adrenoleucodistrofia metacromàtica o de la MPSIIIA en els respectius models murins de les malalties (Biffi, 2006; Haurigot, 2013). Aquests estudis són de gran importància de cara a la possible aplicació clínica dels tractaments de teràpia gènica en pacients amb la malaltia ja establerta. Tot i així, es fan necessaris més estudis per tal de determinar si existeix un *punt de no retorn* a partir del qual els efectes de la patologia, sobretot a nivell del SNC, es pot revertir.

Així, en aquest treball s'ha posat de manifest el potencial terapèutic de l'administració de vectors AAV9 codificants per la proteïna NAGLU directament al LCR per corregir la patologia neurològica i somàtica de la MPSIIIB. La correcció de les alteracions neurològiques, les més incapacitants en aquesta patologia, s'ha donat independentment del sexe. D'altra banda, també s'ha demostrat la capacitat d'aplicar una teràpia similar en models animals grans, la qual suggereix la possible translacionabilitat cap a la clínica humana. Per aquestes raons, l'estratègia terapèutica descrita, pot representar un possible tractament, no només per a la MPSIIIB, sinó que també per a d'altres malalties d'acumulació lisosòmica amb afectació neurològica i somàtica.

## ***VI. Conclusions***

1. El model murí de la MPSIIIB ja presentava la patologia neurològica i somàtica totalment establerta als 2 mesos d'edat, amb acumulació de GAGs a tots els òrgans i teixits, i amb alteracions del comportament. Les alteracions conductuals es van accentuar amb l'edat.
2. L'administració directa al LCR de vectors AAV9 codificants per l'enzim NAGLU murí a la cisterna magna de ratolins MPSIIIB, va donar lloc a la transducció eficient, no només del Sistema Nerviós Central i Perifèric, sinó que també del fetge.
3. El tractament amb el vector viral AAV9-mNAGLU en ratolins MPSIIIB amb la patologia ja establerta, va donar lloc a un augment de l'activitat enzimàtica al cervell que va permetre la correcció de l'acumulació de GAGs, de la distensió lisosòmica, de la neuroinflamació, de l'homeòstasi lisosòmica i de l'expressió gènica alterada en aquest òrgan.
4. L'administració el vector AAV9-mNAGLU en ratolins MPSIIIB va donar lloc a l'augment d'activitat NAGLU hepàtica i circulant, la qual va permetre la correcció de l'acumulació de GAGs i de la distensió lisosòmica de la majoria d'òrgans i teixits somàtics, així com també de l'hepatomegàlia i de l'homeòstasi lisosòmica en aquest òrgan.
5. A més, en els ratolins MPSIIIB tractats amb el vector AAV9-mNAGLU, l'activitat NAGLU circulant va mostrar nivells constants al llarg de la vida dels ratolins.
6. Totes aquestes millores observades després del tractament amb el vector AAV9-mNAGLU a la cisterna magna de ratolins MPSIIIB, van resultar en la correcció de



les alteracions del comportament característiques del model animal i a un augment significatiu de la supervivència.

7. L'administració a la cisterna magna del vector AAV9 codificant per la proteïna NAGLU canina va comportar un augment significatiu i estable a llarg termini d'activitat enzimàtica al LCR dels gossos *Beagle* tractats.
8. Independentment dels títols sanguinis d'anticossos neutralitzants contra la càpsida del vector AAV9, l'activitat NAGLU al LCR resultant de la transducció del cervell pel vector AAV9-cNAGLU no es va veure alterada.
9. En resum, els resultats observats en aquest treball podrien establir les bases cap a la translacionabilitat d'una estratègia de teràpia gènica basada en l'administració al LCR del vector viral AAV9 codificant per la proteïna NAGLU, per al tractament de la patologia neurològica i somàtica característiques dels pacients de mucopolisacaridosi tipus IIIB.

## ***VII. Materials i Mètodes***

## 1. MATERIALS

### 1.1. Animals

Per al desenvolupament d'aquest treball, es van utilitzar els següents animals:

**(a)** Ratolins *knockout* (KO) per al gen *Naglu* es van adquirir a *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, Maine, EEUU), sota B6.129S6-*Naglu*<sup>tm1Efn</sup>/J. Es tracta de KO induïts per mutagènesi del gen *Naglu*, en els quals, es va utilitzar el gen de resistència a la neomicina per a la disrupció d'una porció de l'exó 6 (Li, 1999).

Els ratolins es van mantenir estabulats en instal·lacions específiques lliures de patògens (SER-CBATEG), sota condicions controlades de temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) i d'il·luminació (12 hores de llum i 12 de fosc, amb encesa de les llums a les 8 del matí), i amb accés lliure a aigua i menjar (dieta estàndard 2018S Teklad Global, Harlan Teklad, Madison, Wisconsin, EEUU).

A les instal·lacions del SER-CBATEG es va establir la colònia de ratolins KO per al gen *Naglu* mitjançant creuaments entre ratolins heterozigots per la mutació.

Ratolins sans i KO van ser utilitzats per als estudis preclínic de biodistribució del vector viral AAV9-mNAGLU, i per als estudis d'eficàcia del tractament intracisterna magna del mateix vector viral.

**(b)** Gossos adults de la raça *Beagle* per a l'estudi dels efectes de la immunitat preexistent contra AAV9, es van adquirir a Isoquimen S.L. (Sant Feliu de Codines, Barcelona, Espanya).

Els gossos es van mantenir estabulats a les instal·lacions de les Gosses pertanyents al Servei de Granges i Camps Experimentals de la UAB, amb accés a menjar un cop al dia (dieta estàndard) i accés lliure a aigua.

El benestar animal i els procediments experimentals van ser prèviament avaluats, aprovats i autoritzats per la Comissió d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana de la UAB.

## 1.2. Soques bacterianes

Es va utilitzar la soca bacteriana de *E. coli* XL2-blue (Stratagene) per a l'obtenció dels diferents plasmidis desenvolupats en la present tesi doctoral. Tots els plasmidis contenien el gen de resistència a ampicil·lina per a la seva selecció, per la qual cosa els cultius bacterians es van fer créixer en medi de cultiu LB (Miller's LB Broth, Conda, Madrid) en presència de 50 µg/ml d'ampicil·lina. Quan les condicions experimentals van requerir de medi de cultiu sòlid, un 2% d'agar es va afegir al medi LB.

## 1.3. Anticossos

Els anticossos detallats a la següent taula van ser utilitzats per a la detecció de proteïnes per mitjà d'anàlisi immunohistoquímica:

Anticòs	Hoste	Proveïdor	Referència
<b><i>Anticossos primaris</i></b>			
Anti-LIMP2	Conill	<i>Novus Biologicals</i>	NB400-129
Anti-GFAP	Conill	<i>DakoCytomation</i>	Z0334
Anti-LAMP1	Rata	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	sc-19992
Lectina BSI-B4	-	<i>Sigma</i>	L5391
<b><i>Anticossos secundaris</i></b>			
Goat anti-Rabbit IgG Biotin conjugate	Cabra	<i>Pierce</i>	31820
Rabbit anti-Rat IgG Biotin conjugate	Conill	<i>DakoCytomation</i>	E0467

## 1.4. Plasmidis

Els plasmidis utilitzats en aquest estudi per al posterior desenvolupament de vectors virals es detallen en la següent taula:

Plasmidi	Promotor	Insert	Senyal de poliadenilació
pAAV-CAG-mNAGLU	CAG	NAGLU murina optimitzada	β-globina de conill
pAAV-CAG-cNAGLU	CAG	NAGLU canina optimitzada	β-globina de conill
pAAV-CAG	CAG	-	β-globina de conill

El plasmidi pAAV-CAG (plasmidi Nul, el qual no codifica per cap proteïna) ja havia estat generat prèviament al nostre laboratori. Aquest plasmidi conté les ITR del AAV2 i el promotor CAG, un promotor híbrid format pel promotor de la  $\beta$ -actina de pollastre, pel primer intró del gen de la  $\beta$ -globina humana i per l'*enhancer* del citomegalovirus.

### **1.5. Reactius**

Tots els reactius de biologia molecular es van obtenir a partir dels fabricants comercials següents: *Roche* (*Roche Diagnostics Corp*, IN, EEUU), *Invitrogen Corporation* (ara *Life Technologies*) (San Diego, CA, EEUU), *Bio-Rad Laboratories* (Hercules, CA, EEUU), *Amersham Biosciences* (Piscataway, NJ, EEUU), *Sigma* (St.Louis, MO, EEUU), *Promega Corporation* (Madison, WI, EEUU), *Qiagen* (Hilden, Alemanya), i *Fermentas* (St. Leon-Rot, Alemanya).

## 2. MÈTODES

### 2.1. Tècniques de manipulació del DNA

#### 2.1.1. Preparació de DNA plasmídic

Les minipreparacions de DNA plasmídic es van dur a terme mitjançant un protocol basat en lisi alcalina prèviament descrit (Birnboim and Doly, 1979). Quan es van fer necessàries majors quantitats de DNA, es van utilitzar els kits comercials *PureYield™ Plasmid MaxiPrep System (Promega Corporation)* i *EndoFree Plasmid Mega/Giga Kit (Qiagen)*.

#### 2.1.2. Digestió del DNA amb enzims de restricció

Cadascun dels enzims de restricció utilitzats requerien d'unes condicions de reacció específiques pel què fa a pH, força iònica, temps i temperatura de digestió. Per tant, en cada cas específic es van seguir les instruccions dels proveïdors (*New England Biolabs, Roche* o *Fermentas*). En termes generals, el DNA va ser digerit mitjançant 0,5 unitats d'enzim per µg de DNA, en un temps de 2 hores i amb el tampó específic per cada cas. Els productes de digestió es van analitzar mitjançant gels d'agarosa a l'1% w/v. Quan es va fer necessària la utilització de dos enzims de restricció, ambdues digestions es van dur a terme simultàniament si els 2 enzims actuaven amb igual eficiència a igualtat de tampó i temperatura. Si els enzims tenien requeriments diferents, després de la primera digestió es va purificar el DNA per tal d'eliminar-ne sals, enzims i d'altres, mitjançant el kit comercial *GeneJET™ Gel Extraction kit (Fermentas)*, seguint les instruccions del proveïdor. Finalment, el DNA va ser eluït en 30 µg d'aigua i posteriorment digerit amb el segon enzim de restricció.

#### 2.1.3. Lligació de fragments de DNA

La *T4 DNA ligase (New England Biolabs)* es va utilitzar per a les reaccions de lligació seguint les instruccions de la casa comercial. Les reaccions de lligació es van dur a terme amb el tampó de lligació específic suplementat amb ATP durant 2-3 h a temperatura ambient.

#### 2.1.4. Purificació i resolució del DNA

Per a la separació i purificació dels fragments de DNA es van utilitzar electroforesis en gels d'agarosa a l'1% w/v. La localització i mida relativa dels fragments de DNA es va determinar per tinció del gel amb baixes concentracions de bromur d'etidi, un agent intercalant de DNA. Els diferents fragments de DNA es van visualitzar amb llum ultraviolada de baixa longitud d'ona (320 nm) mitjançant una càmera integrada en un transil·luminador (*Syngene, Synoptics Ltd., Cambridge, Regne Unit*). Com a marcadors de pes molecular es van utilitzar els marcadors comercials *DNA ladder 1 kb* i *DNA ladder 100 bp* (Invitrogen).

Prèviament, els gels havien estat preparats per dissolució de l'agarosa en buffer d'electroforesi 1x TAE (Tris-acetat pH 8,3, 40 mM i EDTA 1 mM) juntament amb 0,5 µg/ml de bromur d'etidi. Les mostres es van carregar al gel amb tampó de càrrega 10x (*Invitrogen*) i la separació del DNA es va dur a terme en el tampó d'electroforesi 1x TAE a 90 V.

Quan es feia necessària l'extracció i purificació d'algun dels fragments de DNA separats, aquesta es realitzava amb el kit comercial *GeneJET™ Gel Extraction kit* (*Fermentas*). Finalment, la quantificació del DNA es duia a terme en un espectrofotòmetre (*Nanodrop 1000 spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, EEUU*).

#### 2.1.5. Transformació de cèl·lules competents

El DNA plasmídic es pot introduir en bacteris elèctricament competents per un procés de transformació elèctrica o electroporació. Un volum de 40 µl de cèl·lules competents XL2-blue ( $2 \times 10^{10}$  cèl·lules/ml) es va mantenir en gel prèviament a la transformació, realitzada amb 10 ng de DNA en un volum final d'1 µl. Cèl·lules i DNA es van mantenir en gel durant 5 minuts, i posteriorment es va dur a terme l'electroporació a 2500 V mitjançant un electroporador (*Bio-Rad*). A continuació, 200 µl de medi LB preescalfat a 37°C es va afegir a la solució d'electroporació. Finalment, es va realitzar la sembra en placa sobre medi LB amb l'antibiòtic apropiat.

## 2.2. Tècniques d'obtenció i manipulació del RNA

### 2.2.1. Aïllament i purificació de RNA total

Per a l'aïllament de RNA total, es va partir de 250 mg de teixit cerebral de ratolí, que va ser disgregat mecànicament amb un politró *T10 standard ULTRA-TURRAX®* (IKA®-Werke GmbH & Co., Alemanya) seguint les instruccions del *kit* comercial *mirVana™ miRNA Isolation Kit* (Ambion – Life Technologies). Aquest *kit* es basa en una extracció orgànica del RNA seguida per una purificació amb filtres i solucions de rentat específiques.

### 2.2.2. Microxips d'expressió

L'anàlisi d'expressió gènica es va realitzar mitjançant la tecnologia *GeneChip®* (Affymetrix®, Santa Clara, CA, EEUU), i tant el processament de les mostres així com també la hibridació, el revelat i l'escanejat dels xips es va dur a terme seguint els protocols i amb l'equipament recomanats per Affymetrix, per part de Progenika Biopharma (Bizkaia, Espanya). Breument, el RNA total obtingut segons l'apartat 2.2.1 va ser analitzat per valorar la seva qualitat mitjançant l'*Agilent® Bioanalyzer*, obtenint RINs (*RNA Integrity Numbers*) superiors a 8 per totes les mostres. Es va sintetitzar el corresponent cDNA, que posteriorment va ser utilitzat per a la hibridació dels microxips *GeneChipMouse Gene 2.1 ST 16 arrayplate*. Aquests inclouen sondes destinades a detectar tant mRNA com també transcrits de RNA intergènics no codificants. Tots els xips van superar un extens control de qualitat dels resultats fent servir l'eina online *arrayanalysis* (<http://www.arrayanalysis.org>). La normalització es va fer mitjançant el mètode RMA (*Robust Multiarray Averaging*) fent servir l'eina *Affymetrix® Expression Console™*, obtenint els valors normalitzats i  $\log_2$  transformats. Aquestes dades es van filtrar per tal d'eliminar les sondes corresponents a RNA no codificants, obtenint una llista inicial de 26688 gens, els quals es van filtrar una segona vegada per tal d'eliminar els gens amb una variància per sota del percentil 75. Aquest procés va generar una llista de treball de 6672 gens. Per obtenir els gens expressats diferencialment es va establir un criteri de FDR (*False Discovery Rate*)  $< 0,1$  amb una confiança del 80%. Per l'anàlisi de *clustering*, les dades van ser estandarditzades i representades en forma de *heatmap* fent servir el *software J-Express Pro* ([jexpress.bioinfo.no](http://jexpress.bioinfo.no)). L'anàlisi funcional es va realitzar a partir dels gens diferencials mitjançant l'eina *Genecodis 2.0* ([genecodis2.dacya.ucm.es](http://genecodis2.dacya.ucm.es)).



### 2.3. Construcció de plasmidis

Les estratègies de clonatge utilitzades per a cadascun dels plasmidis utilitzats en aquest treball es detallen a continuació:

Plasmidi	Font
<b>pAAV-CAG-mNAGLU</b>	Vector pAAV-CAG (CBATEG) digerit amb <i>EcoRI</i> i <i>MluI</i>
	Insert pMA-RQ-mNAGLU_1039160 (GeneArt, Life Technologies) digerit amb <i>EcoRI</i> i <i>MluI</i>
<b>pAAV-CAG-cNAGLU</b>	Vector pAAV-CAG (CBATEG) digerit amb <i>EcoRI</i> i <i>MluI</i>
	Insert pMK-RQ-DogNAGLU_13AAG7NP (GeneArt, Life Technologies) digerit amb <i>EcoRI</i> i <i>MluI</i>
<b>pAAV-CAG</b>	Vector pAAV-CAG (CBATEG). Plasmidi Nul, no codificant per a cap proteïna

#### 2.3.1. Optimització de seqüències de DNA

Previ a la construcció dels plasmidis amb les versions optimitzades de la NAGLU canina i murina, es van dissenyar i obtenir les corresponents seqüències codificants optimitzades. La optimització de seqüència (*GeneArt*®, *Life Technologies*) es va dur a terme per tal de maximitzar l'eficiència de producció de la NAGLU murina i canina en ratolins i gossos, respectivament. La optimització va consistir en l'eliminació de llocs de *splicing* críptics i d'elements desestabilitzants de seqüència de RNA per tal d'estabilitzar la seqüència del mRNA. A més, també va incloure l'addició d'elements estabilitzadors de RNA, la optimització d'ús de codó i del contingut en G/C, entre d'altres canvis, mitjançant un algoritme desenvolupat per *GeneArt*®. D'aquesta manera, les seqüències codificants es van rebre clonades en els plasmidis pMA-RQ-mNAGLU\_1039160 i pMK-RQ-DogNAGLU\_13AAG7NP entre les dianes de restricció *MluI* en 5' i *EcoRI* en 3'.

#### 2.3.2. Construcció del plasmidi pAAV-CAG-mNAGLU

La seqüència codificant (CDS) de la NAGLU murina va ser utilitzada com a seqüència de partida (referència NCBI: NM\_013792.2, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) i optimitzada segons s'especifica anteriorment (apartat 2.3.1 de Materials i Mètodes). La CDS optimitzada es va rebre en el plasmidi pMA-RQ (AmpR),

flanquejada per les dianes de restricció *MluI* i *EcoRI* als extrems 5' i 3', respectivament, i va ser escindida del plasmidi mitjançant la digestió doble *MluI/EcoRI*. Posteriorment es va clonar al plasmidi d'expressió pAAV-CAG (Amp<sup>R</sup>) aprofitant les mateixes dianes de restricció. El plasmidi resultant es va anomenar pAAV-CAG-mNAGLU.

### **2.3.3. Construcció del plasmidi pAAV-CAG-cNAGLU**

La CDS de la NAGLU canina va ser utilitzada com a seqüència de partida (referència NCBI: XM\_548088.4, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>) i optimitzada segons s'especifica anteriorment (apartat 2.3.1 de Materials i Mètodes). La CDS optimitzada es va rebre en el plasmidi pMK-RQ (Amp<sup>R</sup>) flanquejada per les dianes de restricció *MluI* i *EcoRI* als extrems 5' i 3', respectivament. Es va escindir del plasmidi pMK-RQ mitjançant la digestió doble *MluI/EcoRI*, i seguidament es va clonar al plasmidi d'expressió pAAV-CAG (Amp<sup>R</sup>) aprofitant les mateixes dianes de restricció. El plasmidi resultant es va anomenar pAAV-CAG-cNAGLU.

## **2.4. Transfecció de cultius cel·lulars HEK-293 amb DNA plasmídic**

Per a la transfecció *in vitro* de cultius cel·lulars HEK-293 amb DNA plasmídic, es va seguir el protocol comercial *Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen)*, basat en la transfecció del DNA inclòs a l'interior de liposomes catiónics. Breument, cultius adherents de cèl·lules HEK-293 en plaques de 6 pous (*Thermo Fisher Scientific*) es van transfectar amb 4 µg de DNA plasmídic inclòs a l'interior dels liposomes catiónics formats per la Lipofectamina, seguint les instruccions del fabricant. Passades 48 hores d'incubació, es va recollir per separat el medi de cultiu i les cèl·lules (aquestes en 1 ml de H<sub>2</sub>O Milli-Q), i es van emmagatzemar a -80°C fins a la seva posterior anàlisi.

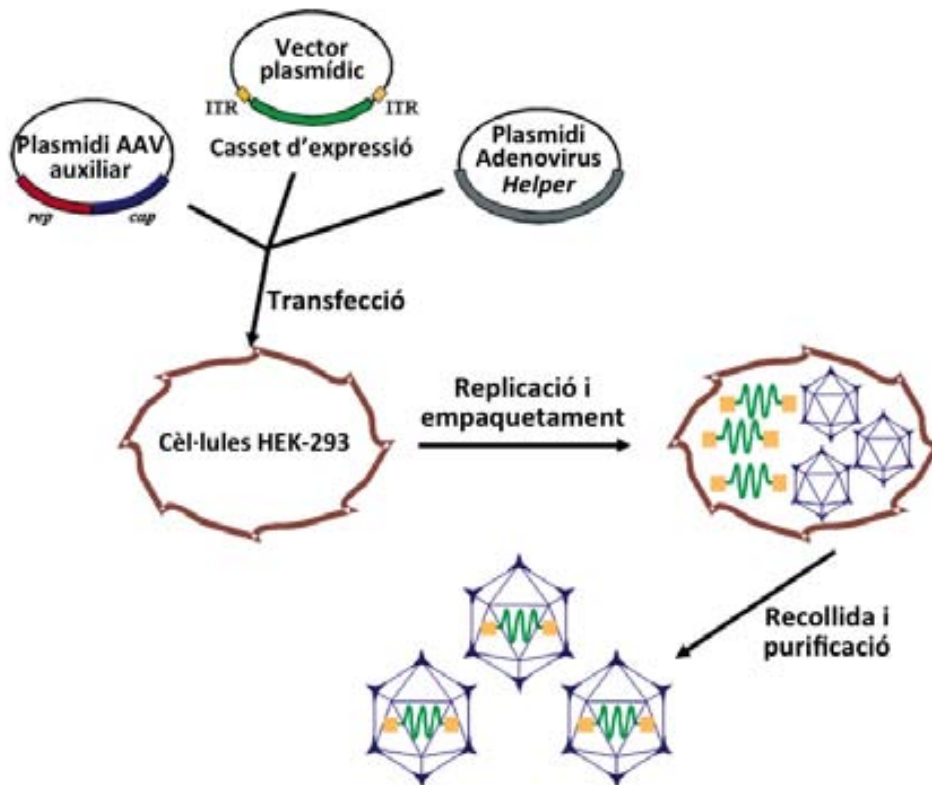
## **2.5. Producció, purificació i titulació de vectors virals adenoassociats**

### **2.5.1. Producció i purificació**

Les partícules infectives de vectors virals AAV9 es van generar en cultius cel·lulars HEK-293 cultivats en *Roller Bottles* (RB) mitjançant un protocol de triple transfecció (Ayuso, 2010a) que implica la utilització de 3 plasmidis (Figura 53). Aquest protocol basat en la precipitació dels virus mitjançant polietilè glicol (PEG) i

ultracentrifugació amb gradients de CsCl permet eliminar pràcticament el contingut de càpsides buides i disminuir les impureses proteiques, augmentant d'aquesta manera la puresa de la preparació viral final, la qual cosa resulta en nivells de transducció *in vivo* més elevats (Ayuso, 2010b).

La co-transfecció de cada RB es va dur a terme en 30 ml de fosfat càlcic amb 150 µg del DNA plasmídic d'interès (amb les seqüències ITR i el *cassette* d'expressió, en aquest cas de la NAGLU murina o canina), juntament amb 150 µg del plasmidi accessori rep2/cap9 (plasmidi d'expressió codificant per les proteïnes de la càpsida proteica de les partícules virals i per les proteïnes necessàries per la replicació viral) i 150 µg del plasmidi *helper* pWEAD (plasmidi d'expressió codificant per a les proteïnes adenovirals necessàries). Els plasmidis rep2/cap9 i pWEAD van ser generosament cedits per la Dra. Katherine High del *Children's Hospital of Philadelphia*, EEUU.



**Figura 53. Representació esquemàtica de la producció dels vectors virals AAV pel protocol de triple transfecció.** Per a la producció de vectors AAV ambdós ORFs virals (rep i cap) van ser reemplaçats pel transgèn flanquejat per les senyals d'empaquetament viral (ITRs). Les proteïnes virals rep i cap van ser aportades en *trans* pel plasmidi accessori. Les funcions del virus auxiliars es van proporcionar mitjançant la transfecció d'un tercer plasmidi, anomenat plasmidi *helper*, codificant pels gens adenovirals necessaris per a la producció dels AAV (Adaptat de Büning, 2008).

Un total de 20 RB per a AAV9-mNAGLU, 50 RB per a AAV9-cNAGLU i 50 RB per a AAV9-Nul es van utilitzar per a la producció viral. 48 hores post-transfecció, es van recollir i centrifugar les cèl·lules a 2.500g 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 MgCl<sub>2</sub>, pH 8,0) i es va sonicar per lisar les cèl·lules i alliberar els virus del seu interior. El lisat es va centrifugar a 2.500g 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 mitjançant una incubació de 15h en PEG 8000 al 8% (*Sigma*) a 4°C. Passat aquest període, els vectors es van precipitar per centrifugació a 4000g durant 30 min. Aquest nou *pellet*, que contenia els vectors virals tant del medi de cultiu com de les cèl·lules, va ser reconstituït amb TMS, tractat amb benzonasa (*Merck*) durant 1h a 37°C i finalment centrifugat a 10.000g durant 10 min. El sobrenedant resultant es va carregar en tubs de 37,5 ml *Ultra clear* (*Beckman*) que contenien un gradient discontinu de CsCl de densitat 1,5 (5ml) i 1,3 g/ml (10ml). A continuació, van ser centrifugats durant 17 h a 27.000 rpm en un rotor SW28 (*Beckman*). Les bandes de virus van ser recollides mitjançant agulles de 18G i es van transferir a tubs *Ultra clear* de 12,5 ml. La resta del tub de 12,5 ml es va emplenar 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 48 h. Finalment, es van recollir i dialitzar les bandes corresponent a les partícules virals plenes mitjançant una membrana de 10 kDa (*Slide-A-Lyzer Dialysis Products, Pierce*), i posteriorment es van filtrar mitjançant filtres de 0,22 µm (*Millipore*).

### **2.5.2. Titulació de genomes virals**

Els genomes virals dels AAV9 van ser determinats per PCR quantitativa (qPCR) adequant el protocol descrit pel *AAV2 i AAV8 Reference Standard Material* (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.

Com a corba estàndard es va fer servir un plasmidi linealitzat i quantificat mesurant l'absorbància a 260 nm.

Per assegurar que el títol del vector viral no se sobreestimava degut a la presència de plasmidis de DNA restants de la transfecció a la preparació viral final, es va realitzar

un tractament amb DNAsa previ a la quantificació. Només els genomes encapsidats són resistents a la digestió amb DNAsa.

Es van afegir 5 µl de cada preparació del vector viral en 5 µl de tampó de DNAsa 10X (130 mM Tris-HCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 1,2mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5), 1 µl de DNAsa (10 U/ µl) i 36 µl d'aigua Milli-Q. La digestió es va incubar 60 min a 37 °C. Després de la digestió les mostres es van diluir per a obtenir un valor d'amplificació dintre del rang de la corba estàndard.

Cada reacció de qPCR TaqMan contenia en un volum final de 10 µl:

Reacció TaqMan
5 µl TaqMan LightCycler® 480 Probe Master
0,2 µl primer forward (10 µM)
0,2 µl primer reverse (10 µM)
0,1 µl sonda (10 µM)
2 µl H <sub>2</sub> O Milli-Q
2,5 µl vector diluït

La reacció consistia en una incubació inicial de 10 min a 95°C (que permet l'activació de la polimerasa i la desnaturalització de les càpsides virals, permetent l'alliberament del genomes) seguida de 40 cicles de 30s a 95°C (desnaturalització) i 30s a 60°C (annealing i elongació).

Els primers utilitzats en la quantificació dels genomes virals dels AAV hibridaven a la zona comú del polyA (intró β-globina):

- *Forward*: 5' CTT GAG CAT CTG ACT TCT GGC TAAT 3'
- *Reverse*: 5' GGA GAG GAG GAA AAA TCT GGC TAG 3'
- *Sonda*: 5' 6FAM- CCG AGT GAG AGA CAC AAA AAA TTC CAA CAC -BHQ1 3'

El títol viral assignat va ser el resultat de la mitjana de tres quantificacions realitzades en dies diferents:

Vector viral	Títol (vg/ml)
AAV9-mNAGLU	$3 \times 10^{12}$
AAV9-cNAGLU	$5 \times 10^{13}$
AAV9-Nul	$1,2 \times 10^{14}$

### 2.5.3. Quantificació de les 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 permet la quantificació de les càpsides virals, que comparat amb el valor de genomes virals obtinguts per qPCR (veure apartat 2.5.2), permet calcular el percentatge de càpsides buides en cada preparació (relació: partícules virals / genomes virals). A més a més, aquest mètode permet visualitzar al gel el grau de contaminació de proteïnes no virals que podrien afectar l'eficiència de transducció *in vivo*.

El volum apropiat del vector d'interès, del vector de referència (control utilitzat també en la quantificació per qPCR) i de diferents dilucions del vector K208 (de concentració coneguda i utilitzat com a corba 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 Gel 1,5mm 15 well (Invitrogen)* i es van córrer a 120 V durant 2 hores. Les proteïnes del gel van ser fixades amb una barreja de Milli-Q H<sub>2</sub>O/etanol/àcid acètic. A continuació, el gel es va *sensibilitzar* amb una barreja de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Acetat de sodi/etanol/H<sub>2</sub>O Milli-Q. Finalment, el gel es va tenyir amb nitrat de plata i les bandes es van revelar fent servir una barreja de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/Formaldehid/H<sub>2</sub>O Milli-Q (Figura 54).

El títol de partícules virals es va obtenir per densitometria. A partir de la intensitat de la VP3 de cada dilució del vector K208 es va generar una corba estàndard per quantificar les partícules virals de les diferents preparacions.

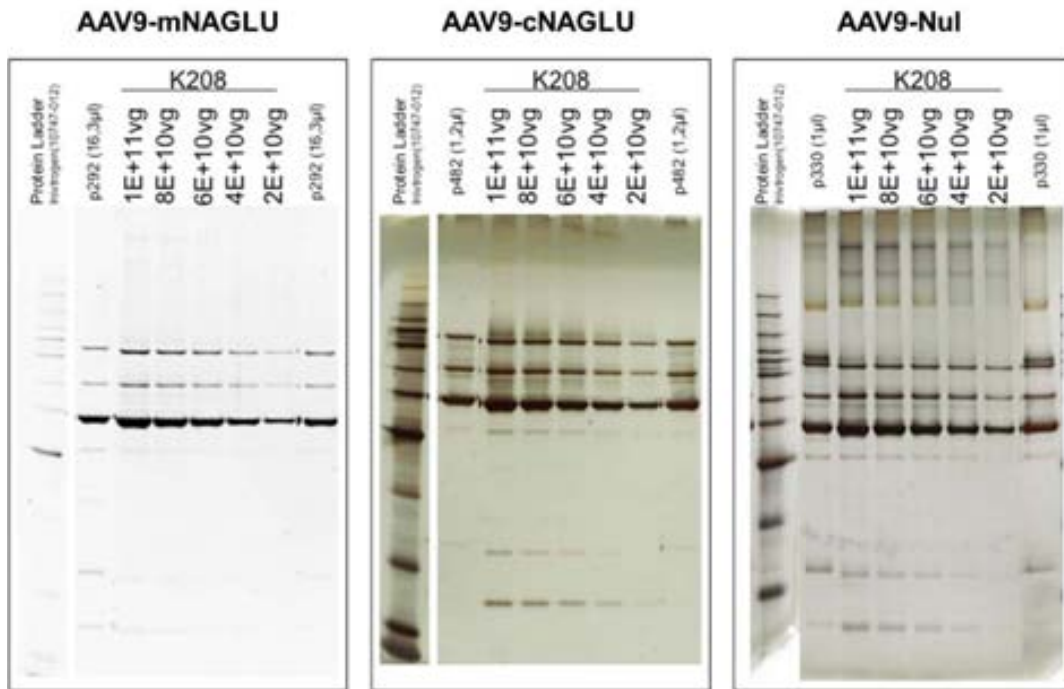


Figura 54. Imatges representatives de la tinció de plata per als vectors virals produïts i utilitzats en aquest treball.

## 2.6. Determinació de genomes virals en teixits per qPCR

El valor final del nombre de genomes virals que han transduït una determinada cèl·lula, que alhora és representatiu del nombre de còpies del transgèn (NAGLU murina) per cèl·lula es va obtenir a partir de la comparació de 20 ng de DNA genòmic extret de diferents teixits de ratolins, amb una recta patró de referència generada a partir de dilucions seriades del plasmidi linealitzat.

### 2.6.1. Generació de la recta patró de referència

La recta patró es va generar a partir del DNA plasmídic pAAV-CAG-mNAGLU linealitzat. Per tant, coneixent la concentració del plasmidi i el nombre de parells de bases del constructe (8521 bp), es va obtenir el nombre de còpies del transgèn per  $\mu\text{l}$ . Aquest DNA plasmídic es va diluir de forma seriada de manera que s'obtingués una recta patró de dilucions logarítmiques  $10^7:10^6:10^5:10^4:10^3:10^2$  còpies del transgèn/ $\mu\text{l}$ . A cada reacció de PCR es va combinar el DNA plasmídic amb 20 ng de DNA genòmic total irrellevant (no transgènic) de ratolí amb la finalitat d'igualar les condicions de PCR entre la recta patró i el DNA genòmic dels ratolins transgènics.

### 2.6.2. Quantificació del nombre de còpies del transgèn per qPCR

Un cop generada la recta patró i diluïdes les mostres, es va realitzar la qPCR per al càlcul del nombre de còpies del transgèn. Cada reacció de qPCR (TaqMan LightCycler® 480 Probe Master, Roche) es va dur a terme en 20 µl de volum final:

Reacció TaqMan
10 µl TaqMan LightCycler® 480 Probe Master
1 µl primer forward (10 µM)
1 µl primer reverse (10 µM)
0,2 µl sonda
6,8 µl H <sub>2</sub> O Milli-Q
1 µl vector diluït

La reacció de qPCR va consistir en una desnaturalització inicial de 10 min a 95°C i 45 cicles de desnaturalització (10 s a 95°C), *annealing* (30 s a 60°C) i amplificació (1 s a 72°C).

Les seqüències dels oligonucleòtids utilitzats s'especifiquen a continuació:

- *Forward*: 5' GCC GAG GCC CAG TTC TAC 3'
- *Reverse*: 5' TTG GCG TAG TCC AGG ATG TTG 3'
- *Sonda*: 5' AGC AGA ACA GCA GAT ACC AGA TCA CCC 3'

Els valors obtinguts a la qPCR en relació a la recta patró van proporcionar el nombre de còpies del transgèn que hi havia inicialment en 20 ng de DNA genòmic total. Sabent que en ratolí, 20 ng de DNA genòmic corresponen a 3115,26 cèl·lules diploides, es va obtenir el nombre de còpies del transgèn per cèl·lula diploide.

### 2.7. Genotipat de ratolins

Els ratolins KO pel gen *Naglu* van ser genotipats mitjançant PCR sobre DNA genòmic per a detectar la presència de la inserció del gen de resistència a la neomicina a l'exó 6 (Figura 55A).



### 2.7.1. Purificació de DNA genòmic

L'obtenció del DNA genòmic es va fer a partir de mostres de cua (~0,5 cm de longitud) de ratolins de 3 – 4 setmanes d'edat, segons una adaptació del mètode d'extracció descrit per Wet i col·laboradors (de Wet, 1987). Breument, els fragments de cua eren digerits o/n a 56°C en una solució tamponada suplementada amb 0,1% w/v de proteïnasa K (*Roche*) (100 mM Tris-HCl pH 8,5; 5 mM EDTA pH 8,0; 0,2% w/v SDS; 200 mM NaCl; 1 mg/ml Proteïnasa K). Aquesta incubació va permetre la digestió tissular i l'alliberació del DNA genòmic de l'interior cel·lular. L'homogenat (700 µl) va ser posteriorment clarificat per addició d'una solució saturada de NaCl (250 µl) i centrifugat durant 15 min a 12.000g. El sobrenedant es va separar i el DNA genòmic es va purificar per precipitació amb 500 µl isopropanol. Posteriorment es va realitzar una nova centrifugació durant 15 min a 12.000g, per afavorir la precipitació del DNA genòmic al fons del tub. Aquest *pellet* de DNA va ser finalment rentat mitjançant dos rentats amb etanol 70% v/v i re-suspès en 65 µl de H<sub>2</sub>O Milli-Q prèviament escalfada a 65°C per facilitar la solubilització del DNA.

### 2.7.2. Genotipat per PCR

El genotipat es va dur a terme mitjançant el *kit* comercial de PCR *GoTaq® DNA Polymerase (M300)* (*Promega*) en un volum final de 15 µl:

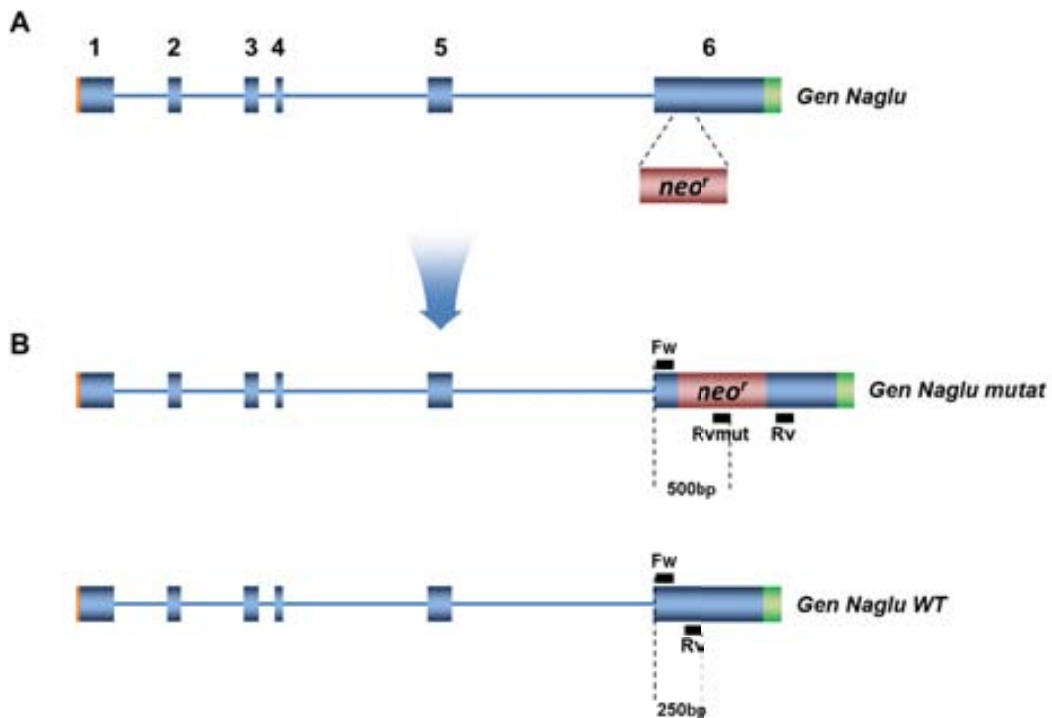
Reacció de genotipat
3 µl 5x GoTaq Reaction Buffer
1,5 µl Mg <sup>2+</sup> (25 mM)
0,3 µl dNTPs (25 mM)
0,3 µl primer forward (10 µM)
0,3 µl primer reverse (10 µM)
0,3 µl primer reverse mutat (10 µM)
0,1 µl GoTaq Polimerasa (5U/µl)
8,2 µl H <sub>2</sub> O Milli-Q
1 µl DNA genòmic

La reacció consistia en una desnaturalització inicial de 3 min a 95°C seguida de 40 cicles amb una desnaturalització (30 s a 95°C), *annealing* (30 s a 60°C) i elongació (1 min a 72°C), amb una fase final comú d'elongació de 5 min a 72°C.

Els *primers* utilitzats en el genotipat van ser:

- *Forward*: 5' GTC GTC TCC TGG TTC TGG AC 3'
- *Reverse*: 5' ACC ACT TCA TTC TGG CCA AT 3'
- *Reverse mutat*: 5' CTC TGA GCC CAG AAA GCG 3'

Els resultats d'amplificació per a aquesta reacció de PCR eren d'una doble banda d'aproximadament 500 bp per a ratolins MPSIIIB, d'una doble banda de 500 bp i 250 bp per a ratolins heterozigots, i d'una doble banda de 250 bp per a ratolins WT (Figura 55B).



**Figura 55. Genotipat del gen *Naglu* en el model murí de la MPSIIIB.** (A) Esquematització de la disrupció de l'exó 6 en el gen *Naglu*. (B) Amplificació per PCR del gen *Naglu* WT i mutat. El gen mutat dona lloc a l'amplificació d'una banda d'aproximadament 500 bp, mentre que la banda corresponent a l'al·lel WT mesura uns 250 bp. Fw: forward; Rv: reverse; Rvmut: reverse per detectar la mutació.

Finalment, el resultat d'amplificació de la PCR es carregava en un gel d'electroforesi d'agarosa a l'1% w/v, com s'especifica a la apartat 2.1.4 de Materials i Mètodes.

## 2.8. Administració *in vivo* de vectors AAV

### 2.8.1. Administració intracisterna magna de vectors AAV9 en ratolins

L'administració intracisterna de vectors virals AAV9 en ratolins es va realitzar sota anestèsia, mitjançant una injecció intraperitoneal de Ketamina (100 mg/kg) i Xilacina (10 mg/kg). Un cop anestesiats, el pèl de la part posterior del cap va ser rasurat, des de les orelles fins aproximadament les escàpules, i una petita incisió de 2-3 mm es va realitzar a la zona corresponent al final del crani i inici de la columna vertebral, coincidint amb la línia mitjana. Els animals es van mantenir en posició de decúbit supí, amb el cap inclinat cap avall en un angle d'aproximadament 60° respecte de l'horitzontal. Seguint el mateix angle d'inclinació, es va introduir una agulla de 34G unida a una xeringa Hamilton (*Hamilton Company*, NE, EEUU) per tal d'accedir a la cisterna magna a través del *foramen magnum*. A continuació, 10 µl del vector viral a la dosi escollida es van administrar al LCR a través de la cisterna magna. Degut al fet que el SNC era el principal compartiment diana del vector viral, per a cadascun dels experiments tots els ratolins van ser administrats amb la mateixa quantitat de genomes virals, independentment del gènere o del pes corporal. Un cop administrat el vector viral, es va retirar l'agulla de la cisterna i la incisió a la pell es va segellar amb adhesiu tissular Histoacryl® (*Aesculap Inc.*, PE, EEUU).

### 2.8.2. Administració intravenosa de vectors AAV9 en gossos

L'administració intravenosa de AAV9-Nul en gossos es va realitzar a través de la vena cefàlica dreta i amb els animals anestesiats. L'anestèsia es va iniciar amb una pre-medicació amb 0,02 mg/kg de *Buprenorphine Hydrochloride* (*Buprex*, *Schering-Plough*), administrada per via intramuscular. Transcorreguda mitja hora, la inducció de l'anestèsia es va dur a terme amb 4 mg/kg de Propofol (*Propofol*, *B|Braun*) i 0,5 mg/kg de Valium (*Diazepam*), ambdós administrats per via endovenosa. A continuació es va realitzar la intubació traqueal i l'anestèsia es va mantenir per inhalació d'isoflurà al 2% (*IsoVet*, *B|Braun*) en oxigen al 100%. La zona de l'avantbraç dret va ser rasurada i desinfectada amb etanol 70% i posteriorment amb una solució antisèptica *Desinolor* (*AGB*, *Ajalvir*, Espanya). El vector viral en un volum final de 2 ml es va administrar a través de la vena cefàlica dreta utilitzant una xeringa de 2 ml connectada a un tub amb una clau de 3 vies per a la infusió *Discofix*® C (*B|Braun*). Durant tot el procés, la temperatura, les freqüències cardíaca i respiratòria, la capnografia, la pressió arterial,

el pols i l'activitat elèctrica del cor van ser monitoritzats mitjançant un monitor multiparamètric veterinari de signes vitals (*B|Braun*).

### 2.8.3. Administració intracisterna magna de vectors AAV9 en gossos

L'administració intracisterna de AAV9-cNAGLU en gossos es va realitzar sota anestèsia, tal com s'especifica en l'apartat anterior. Un cop intubats i monitoritzats, els gossos es van mantenir en posició de decúbit lateral amb el cap posicionat en un angle de 90° respecte del cos, per tal de fer accessible la cisterna magna. A continuació, la zona de punció va ser rasurada i desinfectada amb etanol 70% i amb una solució antisèptica *Desinclor* (*AGB*). Una agulla de 22G es va introduir a la cisterna magna, entre l'os occipital i la vèrtebra C1. Una xeringa de 2 ml connectada a un tub amb una clau de 3 vies per a la infusió *Discofix® C* (*B|Braun*) es va connectar amb l'agulla per tal d'administrar manualment 1 ml de preparació viral en un temps d'aproximadament 15 segons. Les constants vitals, com en l'administració intravenosa, també van ser monitoritzades durant tot el procediment amb un monitor multiparamètric veterinari de signes vitals (*B|Braun*).

La dosi de AAV9-cNAGLU administrada va ser extrapolada a partir de la dosi terapèutica utilitzada en el ratolí MPSIIIB tenint en compte el volum mitjà dels cervells caní i murí (taula 10).

**Taula 10. Volum cerebral mitjà i dosi viral administrades**

	<b>Ratolí</b>	<b>Gos</b>
Volum cerebral mitjà (ml)	0,43 <sup>a</sup>	72 <sup>b</sup>
Dosi viral administrada (vg/animal)	3,9x10 <sup>10</sup>	6,5x10 <sup>12</sup>

La dosi viral administrada als gossos del vector viral AAV9-cNAGLU es va extrapolar a partir de la dosi del vector AAV9-mNAGLU utilitzada en l'estudi amb ratolins en funció del volum cerebral mitjà d'ambdues espècies. <sup>a</sup>Roderick, 1973; Ma, 2005; Chen, 2006; Vincent 2010. <sup>b</sup>Davies, 1993.

Inicialment la dosi de la preparació viral AAV9-mNAGLU en una primera titulació va ser de  $3,9 \times 10^{12}$  vg/ml. No obstant, posteriorment es va re-titular donant un valor lleugerament inferior a l'inicial, de  $3,0 \times 10^{12}$  vg/ml (veure apartat 2.5.2 de Materials i Mètodes). La dosi viral de AAV9-cNAGLU a administrar intracisterna en gossos *Beagle* es va extrapolar en base a la primera titulació (taula 9, apartat 2.1 de la secció de Resultats), per aquesta raó, la dosi administrada en els gossos va ser lleugerament sobre-estimada.

## 2.9. Realització de l'Actímetre

Prèviament al sacrifici, els ratolins van ser sotmesos a la prova de comportament de l'Actímetre o *Open-field*. La prova es va realitzar en ratolins de 5 mesos d'edat entre les 9 del matí i la 1 de la tarda. Els ratolins es van deixar en una cantonada de l'arena (41 x 41 cm), delimitada per parets transparents de 31 cm d'alçada per tal d'evitar que els animals poguessin escapar, i envoltada per dos marcs de feixos emissors d'infrarojos (LE 8811, Panlab, *Harvard Apparatus*, Barcelona, Espanya) amb la finalitat de detectar moviments verticals i horitzontals. El sistema també estava connectat a una vídeo-càmera enregistradora que permetia el processament simultani de les imatges captades a temps real mitjançant el programa Smart Junior 3.0 (Panlab). Un cop depositats a l'arena de forma individual, es va enregistrar i avaluar el comportament dels ratolins durant 15 min. Finalment, les dades mostrades en aquest treball corresponen als 2 primers minuts de prova, temps en el qual es detectaven les diferències entre els diferents grups. A partir del tercer minut, el comportament observat era indistingible entre els diferents grups.

## 2.10. Obtenció de mostres de sèrum i LCR *in vivo*

### 2.10.1. Obtenció de mostres de sèrum de ratolins

Des de l'administració intracisterna magna de AAV9-mNAGLU en ratolins fins al moment del sacrifici es van extreure mostres periòdiques de sang a partir de la cua. Durant el primer mes es van realitzar extraccions bisetmanals i després, mensuals fins al moment del sacrifici. Per a l'obtenció de sang es tallar un petit fragment de cua i es recollien de 200 a 300  $\mu$ l de sang. Finalment, la sang es va centrifugar a 12.000g durant 15 min per a separar-ne el sèrum, que es va mantenir a  $-80^{\circ}\text{C}$  fins a la seva anàlisi.

### **2.10.2. Obtenció de mostres de sèrum de gossos**

Previ a l'administració intracisterna magna de AAV9-cNAGLU en gossos *Beagle* adults, es van recollir 10 ml de sang venosa, sota efectes de l'anestèsia i a partir de la vena cefàlica o de la vena jugular. A partir de l'administració viral, les mostres es van prendre setmanalment durant el primer mes, i mensualment des d'aleshores. Un cop extretes, les mostres sanguínies es van transferir a tubs amb heparina o EDTA com a anticoagulant per a posteriors determinacions analítiques. El volum sobrant va ser centrifugat a 12.000g durant 15 min per a separar-ne el sèrum per a posteriors determinacions analítiques.

### **2.10.3. Obtenció de mostres LCR de gossos**

Previ a l'administració intracisterna magna de AAV9-cNAGLU en gossos *Beagle* adults, es van recollir 2 ml de LCR per punció a la cisterna magna. El procediment es va dur a terme amb els gossos anestesiats i monitoritzats com s'especifica a l'apartat 2.8.3 de Materials i Mètodes. Després de ser rasurada i desinfectada la zona de punció amb etanol 70% i amb la solució antisèptica *Desinclor (AGB)*, una agulla espinal de 22G es va introduir a la cisterna magna, i el LCR es va recollir a mesura que sortia. Les extraccions periòdiques de LCR es van realitzar setmanalment durant el primer mes després de l'administració intracisterna i mensualment des d'aleshores. Finalment, el LCR recollit es mantenia a -80°C fins a la seva posterior anàlisi.

## **2.11. Determinació de paràmetres bioquímics i hematològics**

La determinació de paràmetres hematològics i bioquímics en plasma i LCR de gossos es van dur a terme als Serveis d'Hematologia i Bioquímica Clínica Veterinària de la UAB, respectivament. La determinació de cèl·lules blanques en LCR es va realitzar al Servei de Neurologia i Neurocirurgia de l'Hospital Clínic Veterinari, mitjançant recompte en cambra de Neubauer (Intervals de referència normals per als paràmetres determinats en LCR: Cèl·lules blanques: < 5cèl·lules/ $\mu$ l, Proteïnes totals: <25 mg/dl; intervals de referència normals per als paràmetres sèrics: ALT: 21 - 102 UI/L, Fosfatasa alcalina: 20 - 156 UI/L, Creatinina: 0,5 - 1,5 mg/dl, Urea: 21,4 - 59,9 mg/dl, Proteïnes totals circulants: 5,4 - 7,1 g/dl, Hemoglobina: 12 - 18 g/dl).

## 2.12. Eutanàsia i obtenció de mostres biològiques *post mortem* de ratolins

Al moment del sacrifici, els ratolins van ser anestesiats mitjançant una injecció intraperitoneal de Ketamina (100 mg/kg) i Xilacina (10 mg/kg). A continuació, i sota els efectes de l'anestèsia, es va obtenir sang per punció intracardíaca del ventricle esquerre. Posteriorment, els ratolins es van perfondre també a través del ventricle esquerre cardíac amb 12 ml de PBS, per tal d'eliminar la sang dels vasos sanguinis dels diferents teixits i evitar així la seva possible interferència en les posteriors determinacions d'activitat NAGLU i de contingut en GAGs. Un cop perfosos, es va procedir a l'extracció dels diferents òrgans i teixits. En el cas del cervell, aquest es va dividir longitudinalment en 2 regions (dreta i esquerra) i cadascuna alhora es va subdividir en 5 regions coronals més, essent la regió "I" la més frontal i la regió "V" la més caudal (Figura 56). Tots els fragments de cervell i la resta de teixits disseccionats es van mantenir a -80°C fins al seu processament. Una part de cadascun dels teixits també va ser immersa *o/n* en paraformaldehid al 2% per tal de realitzar-ne la seva posterior inclusió en blocs de parafina.

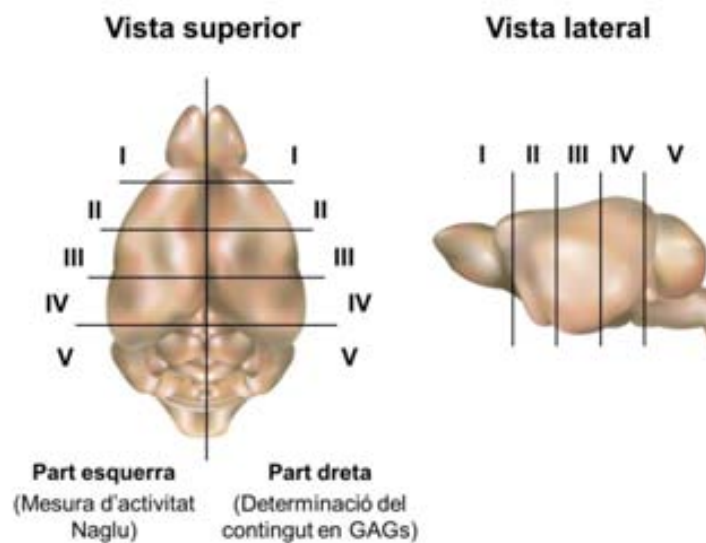


Figura 56. Subdivisió del cervell murí en diferents parts per a posteriors determinacions analítiques.

### 2.13. Quantificació de proteïna total pel mètode de Bradford

Per tal de quantificar el contingut proteic tant en extractes cel·lulars de cultius HEK-293 com d'extractes de teixits, es va utilitzar el mètode de Bradford (*Bio-Rad*). Aquest mètode està basat en el canvi de color del colorant *Coomassie brilliant blue* quan s'acomplexa amb proteïnes. El canvi de coloració dóna lloc a un canvi en el màxim d'absorbància de 495 a 595 nm.

Per tal d'obtenir els extractes proteics, cadascun dels fragments de cervell o fragments de fetge d'aproximadament 100 mg van ser homogeneïtzats en 0,5 ml de H<sub>2</sub>O Milli-Q mitjançant sonicació (*Ultrasonic Processor, Sonics & Materials Inc.*, CT, EEUU). En el cas de cultius cel·lulars, les cèl·lules recollides per cadascun dels pous de plaques de 6 pous, també van ser sonicades en 1 ml de H<sub>2</sub>O Milli-Q. Els extractes sonicats es van centrifugar a 2.000g durant 5 min i se'n va recuperar el sobrenedant que ja contenia l'extracte proteic. Així, els volums apropiats d'extractes proteics es van diluir en 800 µl d'aigua destil·lada, als quals se'ls va afegir 200 µl del reactiu de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad*). La mateixa reacció es va dur a terme amb diferents quantitats (de 0 a 20 µg) de BSA (*Bovine Serum Albumin*) per tal d'obtenir la corba de calibratge. Després de l'addició del reactiu de Bradford, les mostres es van mesclar i incubar durant 5 min. La mesura final d'absorbància es va fer a 595 nm en un espectrofotòmetre *Power wave HT microplate (BioTek Instruments Inc.*, VT, EEUU).

### 2.14. Determinació del contingut de GAGs en òrgans i teixits

Per a la quantificació del contingut de GAGs es va utilitzar el *kit* comercial *Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan Assay (Biocolor, Regne Unit)*. Aquest mètode es basa en la unió específica del colorant *1,9-dimethylmethylene blue* (DMMB) amb GAGs sulfatats, com ho és el HS. Així, de 50 a 70 mg de teixit congelat es van digerir *o/n* a 56°C en 800 µl de tampó fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, pH 8,0) suplementat amb 1 mg/ml de proteïnasa K. Després de 10 min d'inactivació de la proteïnasa K a 90°C, les digestions es van centrifugar 10 min a 10.000g, i 500 µl del sobrenedant van ser posteriorment filtrats (*Ultrafree MC, Millipore*) per centrifugació (5 min, 12.000g). Els volums pertinents per a cada teixit es fan afegir a 1 ml de solució colorant, i per tal d'assegurar la unió del colorant amb els GAGs del filtrat, es va aplicar agitació durant mitja hora. Finalment, es van centrifugar els tubs, es va descartar el sobrenedant i el precipitat format es va resuspendre amb 300 µl de Solució de dissociació durant 15 min d'agitació. Finalment, es va mesurar l'absorbància a 656 nm en un



espectrofotòmetre *Power wave HT microplate*. La quantitat de GAGs a l'extracte inicial es va determinar per extrapolació dels valors d'absorbància obtinguts a 656 nm amb els valors obtinguts a partir d'una recta patró realitzada amb dilucions seriades del GAG condroitin 4-sulfat proporcionat al *kit* comercial.

## 2.15. Determinació d'activitats enzimàtiques

### 2.15.1. Determinació d'activitat NAGLU

L'activitat NAGLU es va determinar utilitzant el substrat fluorogènic comercial *4MU-alpha-N-acetyl-D-glucosaminide* (MU- $\alpha$ GlcNAc) (*Moscerdam Substrates*, Holanda) seguint les indicacions del fabricant (Marsh, 1985). Breument, 30  $\mu$ g (cervell i cultius cel·lulars HEK-293) o 10  $\mu$ g (fetge) de proteïna total dels corresponents extractes proteics o 10  $\mu$ l de LCR o sèrum es van incubar 3h a 37°C juntament amb 5 nmol de substrat MU- $\alpha$ GlcNAc diluït en el tampó apropiat (0,2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 0,1 M àcid cítric, pH 4,7) i en un volum final de 30 $\mu$ l. Aquesta incubació permet que la NAGLU catalitzi la hidròlisi de l'enllaç entre al N-acetilglucosaminidasa i l'àcid urònic terminals de les cadenes de HS. Transcorregut el temps d'incubació, la reacció enzimàtica es va aturar amb l'addició de 200  $\mu$ l de tampó *stop* alcalí (0,5M NaHCO<sub>3</sub> / 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 10,7 + 0,025% de Tritó X-100), i la fluorescència emesa es va llegir en un fluorímetre *FLx800* (*BioTek Instruments Inc.*) utilitzant un filtre d'excitació 360/40 nm i un filtre d'emissió 460/40 nm. L'activitat NAGLU es va calcular per extrapolació de la fluorescència detectada amb una recta patró formada per dilucions seriades de 4MU (*4-MethylUmbelliferone*, *Sigma*), i es va normalitzar per la quantitat de proteïna total carregada. A continuació es mostren els valors d'activitat NAGLU mitjans mesurats en ratolins en aquest treball:

Activitat NAGLU			
	nmol/h/mg	nmol/h/ml	
	Cervell	Fetge	
		Sèrum	
I	0,93 $\pm$ 0,04	-	-
II	0,79 $\pm$ 0,02	-	-
III	1,00 $\pm$ 0,03	-	-
IV	0,97 $\pm$ 0,04	-	-
V	1,07 $\pm$ 0,04	-	-
	-	9,04 $\pm$ 0,36	10,48 $\pm$ 0,24

### 2.15.2. Determinació d'altres activitats enzimàtiques

La resta d'activitats enzimàtiques mesurades al cervell i al fetge es van determinar de forma similar a l'activitat NAGLU, i s'esquematitzen en la següent taula:

	$\alpha$ - Iduronidasa	Iduronat 2- sulfatasa	Sulfamidasa	$\beta$ - glucuronidasa	Galactosa-6- sulfat sulfatasa	$\beta$ - hexosaminidasa
Quantitat de proteïna	15 $\mu$ g	15 $\mu$ g	30 $\mu$ g	10 $\mu$ g	10 $\mu$ g	0,1 $\mu$ g
Substrat	4-MU- $\alpha$ - iduronide	4-MU- $\alpha$ ldoA- 2S	4-MU- $\alpha$ GlcNS	4-MU- $\beta$ -D- glucuronide	4-MU- $\beta$ Gal- 6S	4-MU-N-acetyl- $\beta$ - glucosaminide
Tampó substrat	37,5mM NaCl / Na-formiat 0,1M pH3,5	0,1M Na-acetat / 0,1M àc. acètic pH 5,0	Na-barbital / Na-acetat pH 6,5	0,1M Tampó acetat pH 4,3	0,1M Na-acetat / 0,1M àc. acètic pH 4,3	0,2M Tampó fosfat / 0,1M Tampó citrat pH 4,4
Incubació 1	1h, 37°C	4h, 37°C	17h, 47°C	1h, 37°C	17h, 37°C	1h, 37°C
Incubació 2	-	24h, 37°C (amb un pool d'enzims lisosòmics purificats)	24h, 37°C (amb $\alpha$ -glucosidasa)	-	2h, 37°C (amb $\beta$ -galactosidasa)	-
Tampó stop	0,5M NaHCO <sub>3</sub> / 0,5 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + Tritó 0.025% pH 10,7					
Casa comercial	Glycosynth (Regne Unit)	Moscerdam Substrates	Moscerdam Substrates	Sigma	Moscerdam Substrates	Sigma

### 2.16. Immunohistoquímica de seccions tissulars en blocs de parafina

Els teixits es van mantenir en paraformaldehid al 2% durant 12 – 24h, van ser inclosos en blocs de parafina i finalment se'n van fer talls histològics amb un micròtom *Leica RM2135* (*Leica Biosystems*, Barcelona, Espanya). Les seccions tissulars es van incubar *o/n* a 4°C amb els anticossos primaris específics (veure apartat 1.3), es van fer 3 rentats amb PBS de 5 min i finalment es van incubar amb el corresponent anticòs secundari (veure apartat 1.3) durant 1h a temperatura ambient. El revelat es va dur a terme amb el reactiu *ABC Complex* (*Vector Laboratories Ltd.*, Regne Unit), el qual empra 3,3'-diaminobenzidina (DAB) com a cromogen. Les imatges en camp clar es van obtenir amb un microscopi òptic *Eclipse 90i* (*Nikon Instruments Inc.*, Tòquio, Japó).

### 2.17. Determinació de l'àrea positiva en immunohistoquímiques en camp clar

Es va utilitzar el programari *NIS Elements Advanced Research 2.20* (Nikon Instruments) per quantificar la senyal positiva de les anàlisis immunohistoquímiques en cervell contra LIMP-2, GFAP i Bsi-B4 en 3 – 5 imatges representatives (magnificació original 20x) de cada zona cerebral, mantenint els mateixos ajusts per a tots els animals. El percentatge d'àrea amb marcatge positiu es va calcular com a àrea positiva (en píxels) de cada marcatge envers l'àrea total de la imatge.

A les Figures 31 a 34 no s'hi mostren les imatges representatives corresponents als ratolins MPSIIIB no tractats ja que eren indistingibles de les obtingudes en els ratolins MPSIIIB-Nul.

### 2.18. Microscòpia electrònica de transmissió

Els ratolins van ser sacrificats per sobredosi d'isoflurà (*Isofluo*, Laboratoris del Dr. Esteve, Barcelona, Espanya) i posteriorment perfosos amb 1 ml de glutaraldehyd al 2,5% i paraformaldehyd al 2% a través de la vena cava inferior. Una petita porció de còrtex cerebral o del lòbul hepàtic lateral (d'aproximadament 1 mm<sup>3</sup>) es van disseccionar i incubar a 4°C durant 2h en el mateix fixador utilitzat per la perfusió. Després de varis rentats amb tampó cacodilat fred, els teixits es van fixar amb tetròxid d'osmi a l'1%, es van marcar amb acetat d'uranil i finalment es van deshidratar mitjançant solucions seriadades d'etanol i es van incloure en resina *epoxi*. Seccions ultrafines dels blocs de resina (600 – 800 Å) es van marcar amb citrat de plom i es van visualitzar en un microscopi electrònic de transmissió H-7000 (Hitachi, Tòquio, Japó).

A les Figures 29 i 42 no s'hi mostren les imatges representatives corresponents als ratolins MPSIIIB-Nul ja que eren indistingibles de les obtingudes en els ratolins MPSIIIB no tractats.

### 2.19. Determinació d'anticossos neutralitzants al sèrum i al LCR

La determinació dels títols de NABs anti-AAV9 en sèrum i LCR de gossos *Beagle* es va dur a terme mitjançant un assaig de neutralització *in vitro* segons s'havia descrit anteriorment (Manno, 2006). Breument, un scAAV codificant per l'enzim *Renilla Luciferase* sota el control del promotor de la  $\beta$ -actina de pollastre (scAAV-Luc) es va utilitzar en l'assaig. Per tal d'incrementar l'eficiència de transducció dels vectors AAV *in vitro*, es van utilitzar cultius cel·lulars 2V6.11 (ATCC, Manassas, VA, EEUU), els quals

expressen 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 d' $1,25 \times 10^4$  cèl/pou i a continuació es va realitzar la transfecció amb els vectors scAAV-Luc. La inducció del gen E4 en els cultius cel·lulars es va induir per addició a cada pou d'una dilució 1:1000 de ponasterona A (Invitrogen). El dia de l'assaig, solucions seriades i inactivades per calor del sèrum o del LCR es van barrejar amb el medi de cultiu que contenia el vector viral. L'activitat residual de l'enzim Luciferasa es va mesurar per luminometria, de tal manera que els resultats es van expressar com la dilució de sèrum o LCR amb capacitat per inhibir el 50% de transducció cel·lular per part dels AAV.

## 2.20. Anàlisi estadística

Els resultats es van expressar com la mitjana  $\pm$  SEM. Les comparacions estadístiques es van dur a terme mitjançant l'anàlisi de la variància d'un factor (ANOVA), i les comparacions múltiples entre grups control i de tractament es van realitzar amb el post-test de *Dunnet*. La significança estadística es va determinar quan  $p < 0,05$ . El mètode de *Kaplan-Meier* es va utilitzar per a la mesura de la supervivència, i el *log-rank test*, per a les respectives comparacions múltiples.

## ***VIII. Bibliografia***

Abbott, NJ, Rönnbäck, L and Hansson, E (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 41–53.

American Association of Neurological Surgeons 2006. National Neurosurgical Procedural Statistics.2006 Survey. AANS, editor. American Association of Neurological Surgeons. Meadows , IL

Aronovich, EL, Johnston, JM, Wang, P, Giger, U and Whitley, CB (2001). Molecular basis of mucopolysaccharidosis type IIIB in emu (*Dromaius novaehollandiae*): an avian model of Sanfilippo syndrome type B. *Genomics* 74: 299–305.

Aronovich, EL, Bell, JB, Khan, SA, Belur, LR, Gunther, R, Koniar, B, et al. (2009). Systemic correction of storage disease in MPS I NOD/SCID mice using the sleeping beauty transposon system. *Mol. Ther.* 17: 1136–44.

Arvio, M, Autio, S and Louhiala, P. Early clinical symptoms and incidence of aspartylglucosaminuria in Finland. *Acta Paediatr.* 82: 587–9.

Ashikari-Hada, S, Habuchi, H, Kariya, Y and Kimata, K (2005). Heparin regulates vascular endothelial growth factor165-dependent mitogenic activity, tube formation, and its receptor phosphorylation of human endothelial cells. Comparison of the effects of heparin and modified heparins. *J. Biol. Chem.* 280: 31508–15.

Atchinson, RW, Casto, BC and Hammon, WM (1965). Adenovirus-associated defective virus particles. *Science* 149: 754–6.

Ausseil, J, Desmaris, N, Bigou, S, Attali, R, Corbineau, S, Vitry, S, et al. (2008). Early neurodegeneration progresses independently of microglial activation by heparan sulfate in the brain of mucopolysaccharidosis IIIB mice. *PLoS One* 3: e2296.

Avila, JL and Convit, J (1975). Inhibition of leucocytic lysosomal enzymes by glycosaminoglycans in vitro. *Biochem. J.* 152: 57–64.

Ayuso, E, Mingozzi, F and Bosch, F (2010). Production, purification and characterization of adeno-associated vectors. *Curr. Gene Ther.* 10: 423–36.

Ayuso, E, Mingozzi, F, Montane, J, Leon, X, Anguela, XM, Haurigot, V, et al. (2010). High AAV vector purity results in serotype- and tissue-independent enhancement of transduction efficiency. *Gene Ther.* 17: 503–10.

Baehner, F, Schmiedeskamp, C, Krummenauer, F, Miebach, E, Bajbouj, M, Whybra, C, et al. (2005). Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. *J. Inherit. Metab. Dis.* 28: 1011–7.

Bainbridge, JWB, Smith, AJ, Barker, SS, Robbie, S, Henderson, R, Balaggan, K, et al. (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N. Engl. J. Med.* 358: 2231–9.

Baldo, G, Mayer, FQ, Martinelli, B, Meyer, FS, Burin, M, Meurer, L, et al. (2012). Intraperitoneal implant of recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase partially corrects visceral pathology in mucopolysaccharidosis type I mice. *Cytotherapy* 14: 860–7.

Ballabio, A, Pallini, R and Di Natale, P (1984). Mucopolysaccharidosis III B: hybridization studies on fibroblasts from a mild case and fibroblasts from severe patients. *Clin. Genet.* 25: 191–5.

Bame, KJ (2001). Heparanases: endoglycosidases that degrade heparan sulfate proteoglycans. *Glycobiology* 11: 91R–98R.

Barrow P. Toxicology testing for products intended for pediatric populations. In: Sietsema, Schwen, (eds.) *Nonclinical drug safety assessment: practical considerations for successful registration*. Washington, DC: FDA News, 2007, p.411-440.

Bartel, M, Schaffer, D and Büning, H (2011). Enhancing the Clinical Potential of AAV Vectors by Capsid Engineering to Evade Pre-Existing Immunity. *Front. Microbiol.* 2: 204.

Bax, MC and Colville, G a (1995). Behaviour in mucopolysaccharide disorders. *Arch. Dis. Child.* 73: 77–81.

Beesley, CE, Young, EP, Vellodi, A and Winchester, BG (1998). Identification of 12 novel mutations in the alpha-N-acetylglucosaminidase gene in 14 patients with Sanfilippo syndrome type B (mucopolysaccharidosis type IIIB). *J. Med. Genet.* 35: 910–4.

Beesley, CE, Jackson, M, Young, EP, Vellodi, a and Winchester, BG (2005). Molecular defects in Sanfilippo syndrome type B (mucopolysaccharidosis IIIB). *J. Inherit. Metab. Dis.* 28: 759–67.

Bessis, N, GarciaCozar, FJ and Boissier, M-C (2004). Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther.* 11 Suppl 1: S10–7.

Biffi, A, Capotondo, A, Fasano, S, del Carro, U, Marchesini, S, Azuma, H, et al. (2006). Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficits in mice. *J. Clin. Invest.* 116: 3070–82.

Biffi, A, Montini, E, Lorioli, L, Cesani, M, Fumagalli, F, Plati, T, et al. (2013). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science* 341: 1233158.

Binny, C, McIntosh, J, Della Peruta, M, Kymalainen, H, Tuddenham, EGD, Buckley, SMK, et al. (2012). AAV-mediated gene transfer in the perinatal period results in expression of FVII at levels that protect against fatal spontaneous hemorrhage. *Blood* 119: 957–66

Birnboim, HC and Doly, J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513–23.

Boulton, M, Young, A, Hay, J, Armstrong, D, Flessner, M, Schwartz, M, et al. (1996). Drainage of CSF through lymphatic pathways and arachnoid villi in sheep: measurement of 125I-albumin clearance. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 22: 325–33.

Boutin, S, Monteilhet, V, Veron, P, Leborgne, C, Benveniste, O, Montus, MF, et al. (2010). 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. *Hum. Gene Ther.* 21: 704–12.

Braulke, T and Bonifacino, JS (2009). Sorting of lysosomal proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1793: 605–14.

Bucher, T, Dubreil, L, Colle, M-A, Maquigneau, M, Deniaud, J, Ledevin, M, et al. (2014). Intracisternal delivery of AAV9 results in oligodendrocyte and motor neuron transduction in the whole central nervous system of cats. *Gene Ther.* 21: 522–8.

- Buchlis, G, Podsakoff, GM, Radu, A, Hawk, SM, Flake, AW, Mingozi, F, et al. (2012). Factor IX expression in skeletal muscle of a severe hemophilia B patient 10 years after AAV-mediated gene transfer. *Blood* 119: 3038–41.
- Bunge, S, Knigge, A, Steglich, C, Kleijer, WJ, van Diggelen, OP, Beck, M, et al. (1999). Mucopolysaccharidosis type IIIB (Sanfilippo B): identification of 18 novel alpha-N-acetylglucosaminidase gene mutations. *J. Med. Genet.* 36: 28–31.
- Büning, H, Perabo, L, Coutelle, O, Quadt-Humme, S and Hallek, M (2008). Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *J. Gene Med.* 10: 717–33.
- Burger, C, Gorbatyuk, OS, Velardo, MJ, Peden, CS, Williams, P, Zolotukhin, S, et al. (2004). Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol. Ther.* 10: 302–17.
- Calcedo, R, Morizono, H, Wang, L, McCarter, R, He, J, Jones, D, et al. (2011). Adeno-associated virus antibody profiles in newborns, children, and adolescents. *Clin. Vaccine Immunol.* 18: 1586–8.
- Canal, MM, Wilkinson, FL, Cooper, JD, Wraith, JE, Wynn, R and Bigger, BW (2010). Circadian rhythm and suprachiasmatic nucleus alterations in the mouse model of mucopolysaccharidosis IIIB. *Behav. Brain Res.* 209: 212–20.
- Capila, I and Linhardt, RJ (2002). Heparin-protein interactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41: 391–412.
- Carpentier, PA, Duncan, DS and Miller, SD (2008). Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. *Brain. Behav. Immun.* 22: 140–7.
- Cartier, N, Hacein-Bey-Abina, S, Bartholomae, CC, Veres, G, Schmidt, M, Kutschera, I, et al. (2009). Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 326: 818–23.
- Cartier, N, Hacein-Bey-Abina, S, Bartholomae, CC, Bougnères, P, Schmidt, M, Kalle, C Von, et al. (2012). Lentiviral hematopoietic cell gene therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. *Methods Enzymol.* 507: 187–98.
- Casal, M and Haskins, M (2006). Large animal models and gene therapy. *Eur. J. Hum. Genet.* 14: 266–72.
- Cearley, CN and Wolfe, JH (2006). Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. *Mol. Ther.* 13: 528–37.
- Champion, KJ, Basehore, MJ, Wood, T, Destrée, A, Vannuffel, P and Maystadt, I (2010). Identification and characterization of a novel homozygous deletion in the alpha-N-acetylglucosaminidase gene in a patient with Sanfilippo type B syndrome (mucopolysaccharidosis IIIB). *Mol. Genet. Metab.* 100: 51–6.
- Chen, XJ, Kovacevic, N, Lobaugh, NJ, Sled, JG, Henkelman, RM and Henderson, JT (2006). Neuroanatomical differences between mouse strains as shown by high-resolution 3D MRI. *Neuroimage* 29: 99–105.
- Ciron, C, Desmaris, N, Colle, M-A, Raoul, S, Joussemet, B, Vérot, L, et al. (2006). Gene therapy of the brain in the dog model of Hurler's syndrome. *Ann. Neurol.* 60: 204–13.



Ciron, C, Cressant, A, Roux, F, Raoul, S, Cherel, Y, Hantraye, P, et al. (2009). AAV1-, AAV2- and AAV5-Mediated human alpha-Iduronidase Gene Transfer In The Brain of Nonhuman Primate: Vector Diffusion and Bio Distribution. *Hum. Gene Ther.* doi:10.1089/hgt.2008.155.

Cleary, MA and Wraith, JE (1993). Management of mucopolysaccharidosis type III. *Arch. Dis. Child.* 69: 403–6.

Coelho, JC, Wajner, M, Burin, MG, Vargas, CR and Giugliani, R (1997). Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *Eur. J. Pediatr.* 156: 650–4.

Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions on Rare Diseases: Europe's Challenges. Brussels, November 11, 2008.

Conzelmann, E and Sandhoff, K (1983). Partial enzyme deficiencies: residual activities and the development of neurological disorders. *Dev. Neurosci.* 6: 58–71.

Cook, AM, Mieure, KD, Owen, RD, Pesaturo, AB and Hatton, J (2009). Intracerebroventricular administration of drugs. *Pharmacotherapy* 29: 832–45.

Cooper, G (2000). Lysosomes. *Cell A Mol. Approach.* 2nd Ed., Sinauer Associates at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9953/>>.

Coutinho, MF, Lacerda, L and Alves, S (2012). Glycosaminoglycan storage disorders: a review. *Biochem. Res. Int.* 2012: 471325.

Cressant, A, Desmaris, N, Verot, L, Bréjot, T, Froissart, R, Vanier, M-T, et al. (2004). Improved behavior and neuropathology in the mouse model of Sanfilippo type IIIB disease after adeno-associated virus-mediated gene transfer in the striatum. *J. Neurosci.* 24: 10229–39.

Davidoff, AM, Ng, CYC, Zhou, J, Spence, Y and Nathwani, AC (2003). Sex significantly influences transduction of murine liver by recombinant adeno-associated viral vectors through an androgen-dependent pathway. *Blood* 102: 480–8.

Davies, B and Morris, T (1993). Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm. Res.* 10: 1093–5. Aronovich, EL, Bell, JB, Khan, SA, Belur, LR, Gunther, R, Koniar, B, et al. (2009). Systemic correction of storage disease in MPS I NOD/SCID mice using the sleeping beauty transposon system. *Mol. Ther.* 17: 1136–44.

Daya, S and Berns, KI (2008). Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin. Microbiol. Rev.* 21: 583–93.

Dayton, RD, Wang, DB and Klein, RL (2012). The advent of AAV9 expands applications for brain and spinal cord gene delivery. *Expert Opin. Biol. Ther.* 12: 757–66.

de Ruijter, J, Valstar, MJ and Wijburg, FA (2011). Mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo Syndrome): emerging treatment strategies. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12: 923–30.

de Ruijter, J, Valstar, MJ, Narajczyk, M, Wegrzyn, G, Kulik, W, Ijlst, L, et al. (2012). Genistein in Sanfilippo disease: a randomized controlled crossover trial. *Ann. Neurol.* 71: 110–20.

de Ruijter, J, Ijlst, L, Kulik, W, van Lenthe, H, Wagemans, T, van Vlies, N, et al. (2013). Heparan sulfate derived disaccharides in plasma and total urinary excretion of glycosaminoglycans correlate with disease severity in Sanfilippo disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 36: 271–9.

de Wet, JR, Wood, K V, DeLuca, M, Helinski, DR and Subramani, S (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 7: 725–37.

Delgadillo, V, O'Callaghan, MDM, Artuch, R, Montero, R and Pineda, M (2011). Genistein supplementation in patients affected by Sanfilippo disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 34: 1039–44.

Delgadillo, V, O'Callaghan, MDM, Gort, L, Coll, MJ and Pineda, M (2013). Natural history of Sanfilippo syndrome in Spain. *Orphanet J. Rare Dis.* 8: 189.

Desnick, RJ and Schuchman, EH (2002). Enzyme replacement and enhancement therapies: lessons from lysosomal disorders. *Nat. Rev. Genet.* 3: 954–66.

Desnick, RJ (2004). Enzyme replacement and enhancement therapies for lysosomal diseases. *J. Inherit. Metab. Dis.* 27: 385–410.

Desnick, RJ and Schuchman, EH (2012). Enzyme replacement therapy for lysosomal diseases: lessons from 20 years of experience and remaining challenges. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 13: 307–35.

Dhuria, S V, Hanson, LR and Frey, WH (2010). Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J. Pharm. Sci.* 99: 1654–73.

Di Domenico, C, Villani, GRD, Di Napoli, D, Nusco, E, Cali, G, Nitsch, L, et al. (2009). Intracranial gene delivery of LV-NAGLU vector corrects neuropathology in murine MPS IIIB. *Am. J. Med. Genet. A* 149A: 1209–18.

Di Natale, P, Salvatore, D, Daniele, A and Bonatti, S (1985). Biosynthesis of alpha-N-acetylglucosaminidase in cultured human kidney carcinoma cells. *Enzyme* 33: 75–83.

Di Natale, P, Di Domenico, C, Gargiulo, N, Castaldo, S, Gonzalez Y Reyero, E, Mithbaokar, P, et al. (2005). Treatment of the mouse model of mucopolysaccharidosis type IIIB with lentiviral-NAGLU vector. *Biochem. J.* 388: 639–46.

Dickson, P, Peinovich, M, McEntee, M, Lester, T, Le, S, Krieger, A, et al. (2008). Immune tolerance improves the efficacy of enzyme replacement therapy in canine mucopolysaccharidosis I. *J. Clin. Invest.* 118: 2868–76.

Dierks, T, Schlotawa, L, Frese, M-A, Radhakrishnan, K, von Figura, K and Schmidt, B (2009). Molecular basis of multiple sulfatase deficiency, mucopolipidosis II/III and Niemann-Pick C1 disease - Lysosomal storage disorders caused by defects of non-lysosomal proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1793: 710–25.

Dionisi-Vici, C, Rizzo, C, Burlina, AB, Caruso, U, Sabetta, G, Uziel, G, et al. (2002). Inborn errors of metabolism in the Italian pediatric population: A national retrospective survey. *J. Pediatr.* 140: 321–329.

DiRosario, J, Divers, E, Wang, C, Etter, J, Charrier, A, Jukkola, P, et al. (2009). Innate and adaptive immune activation in the brain of MPS IIIB mouse model. *J. Neurosci. Res.* 87: 978–90.

Dirren, E, Towne, CL, Setola, V, Redmond, DE, Schneider, BL and Aebischer, P (2014). Intracerebroventricular injection of adeno-associated virus 6 and 9 vectors for cell type-specific transgene expression in the spinal cord. *Hum. Gene Ther.* 25: 109–20.

Disbrow, GL, Sunitha, I, Baker, CC, Hanover, J and Schlegel, R (2003). Codon optimization of the HPV-16 E5 gene enhances protein expression. *Virology* 311: 105–14.

- Donsante, a, Levy, B, Vogler, C and Sands, MS (2007). Clinical response to persistent, low-level beta-glucuronidase expression in the murine model of mucopolysaccharidosis type VII. *J. Inherit. Metab. Dis.* 30: 227–38.
- Dreyfuss, JL, Regatieri, C V, Jarrouge, TR, Cavalheiro, RP, Sampaio, LO and Nader, HB (2009). Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *An. Acad. Bras. Cienc.* 81: 409–29.
- Duque, S, Joussemet, B, Riviere, C, Marais, T, Dubreil, L, Douar, A-M, et al. (2009). Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol. Ther.* 17: 1187–96.
- Ellinwood, NM, Wang, P, Skeen, T, Sharp, NJH, Cesta, M, Decker, S, et al. (2003). A model of mucopolysaccharidosis IIIB (Sanfilippo syndrome type IIIB): N-acetyl-alpha-D-glucosaminidase deficiency in Schipperke dogs. *J. Inherit. Metab. Dis.* 26: 489–504.
- Ellinwood, NM, Ausseil, J, Desmaris, N, Bigou, S, Liu, S, Jens, JK, et al. (2011). Safe, efficient, and reproducible gene therapy of the brain in the dog models of Sanfilippo and Hurler syndromes. *Mol. Ther.* 19: 251–9.
- Emre, S, Terzioglu, M, Tokatli, A, Coskun, T, Ozalp, I, Weber, B, et al. (2002). Sanfilippo syndrome in Turkey: Identification of novel mutations in subtypes A and B. *Hum. Mutat.* 19: 184–5.
- Enns, GM and Huhn, SL (2008). Central nervous system therapy for lysosomal storage disorders. *Neurosurg. Focus* 24: E12.
- Estrategia en Enfermedades Raras del Sistema Nacional de Salud. Estrategia aprobada por el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud el 3 de junio de 2009. Ministerio de Sanidad y Política Social.
- Fan, J-Q and Ishii, S (2007). Active-site-specific chaperone therapy for Fabry disease. Yin and Yang of enzyme inhibitors. *FEBS J.* 274: 4962–71.
- Federici, T, Taub, JS, Baum, GR, Gray, SJ, Grieger, JC, Matthews, K a, et al. (2011). Robust spinal motor neuron transduction following intrathecal delivery of AAV9 in pigs. *Gene Ther.*: 1–8doi:10.1038/gt.2011.130.
- Felice, BR, Wright, TL, Boyd, RB, Butt, MT, Pfeifer, RW, Pan, J, et al. (2011). Safety evaluation of chronic intrathecal administration of idursulfase-IT in cynomolgus monkeys. *Toxicol. Pathol.* 39: 879–92.
- Ferrari, FK, Samulski, T, Shenk, T and Samulski, RJ (1996). Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* 70: 3227–34.
- Ferreira, V, Twisk, J, Kwikkers, K, Aronica, E, Brisson, D, Methot, J, et al. (2014). Immune responses to intramuscular administration of alipogene tiparvovec (AAV1-LPL(S447X)) in a phase II clinical trial of lipoprotein lipase deficiency gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 25: 180–8.
- Ficko-Blean, E, Stubbs, K a, Nemirovsky, O, Voadlo, DJ and Boraston, AB (2008). Structural and mechanistic insight into the basis of mucopolysaccharidosis IIIB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 6560–5.

- Foust, KD, Nurre, E, Montgomery, CL, Hernandez, A, M, C and Kaspar, BK (2009). Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotech* 27: 59–65.
- Fraldi, A, Hemsley, K, Crawley, A, Lombardi, A, Lau, A, Sutherland, L, et al. (2007). Functional correction of CNS lesions in an MPS-IIIa mouse model by intracerebral AAV-mediated delivery of sulfamidase and SUMF1 genes. *Hum. Mol. Genet.* 16: 2693–702.
- Fraser, J, Gason, a a, Wraith, JE and Delatycki, MB (2005). Sleep disturbance in Sanfilippo syndrome: a parental questionnaire study. *Arch. Dis. Child.* 90: 1239–42.
- Frese, M-A, Schulz, S and Dierks, T (2008). Arylsulfatase G, a novel lysosomal sulfatase. *J. Biol. Chem.* 283: 11388–95.
- Fu, H, Samulski, RJ, McCown, TJ, Picornell, YJ, Fletcher, D and Muenzer, J (2002). Neurological correction of lysosomal storage in a mucopolysaccharidosis IIIB mouse model by adeno-associated virus-mediated gene delivery. *Mol. Ther.* 5: 42–9.
- Fu, H, Kang, L, Jennings, JS, Moy, SS, Perez, a, Dirosario, J, et al. (2007). Significantly increased lifespan and improved behavioral performances by rAAV gene delivery in adult mucopolysaccharidosis IIIB mice. *Gene Ther.* 14: 1065–77.
- Fu, H, DiRosario, J, Kang, L, Muenzer, J and McCarty, DM (2010). 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. *J. Gene Med.* 12: 624–33.
- Fu, H, Dirosario, J, Killedar, S, Zaraspe, K and McCarty, DM (2011). Correction of neurological disease of mucopolysaccharidosis IIIB in adult mice by rAAV9 trans-blood-brain barrier gene delivery. *Mol. Ther.* 19: 1025–33.
- Fu, H, Bartz, JD, Stephens, RL and McCarty, DM (2012). Peripheral nervous system neuropathology and progressive sensory impairments in a mouse model of Mucopolysaccharidosis IIIB. *PLoS One* 7: e45992.
- Fujita, H, Ezaki, J, Noguchi, Y, Kono, A, Himeno, M and Kato, K (1991). Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding 85kDa sialoglycoprotein in rat liver lysosomal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178: 444–52.
- Futerman, AH and van Meer, G (2004). The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 554–65.
- Gallagher, JT (2006). Multiprotein signalling complexes: regional assembly on heparan sulphate. *Biochem. Soc. Trans.* 34: 438–41.
- Gao, G, Alvira, MR, Wang, L, Calcedo, R, Johnston, J and Wilson, JM (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 11854–9.
- Gao, G, Vandenberghe, LH, Alvira, MR, Lu, Y, Calcedo, R, Zhou, X, et al. (2004). Clades of Adeno-Associated Viruses Are Widely Disseminated in Human Tissues 78: 6381–6388.
- Gao, G, Vandenberghe, LH and Wilson, JM (2005). New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr. Gene Ther.* 5: 285–97.

- Garbuzova-Davis, S, Willing, AE, Desjarlais, T, Davis Sanberg, C and Sanberg, PR (2005). Transplantation of human umbilical cord blood cells benefits an animal model of Sanfilippo syndrome type B. *Stem Cells Dev.* 14: 384–94.
- Garbuzova-Davis, S, Klasko, SK and Sanberg, PR (2009). Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in an animal model of MPS III B. *J. Comp. Neurol.* 515: 93–101.
- Garbuzova-Davis, S, Mirtyl, S, Sallot, SA, Hernandez-Ontiveros, DG, Haller, E and Sanberg, PR (2013). Blood-brain barrier impairment in MPS III patients. *BMC Neurol.* 13: 174.
- Garcia, AR, DaCosta, JM, Pan, J, Muenzer, J and Lamsa, JC (2007). Preclinical dose ranging studies for enzyme replacement therapy with idursulfase in a knock-out mouse model of MPS II. *Mol. Genet. Metab.* 91: 183–90.
- Ghosh, P, Dahms, NM and Kornfeld, S (2003). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 202–12.
- Giugliani, R and Quoos Mayer, F (2012). Emerging treatment options for the mucopolysaccharidoses. *Res. Reports Endocr. Disord.*: 53doi:10.2147/RRED.S24769.
- Gonin, P and Gaillard, C (2004). Gene transfer vector biodistribution: pivotal safety studies in clinical gene therapy development. *Gene Ther.* 11 Suppl 1: S98–S108.
- Götte, M (2003). Syndecans in inflammation. *FASEB J.* 17: 575–91.
- Gray, G, Claridge, P, Jenkinson, L and Green, A (2007). Quantitation of urinary glycosaminoglycans using dimethylene blue as a screening technique for the diagnosis of mucopolysaccharidoses: an evaluation. *Ann. Clin. Biochem.* 44: 360–3.
- Gray, SJ, Matagne, V, Bachaboina, L, Yadav, S, Ojeda, SR and Samulski, RJ (2011). Preclinical differences of intravascular AAV9 delivery to neurons and glia: a comparative study of adult mice and nonhuman primates. *Mol. Ther.* 19: 1058–69.
- Gray, SJ, Nagabhushan Kalburgi, S, McCown, TJ and Jude Samulski, R (2013). Global CNS gene delivery and evasion of anti-AAV-neutralizing antibodies by intrathecal AAV administration in non-human primates. *Gene Ther.*: 1–10doi:10.1038/gt.2012.101.
- Greiner-tollersrud, OK and Berg, T (2005). Lysosomal Storage Disorders. In: Saftig, P (ed.). *Lysosomes*: pp 39–52.
- Grimm, D, Lee, JS, Wang, L, Desai, T, Akache, B, Storm, T a, et al. (2008). In vitro and in vivo gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and retargeting of adeno-associated viruses. *J. Virol.* 82: 5887–911.
- Guffon, N, Bin-Dorel, S, Decullier, E, Paillet, C, Guitton, J and Foulhoux, A (2011). Evaluation of miglustat treatment in patients with type III mucopolysaccharidosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J. Pediatr.* 159: 838–844.e1.
- Güngör, N and Tunçbilek, E. Sanfilippo disease type B. A case report and review of the literature on recent advances in bone marrow transplantation. *Turk. J. Pediatr.* 37: 157–63.
- Guo, Y, He, W, Boer, AM, Wevers, RA, de Bruijn, AM, Groener, JE, et al. (1995). Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders. *J. Inherit. Metab. Dis.* 18: 717–22.

Hadfield, MG, Ghatak, NR, Nakoneczna, I, Lippman, HR, Myer, EC, Constantopoulos, G, et al. (1980). Pathologic findings in mucopolysaccharidosis type IIIB (Sanfilippo's syndrome B). *Arch. Neurol.* 37: 645–50.

Haurigot, V, Marcó, S, Ribera, A, Garcia, M, Ruzo, A, Villacampa, P, et al. (2013). Whole body correction of mucopolysaccharidosis IIIA by intracerebrospinal fluid gene therapy. *J. Clin. Invest.* doi:10.1172/JCI66778.

He, W, Voznyi YaV, Boer, AM, Kleijer, WJ and van Diggelen, OP (1993). A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Sanfilippo disease type D (MPS IIID). *J. Inherit. Metab. Dis.* 16: 935–41.

Heldermon, CD, Hennig, AK, Ohlemiller, KK, Ogilvie, JM, Herzog, ED, Breidenbach, A, et al. (2007). Development of Sensory, Motor and Behavioral Deficits in the Murine Model of Sanfilippo Syndrome Type B. *Development* 63104.

Heldermon, CD, Ohlemiller, KK, Herzog, ED, Vogler, C, Qin, E, Wozniak, DF, et al. (2010). Therapeutic efficacy of bone marrow transplant, intracranial AAV-mediated gene therapy, or both in the mouse model of MPS IIIB. *Mol. Ther.* 18: 873–80.

Heldermon, CD, Qin, EY, Ohlemiller, KK, Herzog, ED, Brown, JR, Vogler, C, et al. (2013). Disease correction by combined neonatal intracranial AAV and systemic lentiviral gene therapy in Sanfilippo Syndrome type B mice. *Gene Ther.* 20: 913–21.

Hemsley, KM, Luck, AJ, Crawley, AC, Hassiotis, S, Beard, H, King, B, et al. (2009). Examination of intravenous and intra-CSF protein delivery for treatment of neurological disease. *Eur. J. Neurosci.* 29: 1197–214.

Hendriksz C, Chakrapani A, Vellodi A, Cleary MA, Wraith E, Jones S, Lavery C, Thomas S, Jessop E. Guidelines for the investigation and Management of Mucopolysaccharidosis type III. Disponible a [www.mpssociety.org.uk](http://www.mpssociety.org.uk). January 2012.

Héron, B, Mikaeloff, Y, Froissart, R, Caridade, G, Maire, I, Caillaud, C, et al. (2011). Incidence and natural history of mucopolysaccharidosis type III in France and comparison with United Kingdom and Greece. *Am. J. Med. Genet. A* 155A: 58–68.

Hoggan, MD, Blacklow, NR and Rowe, WP (1966). Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 55: 1467–74.

Hoogerbrugge, PM, Brouwer, OF, Bordigoni, P, Ringden, O, Kapaun, P, Ortega, JJ, et al. (1995). Allogeneic bone marrow transplantation for lysosomal storage diseases. The European Group for Bone Marrow Transplantation. *Lancet* 345: 1398–402.

Hua, CT, Hopwood, JJ, Carlsson, SR, Harris, RJ and Meikle, PJ (1998). Evaluation of the lysosome-associated membrane protein LAMP-2 as a marker for lysosomal storage disorders. *Clin. Chem.* 44: 2094–102.

Hunter, C (1917). A Rare Disease in Two Brothers. *Proc. R. Soc. Med.* 10: 104–16.

Im, DS and Muzyczka, N (1992). Partial purification of adeno-associated virus Rep78, Rep52, and Rep40 and their biochemical characterization. *J. Virol.* 66: 1119–28.

Inagaki, K, Fuess, S, Storm, TA, Gibson, GA, Mctiernan, CF, Kay, MA, et al. (2006). Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol. Ther.* 14: 45–53.

- Jakóbkiewicz-Banecka, J, Piotrowska, E, Narajczyk, M, Barańska, S and Wegrzyn, G (2009). Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis, which corrects storage in cells of patients suffering from mucopolysaccharidoses, acts by influencing an epidermal growth factor-dependent pathway. *J. Biomed. Sci.* 16: 26.
- Kadiu, I, Glanzer, JG, Kipnis, J, Gendelman, HE and Thomas, MP (2005). Mononuclear phagocytes in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurotox. Res.* 8: 25–50.
- Kakkis, E, McEntee, M, Vogler, C, Le, S, Levy, B, Belichenko, P, et al. (2004). Intrathecal enzyme replacement therapy reduces lysosomal storage in the brain and meninges of the canine model of MPS I. *Mol. Genet. Metab.* 83: 163–74.
- Kan, S, Troitskaya, LA, Sinow, CS, Haitz, K, Todd, AK, Di Stefano, A, et al. (2014). Insulin-like growth factor II peptide fusion enables uptake and lysosomal delivery of  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase to mucopolysaccharidosis type IIIB fibroblasts. *Biochem. J.* 458: 281–9.
- Karpova, EA, Voznyi YaV, Keulemans, JL, Hoogeveen, AT, Winchester, B, Tsvetkova, I V, et al. (1996). A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Sanfilippo disease type A (MPS IIIA). *J. Inherit. Metab. Dis.* 19: 278–85.
- Kim, KH, Dodsworth, C, Paras, A and Burton, BK (2013). High dose genistein aglycone therapy is safe in patients with mucopolysaccharidoses involving the central nervous system. *Mol. Genet. Metab.* 109: 382–5.
- Klein, RL, Dayton, RD, Tatom, JB, Henderson, KM and Phillip, P (2008). AAV8, 9, Rh10, Rh43 Vector Gene Transfer in the Rat Brain: Effects of Serotype, Promoter and Purification Method. *Mol. Ther.* 16: 89–96.
- Kloska, A, Narajczyk, M, Jakóbkiewicz-Banecka, J, Gryniewicz, G, Szeja, W, Gabig-Cimińska, M, et al. (2012). Synthetic genistein derivatives as modulators of glycosaminoglycan storage. *J. Transl. Med.* 10: 153.
- Kowalewski, B, Lamanna, WC, Lawrence, R, Damme, M, Stroobants, S, Padva, M, et al. (2012). Arylsulfatase G inactivation causes loss of heparan sulfate 3-O-sulfatase activity and mucopolysaccharidosis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 10310–5.
- Kreuger, J, Jemth, P, Sanders-Lindberg, E, Eliahu, L, Ron, D, Basilico, C, et al. (2005). Fibroblast growth factors share binding sites in heparan sulphate. *Biochem. J.* 389: 145–50.
- Krivit, W, Peters, C and Shapiro, EG (1999). Bone marrow transplantation as effective treatment of central nervous system disease in globoid cell leukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, adrenoleukodystrophy, mannosidosis, fucosidosis, aspartylglucosaminuria, Hurler, Maroteaux-Lamy, and Sly syn. *Curr. Opin. Neurol.* 12: 167–76.
- Kurihara, M, Kumagai, K and Yagishita, S (1996). Sanfilippo syndrome type C: a clinicopathological autopsy study of a long-term survivor. *Pediatr. Neurol.* 14: 317–21.
- Kushner, S a and Guze, BH (2005). Treatment of psychomotor agitation and self-injurious behavior with estrogen and progesterone in a patient with Sanfilippo syndrome. *Gen. Hosp. Psychiatry* 27: 298–300.
- Lai, Y, Yue, Y and Duan, D (2010). Evidence for the failure of adeno-associated virus serotype 5 to package a viral genome  $> \text{ or } = 8.2 \text{ kb}$ . *Mol. Ther.* 18: 75–9.

- Langford-Smith, A, Malinowska, M, Langford-Smith, KJ, Wegrzyn, G, Jones, S, Wynn, R, et al. (2011). Hyperactive behaviour in the mouse model of mucopolysaccharidosis IIIB in the open field and home cage environments. *Genes. Brain. Behav.* 10: 673–82.
- Langford-Smith, A, Wilkinson, FL, Langford-Smith, KJ, Holley, RJ, Sergijenko, A, Howe, SJ, et al. (2012). Hematopoietic stem cell and gene therapy corrects primary neuropathology and behavior in mucopolysaccharidosis IIIA mice. *Mol. Ther.* 20: 1610–21.
- Laterra, J, Keep, R, Betz, LA and Goldstein, GW (1999). Cerebrospinal Fluid—Brain interface. In: Siegel George J, Agranoff Bernard W, Albers R Wayne, Fisher Stephen K, UMD (ed.). *Basic Neurochem. Mol. Cell. Med. Asp.*, Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Lau, AA, Shamsani, NJ, Winner, LK, Hassiotis, S, King, BM, Hopwood, JJ, et al. (2013). Neonatal Bone Marrow Transplantation in MPS IIIA Mice. *JIMD Rep.* 8: 121–32.
- Lawlor, PA, Bland, RJ, Mouravlev, A, Young, D and During, MJ (2009). Efficient gene delivery and selective transduction of glial cells in the mammalian brain by AAV serotypes isolated from nonhuman primates. *Mol. Ther.* 17: 1692–702.
- Leinekugel, P, Michel, S, Conzelmann, E and Sandhoff, K (1992). Quantitative correlation between the residual activity of beta-hexosaminidase A and arylsulfatase A and the severity of the resulting lysosomal storage disease. *Hum. Genet.* 88: 513–23.
- Lentz, TB, Gray, SJ and Samulski, RJ (2012). Viral vectors for gene delivery to the central nervous system. *Neurobiol. Dis.* 48: 179–88.
- Leone, P, Shera, D, McPhee, SWJ, Francis, JS, Kolodny, EH, Bilaniuk, LT, et al. (2012). Long-term follow-up after gene therapy for canavan disease. *Sci. Transl. Med.* 4: 165ra163.
- Li, HH, Yu, WH, Rozengurt, N, Zhao, HZ, Lyons, KM, Anagnostaras, S, et al. (1999). Mouse model of Sanfilippo syndrome type B produced by targeted disruption of the gene encoding alpha-N-acetylglucosaminidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 14505–10.
- Li, HH, Zhao, H-Z, Neufeld, EF, Cai, Y and Gómez-Pinilla, F (2002). Attenuated plasticity in neurons and astrocytes in the mouse model of Sanfilippo syndrome type B. *J. Neurosci. Res.* 69: 30–8.
- Lieberman, AP, Puertollano, R, Raben, N, Slaugenhaupt, S, Walkley, SU and Ballabio, A (2012). Autophagy in lysosomal storage disorders. *Autophagy* 8: 719–30.
- Lin, H-Y, Lin, S-P, Chuang, C-K, Niu, D-M, Chen, M-R, Tsai, F-J, et al. (2009). Incidence of the mucopolysaccharidoses in Taiwan, 1984-2004. *Am. J. Med. Genet. A* 149A: 960–4.
- Lock, M, McGorray, S, Auricchio, A, Ayuso, E, Beecham, EJ, Blouin-Tavel, V, et al. (2010). Characterization of a recombinant adeno-associated virus type 2 Reference Standard Material. *Hum. Gene Ther.* 21: 1273–85.
- Löser, P, Jennings, GS, Strauss, M and Sandig, V (1998). Reactivation of the previously silenced cytomegalovirus major immediate-early promoter in the mouse liver: involvement of NFkappaB. *J. Virol.* 72: 180–90.
- Lozier, JN, Csako, G, Mondoro, TH, Krizek, DM, Metzger, ME, Costello, R, et al. (2002). Toxicity of a first-generation adenoviral vector in rhesus macaques. *Hum. Gene Ther.* 13: 113–24.



- Ma, Y, Hof, PR, Grant, SC, Blackband, SJ, Bennett, R, Slate, L, et al. (2005). A three-dimensional digital atlas database of the adult C57BL/6J mouse brain by magnetic resonance microscopy. *Neuroscience* 135: 1203–15.
- Maguire, AM, Simonelli, F, Pierce, EA, Pugh, EN, Mingozzi, F, Bencicelli, J, et al. (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N. Engl. J. Med.* 358: 2240–8.
- Mahon, LV, Lomax, M, Grant, S, Cross, E, Hare, DJ, Wraith, JE, et al. (2014). Assessment of Sleep in Children with Mucopolysaccharidosis Type III. In: Ginsberg, SD (ed.). *PLoS One* 9: e84128.
- Malinowska, M, Wilkinson, FL, Bennett, W, Langford-Smith, KJ, O'Leary, HA, Jakobkiewicz-Banecka, J, et al. (2009). Genistein reduces lysosomal storage in peripheral tissues of mucopolysaccharide IIIB mice. *Mol. Genet. Metab.* 98: 235–42.
- Malinowska, M, Wilkinson, FL, Langford-Smith, KJ, Langford-Smith, A, Brown, JR, Crawford, BE, et al. (2010). Genistein improves neuropathology and corrects behaviour in a mouse model of neurodegenerative metabolic disease. *PLoS One* 5: e14192.
- Malm, G, Lund, AM, Månsson, J-E and Heiberg, A (2008). Mucopolysaccharidoses in the Scandinavian countries: incidence and prevalence. *Acta Paediatr.* 97: 1577–81.
- Mangas, M, Nogueira, C, Prata, MJ, Lacerda, L, Coll, MJ, Soares, G, et al. (2008). Molecular analysis of mucopolysaccharidosis type IIIB in Portugal: evidence of a single origin for a common mutation (R234C) in the Iberian Peninsula. *Clin. Genet.* 73: 251–6.
- Manno, CS, Pierce, GF, Arruda, VR, Glader, B, Ragni, M, Rasko, JJ, et al. (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med.* 12: 342–7.
- Marsh, J and Fensom, AH (1985). 4-Methylumbelliferyl alpha-N-acetylglucosaminidase activity for diagnosis of Sanfilippo B disease. *Clin. Genet.* 27: 258–62.
- Masat, E, Pavani, G and Mingozzi, F (2013). Humoral immunity to AAV vectors in gene therapy: challenges and potential solutions. *Discov. Med.* 15: 379–89.
- McCarty, DM, Monahan, PE and Samulski, RJ (2001). Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther.* 8: 1248–54.
- McCarty, DM, Young, SM and Samulski, RJ (2004). Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu. Rev. Genet.* 38: 819–45.
- McCarty, DM, DiRosario, J, Gulaid, K, Muenzer, J and Fu, H (2009). Mannitol-facilitated CNS entry of rAAV2 vector significantly delayed the neurological disease progression in MPS IIIB mice. *Gene Ther.* 16: 1340–52.
- McCarty, DM, Dirosario, J, Gulaid, K, Killedar, S, Oosterhof, A, van Kuppevelt, TH, et al. (2011). Differential distribution of heparan sulfate glycoforms and elevated expression of heparan sulfate biosynthetic enzyme genes in the brain of mucopolysaccharidosis IIIB mice. *Metab. Brain Dis.* doi:10.1007/s11011-010-9230-x.
- McGlynn, R, Dobrenis, K and Walkley, SU (2004). Differential subcellular localization of cholesterol, gangliosides, and glycosaminoglycans in murine models of mucopolysaccharide storage disorders. *J. Comp. Neurol.* 480: 415–26.

- Medina, DL, Fraldi, A, Bouche, V, Annunziata, F, Mansueto, G, Spampanato, C, et al. (2011). Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance. *Dev. Cell* 21: 421–30.
- Meikle, PJ, Hopwood, JJ, Clague, a E and Carey, WF (1999). Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 281: 249–54.
- Meikle, PJ, Ranieri, E, Simonsen, H, Rozaklis, T, Ramsay, SL, Whitfield, PD, et al. (2004). Newborn screening for lysosomal storage disorders: clinical evaluation of a two-tier strategy. *Pediatrics* 114: 909–16.
- Meyer, A, Kossow, K, Gal, A, Mühlhausen, C, Ullrich, K, Bräulke, T, et al. (2007). Scoring evaluation of the natural course of mucopolysaccharidosis type IIIA (Sanfilippo syndrome type A). *Pediatrics* 120: e1255–61.
- Michelakakis, H, Dimitriou, E, Tsagaraki, S, Giouroukos, S, Schulpis, K and Bartsocas, CS (1995). Lysosomal storage diseases in Greece. *Genet. Couns.* 6: 43–7.
- Miller, DG, Rutledge, EA and Russell, DW (2002). Chromosomal effects of adeno-associated virus vector integration. *Nat. Genet.* 30: 147–8.
- Mingozzi, F, Maus, M V, Hui, DJ, Sabatino, DE, Murphy, SL, Rasko, JEJ, et al. (2007). CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat. Med.* 13: 419–22.
- Mingozzi, F, Meulenberg, JJ, Hui, DJ, Basner-Tschakarjan, E, Hasbrouck, NC, Edmonson, SA, et al. (2009). AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells. *Blood* 114: 2077–86.
- Mingozzi, F and High, KA (2011). Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat. Rev. Genet.* 12: 341–55.
- Mingozzi, F and High, KA (2013). Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* 122: 23–36.
- Mingozzi, F, Anguela, XM, Pavani, G, Chen, Y, Davidson, RJ, Hui, DJ, et al. (2013). Overcoming preexisting humoral immunity to AAV using capsid decoys. *Sci. Transl. Med.* 5: 194ra92.
- Monteilhet, V, Saheb, S, Boutin, S, Leborgne, C, Veron, P, Montus, M-F, et al. (2011). A 10 patient case report on the impact of plasmapheresis upon neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 6, and 8. *Mol. Ther.* 19: 2084–91.
- Moog, UTE, Mierlo, IVAN, Valk, HMJVANSL, Spaapen, LEO, Maaskant, MA and Curfs, LMG (2007). Is Sanfilippo Type B in Your Mind When You See Adults With Mental Retardation and Behavioral Problems ? *301*: 293–301.
- Muenzer, J, Wraith, JE and Clarke, L a (2009). Mucopolysaccharidosis I: management and treatment guidelines. *Pediatrics* 123: 19–29.
- Muenzer, J (2011). Overview of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology (Oxford)*. 50 Suppl 5: v4–12.
- Murrey, DA, Naughton, BJ, Duncan, FJ, Meadows, AS, Ware, TA, Campbell, K, et al. (2014). Feasibility and Safety of Systemic rAAV9-hNAGLU Delivery for Treating MPS IIIB: Toxicology, Bio-distribution and Immunological Assessments in Primates. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* doi:10.1089/hum.2013.208.

- Nagabhushan Kalburgi, S, Khan, NN and Gray, SJ (2013). Recent gene therapy advancements for neurological diseases. *Discov. Med.* 15: 111–9.
- Najmabadi, H, Hu, H, Garshasbi, M, Zemojtel, T, Abedini, SS, Chen, W, et al. (2011). Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature* 478: 57–63.
- Nakai, H, Montini, E, Fuess, S, Storm, TA, Meuse, L, Finegold, M, et al. (2003). Helper-independent and AAV-ITR-independent chromosomal integration of double-stranded linear DNA vectors in mice. *Mol. Ther.* 7: 101–11.
- Nash, K, Chen, W and Muzyczka, N (2008). Complete in vitro reconstitution of adeno-associated virus DNA replication requires the minichromosome maintenance complex proteins. *J. Virol.* 82: 1458–64.
- Nathwani, AC, Gray, JT, McIntosh, J, Ng, CYC, Zhou, J, Spence, Y, et al. (2007). Safe and efficient transduction of the liver after peripheral vein infusion of self-complementary AAV vector results in stable therapeutic expression of human FIX in nonhuman primates. *Blood* 109: 1414–21.
- Nathwani, AC, Rosales, C, McIntosh, J, Rastegarlar, G, Nathwani, D, Raj, D, et al. (2011). Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-complementary AAV vector encoding human FIX pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins. *Mol. Ther.* 19: 876–85.
- Nathwani, AC, Tuddenham, EGD, Rangarajan, S, Rosales, C, McIntosh, J, Linch, DC, et al. (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 365: 2357–65.
- Naughton, BJ, Duncan, FJ, Murrey, D, Ware, T, Meadows, A, McCarty, DM, et al. (2013). Amyloidosis, synucleinopathy, and prion encephalopathy in a neuropathic lysosomal storage disease: the CNS-biomarker potential of peripheral blood. *PLoS One* 8: e80142.
- Nelson, J, Crowhurst, J, Carey, B and Greed, L (2003). Incidence of the mucopolysaccharidoses in Western Australia. *Am. J. Med. Genet. A* 123A: 310–3.
- Nelson, J (1997). Incidence of the mucopolysaccharidoses in Northern Ireland. *Hum. Genet.* 101: 355–8.
- Neufeld, EF (1991). Lysosomal storage diseases. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 257–80.
- Neufeld EF and Muenzer J. (2001). "The Mucopolysaccharidoses". In: *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, and D. Valle, eds. (New York: Mc Graw-Hill), pp. 3421–3452.
- Niemeyer, GP, Herzog, RW, Mount, J, Arruda, VR, Tillson, DM, Hathcock, J, et al. (2009). Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood* 113: 797–806.
- Nixon, RA (2013). The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat. Med.* 19: 983–97.
- Ohkuma, S, Moriyama, Y and Takano, T (1982). Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein-isothiocyanate-dextran fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79: 2758–62.

- Ohmi, K, Greenberg, DS, Rajavel, KS, Ryazantsev, S, Li, HH and Neufeld, EF (2003). Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 1902–7.
- Okumiya, T, Kroos, M a, Vliet, L Van, Takeuchi, H, Van der Ploeg, AT and Reuser, AJJ (2007). Chemical chaperones improve transport and enhance stability of mutant alpha-glucosidases in glycogen storage disease type II. *Mol. Genet. Metab.* 90: 49–57.
- Osborn, MJ, McElmurry, RT, Lees, CJ, DeFeo, AP, Chen, Z-Y, Kay, MA, et al. (2011). Minicircle DNA-based gene therapy coupled with immune modulation permits long-term expression of  $\alpha$ -L-iduronidase in mice with mucopolysaccharidosis type I. *Mol. Ther.* 19: 450–60.
- Palmieri, C, Giger, U, Wang, P, Pizarro, M and Shivaprasad, HL (2014). Pathological and Biochemical Studies of Mucopolysaccharidosis Type IIIB (Sanfilippo Syndrome Type B) in Juvenile Emus (*Dromaius novaehollandiae*). *Vet. Pathol.* doi:10.1177/0300985814529314.
- Parente, MK, Rozen, R, Cearley, CN and Wolfe, JH (2012). Dysregulation of gene expression in a lysosomal storage disease varies between brain regions implicating unexpected mechanisms of neuropathology. *PLoS One* 7: e32419.
- Passini, MA, Watson, DJ, Vite, CH, Landsburg, DJ, Feigenbaum, AL and Wolfe, JH (2003). 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 storage lesions in the brains of beta-glucuronidase-deficient mi. *J. Virol.* 77: 7034–40.
- Passini, MA, Bu, J, Richards, AM, Treleaven, CM, Sullivan, JA, O’Riordan, CR, et al. (2014). Translational Fidelity of Intrathecal Delivery of Self-Complementary AAV9-Survival Motor Neuron 1 for Spinal Muscular Atrophy. *Hum. Gene Ther.* doi:10.1089/hum.2014.011.
- Pelled, D, Riebeling, C, van Echten-Deckert, G, Sandhoff, K and Futerman, AH (2003). Reduced rates of axonal and dendritic growth in embryonic hippocampal neurones cultured from a mouse model of Sandhoff disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 29: 341–9.
- Peters, C and Steward, CG (2003). Hematopoietic cell transplantation for inherited metabolic diseases: an overview of outcomes and practice guidelines. *Bone Marrow Transplant.* 31: 229–39.
- Piguet, F, Sondhi, D, Piraud, M, Fouquet, F, Hackett, NR, Ahouansou, O, et al. (2012). Correction of brain oligodendrocytes by AAVrh.10 intracerebral gene therapy in metachromatic leukodystrophy mice. *Hum. Gene Ther.* 23: 903–14.
- Pineda, M, Wraith, JE, Mengel, E, Sedel, F, Hwu, W-L, Rohrbach, M, et al. (2009). Miglustat in patients with Niemann-Pick disease Type C (NP-C): a multicenter observational retrospective cohort study. *Mol. Genet. Metab.* 98: 243–9.
- Pineda, M, Perez-Poyato, MS, O’Callaghan, M, Vilaseca, M a, Pocovi, M, Domingo, R, et al. (2010). Clinical experience with miglustat therapy in pediatric patients with Niemann-Pick disease type C: a case series. *Mol. Genet. Metab.* 99: 358–66.
- Pineda, M (2013). Current Management Options for Sanfilippo Syndrome. *Lisosomal Storage Dis.* 11: 101–7.
- Pinto, R, Caseiro, C, Lemos, M, Lopes, L, Fontes, A, Ribeiro, H, et al. (2004). Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur. J. Hum. Genet.* 12: 87–92.

- Piotrowska, E, Jakóbkiewicz-Banecka, J, Barańska, S, Tylki-Szymańska, A, Czartoryska, B, Wegrzyn, A, et al. (2006). Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis as a basis for gene expression-targeted isoflavone therapy for mucopolysaccharidoses. *Eur. J. Hum. Genet.* 14: 846–52.
- Piotrowska, E, Jakóbkiewicz-Banecka, J, Tylki-Szymanska, A, Liberek, A, Maryniak, A, Malinowska, M, et al. (2008). Genistin-rich soy isoflavone extract in substrate reduction therapy for Sanfilippo syndrome: An open-label, pilot study in 10 pediatric patients. *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.* 69: 166–79.
- Piotrowska, E, Jakóbkiewicz-Banecka, J and Wegrzyn, G (2010). Different amounts of isoflavones in various commercially available soy extracts in the light of gene expression-targeted isoflavone therapy. *Phytother. Res.* 24 Suppl 1: S109–13.
- Piotrowska, E, Jakobkiewicz-Banecka, J, Maryniak, A, Tylki-Szymanska, A, Puk, E, Liberek, A, et al. (2011). 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. *Med. Sci. Monit.* 17: CR196–202.
- Platt, FM, Neises, GR, Reinkensmeier, G, Townsend, MJ, Perry, VH, Proia, RL, et al. (1997). Prevention of lysosomal storage in Tay-Sachs mice treated with N-butyldeoxyjirimycin. *Science* 276: 428–31.
- Poorthuis, BJ, Wevers, R a, Kleijer, WJ, Groener, JE, de Jong, JG, van Weely, S, et al. (1999). The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum. Genet.* 105: 151–6.
- Poupetová, H, Ledvinová, J, Berná, L, Dvůráková, L, Kozich, V and Elleder, M (2010). The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations. *J. Inherit. Metab. Dis.* 33: 387–96.
- Prasad, VK and Kurtzberg, J (2010). Transplant outcomes in mucopolysaccharidoses. *Semin. Hematol.* 47: 59–69.
- Prevalence of rare diseases: Bibliographic data. Orphanet Report Series, Novembre 2013.
- Rabinowitz, JE, Rolling, F, Li, C, Conrath, H, Xiao, W, Xiao, X, et al. (2002). Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J. Virol.* 76: 791–801.
- Rare Diseases Act of 2002. Public Law 107-280. 107th United States Congress. November 6, 2002.
- Rivera, VM, Gao, G, Grant, RL, Schnell, MA, Zoltick, PW, Rozamus, LW, et al. (2005). Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* 105: 1424–30.
- Roberts, ALK, Rees, MH, Klebe, S, Fletcher, JM and Byers, S. (2007). Improvement in behaviour after substrate deprivation therapy with rhodamine B in a mouse model of MPS IIIA. *Mol. Genet. Metab.* 92: 115–21.
- Robertson, SP, Klug, GL and Rogers, JG (1998). Cerebrospinal fluid shunts in the management of behavioural problems in Sanfilippo syndrome (MPS III). *Eur. J. Pediatr.* 157: 653–5.

- Roderick, TH, Wimer, RE, Wimer, CC and Schwartzkroin, PA (1973). Genetic and phenotypic variation in weight of brain and spinal cord between inbred strains of mice. *Brain Res.* 64: 345–53.
- Rohrbach, M and Clarke, JTR (2007). Treatment of lysosomal storage disorders : progress with enzyme replacement therapy. *Drugs* 67: 2697–716.
- Ruzo, A, Garcia, M, Ribera, A, Villacampa, P, Haurigot, V, Marcó, S, et al. (2012a). Liver production of sulfamidase reverses peripheral and ameliorates CNS pathology in mucopolysaccharidosis IIIA mice. *Mol. Ther.* 20: 254–66.
- Ruzo, A, Marcó, S, García, M, Villacampa, P, Ribera, A, Ayuso, E, et al. (2012b). Correction of pathological accumulation of glycosaminoglycans in central nervous system and peripheral tissues of MPSIIIA mice through systemic AAV9 gene transfer. *Hum. Gene Ther.* 23: 1237–46.
- Samaranch, L, Salegio, EA, San Sebastian, W, Kells, AP, Foust, KD, Bringas, JR, et al. (2012). Adeno-associated virus serotype 9 transduction in the central nervous system of nonhuman primates. *Hum. Gene Ther.* 23: 382–9.
- Samaranch, L, Salegio, EA, San Sebastian, W, Kells, AP, Bringas, JR, Forsayeth, J, et al. (2013). Strong cortical and spinal cord transduction after AAV7 and AAV9 delivery into the cerebrospinal fluid of nonhuman primates. *Hum. Gene Ther.* 24: 526–32.
- Samulski, RJ, Berns, KI, Tan, M and Muzyczka, N (1982). Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79: 2077–81.
- Samulski, RJ, Chang, LS and Shenk, T (1989). Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J. Virol.* 63: 3822–8.
- Sanfilippo, SJ, Podosin, R, Langer, L and Good, RA (1963). Mental retardation associated with acid mucopolysacchariduria (heparitin sulfate type). *J. Pediatr.* 63: 837–838.
- Sardiello, M, Palmieri, M, di Ronza, A, Medina, DL, Valenza, M, Gennarino, VA, et al. (2009). A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* 325: 473–7.
- Sasaki, T, Sukegawa, K, Masue, M, Fukuda, S, Tomatsu, S and Orii, T (1991). Purification and partial characterization of alpha-N-acetylglucosaminidase from human liver. *J. Biochem.* 110: 842–6.
- Savas, PS, Hemsley, KM and Hopwood, JJ (2004). Intracerebral injection of sulfamidase delays neuropathology in murine MPS-III A. *Mol. Genet. Metab.* 82: 273–85.
- Sawkar, a R, D'Haese, W and Kelly, JW (2006). Therapeutic strategies to ameliorate lysosomal storage disorders--a focus on Gaucher disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 1179–92.
- Scallan, CD, Jiang, H, Liu, T, Patarroyo-White, S, Sommer, JM, Zhou, S, et al. (2006). Human immunoglobulin inhibits liver transduction by AAV vectors at low AAV2 neutralizing titers in SCID mice. *Blood* 107: 1810–7.
- Schmidtchen, a, Greenberg, D, Zhao, HG, Li, HH, Huang, Y, Tieu, P, et al. (1998). NAGLU mutations underlying Sanfilippo syndrome type B. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 64–9.
- Schnepp, BC, Jensen, RL, Chen, C-L, Johnson, PR and Clark, KR (2005). Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J. Virol.* 79: 14793–803.

- Schuchman, EH and Desnick, RJ (1988). Mucopolysaccharidosis type I subtypes. Presence of immunologically cross-reactive material and in vitro enhancement of the residual alpha-L-iduronidase activities. *J. Clin. Invest.* 81: 98–105.
- Schueler, UH, Kolter, T, Kaneski, CR, Zirzow, GC, Sandhoff, K and Brady, RO (2004). Correlation between enzyme activity and substrate storage in a cell culture model system for Gaucher disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 27: 649–58.
- Schultz, BR and Chamberlain, JS (2008). Recombinant adeno-associated virus transduction and integration. *Mol. Ther.* 16: 1189–99.
- Settembre, C, Fraldi, A, Jahreiss, L, Spampinato, C, Venturi, C, Medina, D, et al. (2008). A block of autophagy in lysosomal storage disorders. *Hum. Mol. Genet.* 17: 119–29.
- Settembre, C, Di Malta, C, Polito, VA, Garcia Arencibia, M, Vetrini, F, Erdin, S, et al. (2011). TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* 332: 1429–33.
- Settembre, C, Fraldi, A, Medina, DL and Ballabio, A (2013). Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 283–96.
- Shen, S, Bryant, KD, Brown, SM, Randell, SH and Asokan, A (2011). Terminal N-linked galactose is the primary receptor for adeno-associated virus 9. *J. Biol. Chem.* 286: 13532–40.
- Shoemaker, JE, Lopes, TJS, Ghosh, S, Matsuoka, Y, Kawaoka, Y and Kitano, H (2012). CTen: a web-based platform for identifying enriched cell types from heterogeneous microarray data. *BMC Genomics* 13: 460
- Sivakumur, P and Wraith, JE (1999). Bone marrow transplantation in mucopolysaccharidosis type IIIA: a comparison of an early treated patient with his untreated sibling. *J. Inherit. Metab. Dis.* 22: 849–50.
- Sondhi, D, Hackett, NR, Peterson, DA, Stratton, J, Baad, M, Travis, KM, et al. (2007). Enhanced survival of the LINCL mouse following CLN2 gene transfer using the rh.10 rhesus macaque-derived adeno-associated virus vector. *Mol. Ther.* 15: 481–91.
- Song, W, Wang, F, Lotfi, P, Sardiello, M and Segatori, L (2014). 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin Promotes Transcription Factor EB-mediated Activation of Autophagy: IMPLICATIONS FOR THERAPY. *J. Biol. Chem.* 289: 10211–22.
- Souweidane, MM, Fraser, JF, Arkin, LM, Sondhi, D, Hackett, NR, Kaminsky, SM, et al. (2010). Gene therapy for late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: neurosurgical considerations. *J. Neurosurg. Pediatr.* 6: 115–22.
- Srivastava, CH, Samulski, RJ, Lu, L, Larsen, SH and Srivastava, A (1989). Construction of a recombinant human parvovirus B19: adeno-associated virus 2 (AAV) DNA inverted terminal repeats are functional in an AAV-B19 hybrid virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 8078–82.
- Staba, SL, Escolar, ML, Poe, M, Kim, Y, Martin, PL, Szabolcs, P, et al. (2004). Cord-blood transplants from unrelated donors in patients with Hurler's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 350: 1960–9.
- Stewart, MD and Sanderson, RD (2013). Heparan sulfate in the nucleus and its control of cellular functions. *Matrix Biol.* doi:10.1016/j.matbio.2013.10.009

Streit, WJ and Kreutzberg, GW (1987). Lectin binding by resting and reactive microglia. *J. Neurocytol.* 16: 249–60.

Su, AI, Wiltshire, T, Batalov, S, Lapp, H, Ching, KA, Block, D, et al. (2004). A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 6062–7.

Sugahara, K and Kitagawa, H (2002). Heparin and heparan sulfate biosynthesis. *IUBMB Life* 54: 163–75.

Swain, GP, Prociuk, M, Bagel, JH, O'Donnell, P, Berger, K, Drobotz, K, et al. (2014). Adeno-associated virus serotypes 9 and rh10 mediate strong neuronal transduction of the dog brain. *Gene Ther.* 21: 28–36.

Tamagawa, K, Morimatsu, Y, Fujisawa, K, Hara, A and Taketomi, T (1985). Neuropathological study and chemico-pathological correlation in sibling cases of Sanfilippo syndrome type B. *Brain Dev.* 7: 599–609.

Tanaka, A, Kimura, M, Lan, HTN, Takaura, N and Yamano, T (2002). Molecular analysis of the alpha-N-acetylglucosaminidase gene in seven Japanese patients from six unrelated families with mucopolysaccharidosis IIIB (Sanfilippo type B), including two novel mutations. *J. Hum. Genet.* 47: 484–7.

Tang, J, Pan, J, Guo, Y, Ai, Y, Jiang, W, Du, M, et al. (2013). Mucopolysaccharidosis type IIIB mutations in Chinese patients: identification of two novel NAGLU mutations and analysis of two cases involving prenatal diagnosis. *Clin. Chim. Acta.* 419: 33–8.

Tardieu, M, Zérah, M, Husson, B, de Bournonville, S, Deiva, K, Adamsbaum, C, et al. (2014). 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. *Hum. Gene Ther.* doi:10.1089/hum.2013.238.

Taylor, KR and Gallo, RL (2006). Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J.* 20: 9–22.

Testa, F, Maguire, AM, Rossi, S, Pierce, EA, Melillo, P, Marshall, K, et al. (2013). Three-year follow-up after unilateral subretinal delivery of adeno-associated virus in patients with Leber congenital Amaurosis type 2. *Ophthalmology* 120: 1283–91.

Thomas, CE, Birkett, D, Anozie, I, Castro, MG and Lowenstein, PR (2001). Acute direct adenoviral vector cytotoxicity and chronic, but not acute, inflammatory responses correlate with decreased vector-mediated transgene expression in the brain. *Mol. Ther.* 3: 36–46.

Tsai, T-H (2005). Concurrent measurement of unbound genistein in the blood, brain and bile of anesthetized rats using microdialysis and its pharmacokinetic application. *J. Chromatogr. A* 1073: 317–22.

Valstar, MJ, Ruijter, GJG, van Diggelen, OP, Poorthuis, BJ and Wijburg, F a (2008). Sanfilippo syndrome: a mini-review. *J. Inherit. Metab. Dis.* 31: 240–52.

Valstar, MJ, Neijs, S, Bruggenwirth, HT, Olmer, R, Ruijter, GJG, Wevers, R a, et al. (2010a). Mucopolysaccharidosis type IIIA: clinical spectrum and genotype-phenotype correlations. *Ann. Neurol.* 68: 876–87.



- Valstar, MJ, Bruggenwirth, HT, Olmer, R, Wevers, R a, Verheijen, FW, Poorthuis, BJ, et al. (2010b). Mucopolysaccharidosis type IIIB may predominantly present with an attenuated clinical phenotype. *J. Inherit. Metab. Dis.* 33: 759–67.
- van de Kamp, JJ, Niermeijer, MF, von Figura, K and Giesberts, MA (1981). Genetic heterogeneity and clinical variability in the Sanfilippo syndrome (types A, B, and C). *Clin. Genet.* 20: 152–60.
- Vellodi, A, Young, E, New, M, Pot-Mees, C and Hugh-Jones, K (1992). Bone marrow transplantation for Sanfilippo disease type B. *J. Inherit. Metab. Dis.* 15: 911–8.
- Vellodi, A (2004). Lysosomal storage disorders. *Br. J. Haematol.* 128: 413–31.
- Villani, GRD, Gargiulo, N, Faraonio, R, Castaldo, S, Gonzalez, E and Natale, P Di (2007). Oxidative Stress in Brain Disease From Mucopolysaccharidosis IIIB. *J. Neurosci. Res.* 85: 612–622.
- Villani, GRD, Di Domenico, C, Musella, A, Cecere, F, Di Napoli, D and Di Natale, P (2009). Mucopolysaccharidosis IIIB: oxidative damage and cytotoxic cell involvement in the neuronal pathogenesis. *Brain Res.* 1279: 99–108.
- Vincent, TJ, Thiessen, JD, Kurjewicz, LM, Gernscheid, SL, Turner, AJ, Zhilkin, P, et al. (2010). Longitudinal Brain Size Measurements in APP/PS1 Transgenic Mice. *Magn. Reson. Insights:* 19doi:10.4137/MRI.S5885.
- Von Figura, K, Hasilik, A, Steckel, F and van de Kamp, J (1984). Biosynthesis and maturation of alpha-N-acetylglucosaminidase in normal and Sanfilippo B-fibroblasts. *Am. J. Hum. Genet.* 36: 93–100.
- Voznyi YaV, Karpova, EA, Dudukina, T V, Tsvetkova, I V, Boer, AM, Janse, HC, et al. (1993). A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Sanfilippo disease C (MPS III C). *J. Inherit. Metab. Dis.* 16: 465–72.
- Walkley, SU, Siegel, DA, Dobrenis, K and Zervas, M (1998). GM2 ganglioside as a regulator of pyramidal neuron dendritogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 845: 188–99.
- Walkley, SU and Vanier, MT (2009). Secondary lipid accumulation in lysosomal disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1793: 726–36.
- Wallace, BJ, Kaplan, D, Adachi, M, Schneck, L and Volk, BW (1966). Mucopolysaccharidosis type 3. Morphologic and biochemical studies of two siblings with Sanfilippo syndrome. *Arch. Pathol.* 82: 462–73.
- Wang, C, Wang, C-M, Clark, KR and Sferra, TJ (2003). Recombinant AAV serotype 1 transduction efficiency and tropism in the murine brain. *Gene Ther.* 10: 1528–34.
- Wang, L, Calcedo, R, Nichols, TC, Bellinger, DA, Dillow, A, Verma, IM, et al. (2005). Sustained correction of disease in naive and AAV2-pretreated hemophilia B dogs: AAV2/8-mediated, liver-directed gene therapy. *Blood* 105: 3079–86.
- Ward, NJ, Buckley, SMK, Waddington, SN, Vandendriessche, T, Chuah, MKL, Nathwani, AC, et al. (2011). Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high-level expression. *Blood* 117: 798–807.

- Weber, B, Blanch, L, Clements, PR, Scott, HS and Hopwood, JJ (1996). Cloning and expression of the gene involved in Sanfilippo B syndrome (mucopolysaccharidosis III B). *Hum. Mol. Genet.* 5: 771–7.
- Weber, B, Guo, XH, Kleijer, WJ, van de Kamp, JJ, Poorthuis, BJ and Hopwood, JJ (1999). Sanfilippo type B syndrome (mucopolysaccharidosis III B): allelic heterogeneity corresponds to the wide spectrum of clinical phenotypes. *Eur. J. Hum. Genet.* 7: 34–44.
- Weber, B, Hopwood, JJ and Yogalingam, G (2001). Expression and characterization of human recombinant and alpha-N-acetylglucosaminidase. *Protein Expr. Purif.* 21: 251–9.
- Whitley, CB, Belani, KG, Chang, PN, Summers, CG, Blazar, BR, Tsai, MY, et al. (1993). Long-term outcome of Hurler syndrome following bone marrow transplantation. *Am. J. Med. Genet.* 46: 209–18.
- Wilcox, WR (2004). Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *J. Pediatr.* 144: S3–14.
- Wilkinson, FL, Holley, RJ, Langford-Smith, KJ, Badrinath, S, Liao, A, Langford-Smith, A, et al. (2012). Neuropathology in mouse models of mucopolysaccharidosis type I, IIIA and IIIB. *PLoS One* 7: e35787.
- Willing, AE, Garbuzova-Davis, SN, Zayko, O, Derasari, HM, Rawls, AE, James, CR, et al. (2013). Repeated Administrations of Human Umbilical Cord Blood Cells Improve Disease Outcomes in a Mouse Model of Sanfilippo Syndrome Type III B. *Cell Transplant*.doi:10.3727/096368913X676916.
- Wolf, DA, Hanson, LR, Aronovich, EL, Nan, Z, Low, WC, Frey, WH, et al. (2012). Lysosomal enzyme can bypass the blood-brain barrier and reach the CNS following intranasal administration. *Mol. Genet. Metab.* 106: 131–4.
- Wu, Y-P and Proia, RL (2004). Deletion of macrophage-inflammatory protein 1 alpha retards neurodegeneration in Sandhoff disease mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 8425–30.
- Wu, Z, Yang, H and Colosi, P (2010). Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol. Ther.* 18: 80–6.
- Xie, Q, Bu, W, Bhatia, S, Hare, J, Somasundaram, T, Azzi, A, et al. (2002). The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 10405–10.
- Yamada, Y, Kato, K, Sukegawa, K, Tomatsu, S, Fukuda, S, Emura, S, et al. (1998). Treatment of MPS VII (Sly disease) by allogeneic BMT in a female with homozygous A619V mutation. *Bone Marrow Transplant.* 21: 629–34.
- Yayon, A, Klagsbrun, M, Esko, JD, Leder, P and Ornitz, DM (1991). Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64: 841–8.
- Yogalingam, G and Hopwood, JJ (2001). Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type IIIA and IIIB: Diagnostic, clinical, and biological implications. *Hum. Mutat.* 18: 264–81.
- Yu, WH, Zhao, KW, Ryazantsev, S, Rozengurt, N and Neufeld, EF (2000). Short-term enzyme replacement in the murine model of Sanfilippo syndrome type B. *Mol. Genet. Metab.* 71: 573–80.

- Zakharov, A, Papaiconomou, C, Djenic, J, Midha, R and Johnston, M (2003). Lymphatic cerebrospinal fluid absorption pathways in neonatal sheep revealed by subarachnoid injection of Microfil. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 29: 563–573.
- Zhao, HG, Li, HH, Bach, G, Schmidtchen, a and Neufeld, EF (1996). The molecular basis of Sanfilippo syndrome type B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 6101–5.
- Zhao, HG, Aronovich, EL and Whitley, CB (1998). Genotype-phenotype correspondence in Sanfilippo syndrome type B. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 53–63.
- Zhao, KW and Neufeld, EF (2000). Purification and characterization of recombinant human alpha-N-acetylglucosaminidase secreted by Chinese hamster ovary cells. *Protein Expr. Purif.* 19: 202–11.
- Zheng, Y, Ryazantsev, S, Ohmi, K, Zhao, H-Z, Rozengurt, N, Kohn, DB, et al. (2004). Retrovirally transduced bone marrow has a therapeutic effect on brain in the mouse model of mucopolysaccharidosis IIIB. *Mol. Genet. Metab.* 82: 286–95.
- Zincarelli, C, Soltys, S, Rengo, G and Rabinowitz, JE (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol. Ther.* 16: 1073–80.
- Zlokovic, B V (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57: 178–201.