

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE POSGRADO**

**PRODUCCIÓN DE VECTORES DERIVADOS DE VIRUS ADENOASOCIADOS (AAV)
COMO MODELO DE TERAPIA GÉNICA PARA MUCOPOLISACARIDOSIS**

MÓNICA ALEXANDRA GUTIÉRREZ ORTIGOZA

TESIS DE GRADO

Presentado como requisito parcial
para optar al título de

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA - BIOQUÍMICA

Bogotá, D.C.
Julio de 2005

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis de grado”. Sólo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución N°. 13 de Julio de 1946.

**PRODUCCIÓN DE VECTORES DERIVADOS DE VIRUS ADENOASOCIADOS (AAV)
COMO MODELO DE TERAPIA GÉNICA PARA MUCOPOLISACARIDOSIS**

MÓNICA ALEXANDRA GUTIÉRREZ ORTIGOZA

APROBADO

Luis Alejandro Barrera, Ph.D.
Director

Felipe García, Ph.D.
Codirector

Moisés Wasserman, Ph.D.
Jurado

Ivonne Balzer, Ph.D.
Jurado

Ignacio Briceño, MD, PhD
Jurado

**PRODUCCIÓN DE VECTORES DERIVADOS DE VIRUS ADENOASOCIADOS (AAV)
COMO MODELO DE TERAPIA GÉNICA PARA MUCOPOLISACARIDOSIS**

MÓNICA ALEXANDRA GUTIÉRREZ ORTIGOZA

APROBADO

Angela Umaña, MSc. Phill.
Decano Académico

Carlos Corredor, Ph.D.
Director de Posgrado

“No importa lo difíciles que se pongan las cosas, porque siempre se superan.
No importa cuántos errores o cuántas veces los cometamos, porque tarde o temprano,
aprendemos que de ellos se aprende.
El camino puede ser largo o complicado pero ir superando los pequeños y grandes
obstáculos es lo que nos da fuerzas para seguir adelante”

A mis padres
A mis amigos
A todos aquellos a quien amo
Por que son mi razón para ser mejor

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Luis Alejandro Barrera, Director del Instituto de Errores Innatos del Metabolismo, por todas las oportunidades ofrecidas, las enseñanzas impartidas, la confianza brindada, la palabra de ánimo en el momento oportuno, el respaldo incondicional y su gran nobleza.

Al Doctor Felipe García, por abrirme las puertas del Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis de la Universidad del Valle y por sus valiosos aportes científicos para la realización de este trabajo.

Al Doctor Shuji Tomatsu de la Universidad de Saint Louis, por la colaboración prestada, el conocimiento impartido y el apoyo profesional.

A Olga Yaneth Echeverri, un ejemplo vivo de amistad, por que sencillamente sin ella, hubiera sido imposible culminar.

A Flavio Cerón, biólogo del Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis de la Universidad del Valle, por los consejos ofrecidos y por hacerme mucho más fácil el inicio del camino recorrido.

A Jenny Granados, por que mas que la secretaria del Instituto de Errores Innatos del Metabolismo, es una amiga que en incontables ocasiones facilito mi trabajo y lo hizo mucho más ameno.

A Ana Maria Rosa Muete, Asistente en la limpieza del Instituto de Errores Innatos del Metabolismo, por cada palabra dicha, cada café servido, cada abrazo brindado.

A cada uno de los integrantes del Instituto de Errores Innatos del Metabolismo que estuvieron apoyándome en el comienzo o en la recta final, por que hasta el más mínimo detalle ofrecido sirvió para realizar un mejor trabajo.

A la Pontificia Universidad Javeriana, Colciencias, Fundación Banco de la República y a la Universidad de Saint Louis, por el apoyo financiero.

Por último, a Timothy Becker, por que me dio la fortaleza necesaria para no desfallecer y por que me cada día me dio un motivo mas para persistir.

**PRODUCCIÓN DE VECTORES DERIVADOS DE VIRUS ADENOASOCIADOS (AAV)
COMO MODELO DE TERAPIA GÉNICA PARA MUCOPOLISACARIDOSIS**

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.....	4
2.1.	Mucopolisacaridosis Tipo II (Síndrome de Hunter).....	4
2.2.	Mucopolisacaridosis Tipo IVA o Síndrome de Morquio A.....	8
2.3.	Tratamiento de las MPS.....	9
2.4.	Expresión de enzimas lisosomales humanas.....	10
2.5.	Terapia génica.....	11
2.5.1.	Vectores virales.....	12
2.5.1.1.	Retrovirus.....	12
2.5.1.2.	Herpes virus simplex.....	13
2.5.1.3.	Adenovirus.....	13
2.5.1.4.	Virus adenoasociados (AAV).....	14
2.5.1.4.1.	Aplicaciones de los virus vectores adenoasociados en la terapia de las mucopolisacaridosis.....	17
2.5.2.	Vector no-viral: Complejo ADN-liposoma.....	18
2.5.3.	El vector ideal.....	18
3.	OBJETIVOS.....	20
3.1.	Objetivo General.....	20
3.2.	Objetivos Específicos.....	20
4.	MATERIALES Y METODOS.....	21

4.1	Cultivos bacterianos - Escherichia coli.....	21
4.2.	Construcción del sistema de expresión en células de mamífero: pIRESneo ₂ -IDS.....	21
4.3.	Transformación de E. coli con los plásmidos.....	23
4.3.1.	Escherichia coli ccompetentes.....	23
4.3.2.	Transformación de las bacterias competentes.....	23
4.3.3.	Extracción del ADN de los plásmidos.....	23
4.4.	Selección de clones positivos para el plásmido pIRESneo ₂ -IDS.....	24
4.5.	Cultivo de fibroblastos y transfección.....	24
4.5.1	Transfección mediante el método de fosfato de calcio.....	25
4.6.	Determinación de la actividad enzimática de la IDS.....	25
4.7.	Construcción del cassette de expresión episomal pIRESneo ₂ -GALNS.....	26
4.8.	Construcción del vector derivado de AAV.....	30
4.8.1.	Plásmido vector pSub201.....	30
4.8.2.	Plásmido vector pXX2.....	31
4.8.3.	Plásmido vector pXX6.....	31
4.8.4.	Construcción de pAAV-GALNS.....	31
4.9.	Producción de partículas virales AAV recombinantes (rAAV-GALNS).....	35
4.9.1	Preparación de las células 293 para la co-transfección con los plásmidos pAAV-GALNS recombinantes, pXX2 y pXX6.....	36
4.10.	Titulación de partículas vírales de AAV.....	38
4.11.	Infección de las células con los rAAV-GALNS.....	38
4.12.	Determinación de la actividad enzimática de la GALNS.....	39
5.	RESULTADOS.....	41

5.1.	Construcción del vector de expresión episomal pIRESneo ₂ -IDS.....	41
5.2.	Expresión "in vitro" del pIRESneo ₂ -IDS en Fibroblastos deficientes de la enzima.....	43
5.3.	Generación del vector de expresión pIRESneo ₂ -GALNS....	47
5.4.	Confirmación de la integridad y direccionalidad del cADN inserto en el pIRESneo ₂ -GALNS	49
5.4.1.	Análisis de restricción del pIRESneo ₂ -GALNS.....	49
5.4.2.	Secuenciación del pIRESneo ₂ -GALNS.....	51
5.5.	Generación de pAAV-GALNS.....	52
5.5.1.	Secuenciación parcial del pAAV-GALNS.....	53
5.5.2.	Amplificación por PCR del pIRESneo ₂ -GALNS, pAAV-GALNS y análisis de restricción de los productos de PCR.....	55
5.6.	Producción de partículas vírales de AAV recombinantes.....	57
5.7.	Expresión "in vitro" de los vectores rAAV-GALNS generados en células 293 y en fibroblastos Morquio A.....	58
6.	DISCUSIÓN.....	60
7.	CONCLUSIONES.....	64
8.	RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS.....	65
9.	REFERENCIAS.....	66
10.	ANEXOS.....	81

ANEXO 1. Sitios de restricción del cADN del pIRESneo₂-
GALNS

ANEXO 2. Sitios de restricción del pAAV-GALNS con el cassette de expresión insertado en la orientación correcta

ANEXO 3. Sitios de restricción del pAAV-GALNS con el cassette de expresión insertado en sentido equivocado

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Esquema del plásmido pIRESneo ₂ y del sitio múltiple de clonación.....	22
FIGURA 2.	Secuencia parcial del cADN de la GALNS:	29
FIGURA 3.	Esquema circular del pSub201.....	30
FIGURA 4.	Esquema lineal de los plásmidos de empaquetamiento y ayudadores.....	31
FIGURA 5.	Esquema de construcción del plásmido pAAV-GALNS....	32
FIGURA 6.	Esquema circular del pSub201.....	33
FIGURA 7.	Casete de expresión pIRESneo ₂ -GALNS.....	33
FIGURA 8.	Esquema circular del plásmido pAAV-GALNS.....	35
FIGURA 9.	Esquema circular del pIRESneo ₂ -IDS.....	42
FIGURA 10:	Patrón de restricción en EcoRI del pUC13-IDS:.....	42
FIGURA 11:	Selección de los clones recombinantes pIRESneo ₂ -IDS mediante digestión con EcoRI.	43
FIGURA 12.	PCR del ADN plasmídico pIRESneo ₂ y pIRESneo ₂ -IDS...	44
FIGURA 13.	Fibroblastos provenientes de un paciente con síndrome de Hunter.....	45
FIGURA 14.	Expresión "in vitro" de la IDS mediada por el construido pIRESneo ₂ -IDS en fibroblastos deficientes de la enzima.....	46
FIGURA 15.	pCXN-GALNS digerido con EcoRI.....	48
FIGURA 16.	Esquema lineal de los plásmidos pIRESneo ₂ , pIRESneo ₂ -IDS, pIRESneo ₂ -GALNS.....	49
FIGURA 17:	Selección de clones recombinantes pIRESneo ₂ -GALNS por digestión con EcoRI.....	50

FIGURA 18:	Confirmación de la direccionalidad del cADN de la GALNS inserto, mediante análisis de restricción.....	51
FIGURA 19.	Selección de los plásmidos pAAV-GALNS recombinantes mediante restricción con EcoRI.....	52
FIGURA 20.	Análisis de restricción del pAAV-GALNS con NdeI.....	54
FIGURA 21.	Análisis de restricción del pAAV-GALNS con NaeI.....	55
FIGURA 22.	PCR del ADN plásmidico pIRESneo ₂ -GALNS y pAAV-GALNS.....	56
FIGURA 23.	Confirmación del PCR realizado a pIRESneo ₂ -GALNS y pAAV-GALNS mediante digestión con BamHI.....	57
FIGURA 24.	Partículas virales recombinantes rAAV-GALNS producidas a las 48 horas post-transfección.....	58
FIGURA 25.	Expresión "in vitro" de los rAAV-GALNS en células 293.....	59
FIGURA 26.	Expresión "in vitro" de los rAAV-GALNS en fibroblastos con deficiencia en la actividad enzimática de GALNS.....	59

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Tabla comparativa de las características de la GALNS y de la IDS.....	5
Tabla 2.	Incidencia de la MPS II.....	6
Tabla 3.	Mutaciones en el gen IDS.....	8
Tabla 4.	Mutaciones en el gen GALNS.....	9
Tabla 5.	Co-transfecciones realizadas en células 293 para la producción de AAV nativos y AAV recombinantes.....	37
Tabla 6.	Actividad enzimática intracelular de IDS en fibroblastos después de la transfección con pIRESneo ₂ -IDS.....	47

RESUMEN

Las mucopolisacaridoses (MPS) son enfermedades lisosomales caracterizadas por la deficiencia de una de las hidrolasas ácidas que catalizan la degradación de los glicosaminoglicanos (GAGs). La deficiencia enzimática da como resultado la acumulación de GAGs. Las MPS se clasifican en siete subgrupos diferentes.

La enfermedad de Hunter (MPS II) se produce por la deficiencia de la iduronato-2-sulfatasa (IDS). La enfermedad de Morquio (MPS IVA) es causada por la disminución o ausencia de la actividad de la enzima N-acetil-galactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS).

Un tratamiento ideal para este tipo de entidades, es el que se pueda instaurar en etapas tempranas de la vida del afectado, con baja morbilidad, mortalidad y que a largo plazo permita una expresión estable de la enzima involucrada, la terapia génica podría cumplir con estos requerimientos.

Este estudio constó de dos etapas: En la primera se construyó el casete de expresión episomal pIRESneo₂-IDS y se evaluó la funcionalidad en fibroblastos de un paciente con síndrome de Hunter, las células transfectadas mostraron 2 a 3 veces más actividad enzimática que las células no transfectadas, la expresión de la IDS se mantuvo en las células transfectadas durante 4 semanas. Una vez establecida la funcionalidad del constructo, se aplicó el mismo diseño para la construcción del pIRESneo₂-GALNS, utilizado en la generación del vector empleado para la producción de los virus adenoasociados (AAV) recombinantes pAAV-GALNS, dicho plásmido tiene inserto el cADN humano completo codificante de GALNS. Los AAV recombinantes se produjeron mediante un sistema libre de adenovirus (virus ayudadores). El próximo paso será evaluar la expresión a largo plazo del transgen *in vitro* e *in vivo* utilizando el modelo murino de Morquio A, para establecer si

la enzima expresada es capaz de reducir los depositos de GAGs o si por el contrario es necesario introducir en el modelo un promotor mas fuerte.

ABSTRACT

The mucopolysaccharidoses (MPS) are inborn errors of metabolism, caused by lack of activity of one of all the acid hydrolases involved in the degradation of glycosaminoglycans (GAGs).

The MPS II (Hunter syndrome) is caused by a deficiency of the iduronate-2-sulfatase (IDS). The MPS IVA or Morquio syndrome is caused by a deficiency of the lysosomal enzyme N-acetylgalactosamine-6-sulphate sulphotase (GALNS).

A suitable treatment for a genetic disease would be one that can be administered early in life, producing low mortality and morbidity and leading to long term expression of the respective enzyme. Gene therapy might be a route to be pursued for treatment of the diseases.

This study did consist of two parts: 1.) The episomal expression vector "pIRESneo₂-IDS" containing the human IDS cDNA was constructed and "*in vitro*" used to transfect skin fibroblasts from a human patient with MPS II. The "pIRESneo₂-IDS" expressed significant levels of enzymatic activity in these tested cells. A month after the transfection, the transfected MPS II fibroblasts showed two to three fold IDS activity in comparison with non-transfected cells. 2.) After the demonstration of the functionality of the episomal expression cassette, the same strategy was used to construct the plasmid pIRESneo₂-GALNS. The adenoassociated virus (AAV) vector pAAV-GALNS containing the expression cassette with the full length human GALNS cDNA was constructed, as a first step to develop and produce the recombinant AAV-GALNS by a novel adenovirus free system. The following phases of the study will evaluate the "*in vitro*" and "*in vivo*" stable expression using skin fibroblasts from

MPS IVA mice, human patient fibroblasts and Morquio A tolerant mice. Thus, these studies will provide important bases for the development of gene therapy for these disorders.

PRODUCCION DE VECTORES DERIVADOS DE VIRUS ADENOASOCIADOS (AAV) COMO MODELO DE TERAPIA GENICA PARA MUCOPOLISACARIDOSIS

1. INTRODUCCION

Las mucopolisacaridosis (MPS) son enfermedades causadas por la deficiencia de una de las hidrolasas ácidas que catalizan la degradación de los glicosaminoglicanos (GAGs), acumulándose en diferentes tejidos. Las MPS se clasifican en siete subgrupos diferentes y son producidas por la deficiencia de una enzima específica.

La MPS II se origina como consecuencia de la deficiencia en la actividad de la Iduronato sulfatasa (IDS), produciendo acumulación sistémica de heparán y dermatán sulfato. La MPS IVA es causada por la deficiencia de la actividad enzimática de la GALNS, con la consecuente acumulación de queratán y condroitín 6 sulfato en tejidos y aumento en la excreción urinaria. Estas dos MPS se caracterizan por displasia esquelética severa, facies toscas, disostosis múltiple, anomalías articulares, opacidad corneal estromal que esta presente en todos los pacientes adultos, cifoescoliosis y enanismo. En la MPS II hay retardo mental, mientras que en la MPS IVA el intelecto se mantiene normal.

Actualmente, no existe un tratamiento definitivo para ninguna de estas dos MPS. El manejo es tan sólo paliativo y se ha enfocado en la corrección de las manifestaciones clínicas. Para el tratamiento de MPS diferentes terapias han sido evaluadas, por ejemplo; terapia de reemplazo enzimático (TRE), trasplante de médula ósea y terapia génica. Varias investigaciones se han basado en desarrollar TRE mediante infusión de plasma normal pero esta metodología resulta muy costosa e inconveniente. Ensayos clínicos de trasplante alogénico de médula ósea han producido corrección metabólica en algunos tejidos; pero la poca disponibilidad de donantes limita su aplicación, además existe alta probabilidad de mortalidad y de presentarse complicaciones. Otros investigadores han mostrado que los trasplantes alogénicos de médula ósea no han prevenido la progresión neurológica en pacientes con fenotipo severo MPS II, razón por la cual, sólo pacientes con la forma intermedia son considerados para ese procedimiento. Para la mayoría de los errores innatos del metabolismo, es indispensable instaurar un tratamiento a tiempo para prevenir las secuelas a largo plazo. Dicho tratamiento debe presentar bajas tasas de morbilidad, mortalidad y debe permitir la expresión a largo plazo de la enzima deficiente.

Todo esto ha hecho que se hayan dedicado muchos esfuerzos para desarrollar terapias permanentes y definitivas.

En los últimos años, los modelos animales desarrollados han sido de gran ayuda para el estudio de tratamientos para enfermedades de depósito lisosomal. Algunos de los protocolos ensayados en modelos animales han mostrado una mejoría de la patología clínica, reduciendo los depósitos de GAGs en órganos viscerales como hígado y bazo. Sin embargo, no han logrado corregir la patología en los tejidos blanco de estos desórdenes (cartílago, cornea y para algunas de las MPS cerebro), puesto que las enzimas no se han direccionado específicamente a estos tejidos. Aunque parte de las enzimas administradas mediante TRE pueden llegar a médula ósea, no hay garantía alguna que las enzimas se dirijan a los huesos o a las células cartilaginosas ubicadas en la placa de osificación endocondral la cual es avascular. El hecho que la córnea y el cartilago, tejidos afectados tanto en MPS II, como en MPS IVA, sean avasculares genera un inconveniente para el éxito de la TRE. En este contexto, reducir el depósito lisosomal en los tejidos mencionados no se ha logrado todavía. Una terapia génica exitosa llenaría a cabalidad estas expectativas.

Se han realizado estudios evaluando transferencia génica en células progenitoras multipotentes mediada por vectores retrovirales para entidades como; MPS I, MPS II, MPS IVA y MPS VII, logrando detener el proceso de la enfermedad, abriendo las expectativas de una terapia génica potencial. Otros grupos de investigación han construido vectores adenovirales y generado un vector capaz de *expresar "in vitro"* niveles altos de IDS. Las dos formas de transferencia génica mencionadas, han logrado reducir la acumulación de mucopolisacáridos en las células tratadas. Cabe resaltar que en otras patologías, el uso de vectores adenovirales como mecanismo de transferencia génica, no ha producido los resultados esperados, debido a la estimulación de respuesta inmune o inflamatoria en algunos huéspedes.

Recientemente se ha evaluado la utilidad de los vectores derivados de virus adenoasociados (AAV) para la transferencia génica. Se ha demostrado que en humanos, la integración de los AAV ocurre específicamente en el cromosoma 19, constituyéndose en una alternativa potencialmente segura para la integración de una nueva información genética. Los AAV tienen la ventaja de expresarse en células que no se replican mitóticamente, por lo cual son ideales para la introducción de genes en tejidos no proliferativos. Se ha logrado demostrar expresión persistente de AAV recombinantes en diferentes tejidos. La capacidad para expresarse en múltiples órganos, junto con la naturaleza no patógena de los virus nativos, hace que los AAV sean una alternativa excelente para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosomal. Hasta la fecha no hay reportes de estudios que utilicen AAV para corregir la deficiencia de GALNS, ni de IDS. Estudios realizados en el modelo murino de MPS VII, demostraron que la inyección

intravenosa de AAV recombinantes con el cADN humano de la beta-glucuronidasa producen la expresión de niveles altos de la enzima, sugiriendo que la transferencia génica mediada por AAV puede lograr excelentes resultados en la restauración de la actividad enzimática en este tipo de entidades.

Con base en estos resultados exitosos, se decidió trabajar en el desarrollo de un vector para producir AAV recombinantes, mediante un sistema libre de virus ayudadores (adenovirus). Para lograr este objetivo, se construyó el vector de expresión pIRESneo₂-IDS y se evaluó su funcionalidad en fibroblastos provenientes de un paciente con MPS II. Al establecerse la funcionalidad del constructo pIRESneo₂-IDS, pensando en el futuro de la investigación y dado que para ese momento no se disponía de un modelo animal asequible para la MPS II, fue necesario aplicar la experiencia adquirida a otra MPS con un modelo animal fácilmente trabajable, no costoso, de fácil adquisición para el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo. Gracias a trabajos colaborativos y convenios realizados con el doctor Shunji Tomatsu, quien secuenció y clonó el gen de la GALNS, se vio la pertinencia de trabajar en el síndrome de Morquio A, construyéndose el pIRESneo₂-GALNS, posteriormente utilizado para la generación del plásmido pAAV-GALNS y para la producción de los AAV recombinantes.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

Las MPS son enfermedades lisosomales caracterizadas por la deficiencia de una de las hidrolasas ácidas que catalizan la degradación de los GAGs. La deficiencia enzimática produce la acumulación de GAGs en tejidos. En las MPS, los GAGs parcialmente o no degradados se almacenan en los lisosomas de las células causando distensión celular, destrucción tisular y disfunción de los órganos involucrados. La deficiencia de GALNS causa la MPS IVA, mientras que la deficiencia de IDS produce la MPS II. La MPS IVA y la MPS II son dos de los siete tipos de MPS conocidos. Aunque tienen características clínicas muy parecidas y hacen parte del mismo conjunto de enfermedades, presentan un patrón de herencia totalmente diferente, como se puede observar en la tabla 1 (63).

2.1. Mucopolisacaridosis tipo II (Síndrome de Hunter)

La MPS II o Síndrome de Hunter, es un error innato del metabolismo, causado por la deficiencia en la actividad de la enzima lisosomal de IDS, lo cual conlleva a la acumulación sistémica de heparán y dermatán sulfato y a la excreción de los mismos en orina. En Colombia no se ha establecido la incidencia de la enfermedad. La tabla 2, muestra las incidencias reportadas en algunos países (63).

Tabla 1. Tabla comparativa de las características de la GALNS y de la IDS

Característica	GALNS	IDS
Enfermedad que produce la deficiencia	Mucopolisacaridosis IVA Síndrome de Morquio A	Mucopolisacaridosis II Síndrome de Hunter
Patrón de herencia	Autosómica Recesiva	Recesiva ligada al cromosoma X
Asignación cromosómica	6q24.3	Xq27-28
Estructura del genoma	14 exones y 13 intrones	9 exones y 8 intrones
Número de mutaciones reportadas	89	266
cADN	2.3 kb	2.3 kb
Aminoácidos	522	550
Péptido señal	26 aminoácidos	25 aminoácidos
Sitios potenciales de glicosilación	2	7
Forma de entrada a la célula	Vía receptor manosa 6 fosfato	Vía receptor manosa 6 fosfato
Ubicación celular	Lisosomas	Lisosomas
Función	Hidrolizar los enlaces 6 sulfato de los residuos N-acetilgalactosamina del queratán sulfato	Hidrolizar la unión éster sulfato del carbono 2 de los residuos terminales del ácido idurónico de los GAGs heparán y dermatán sulfato
Sustrato	Queratán sulfato y Condroitín 4 sulfato	Dermatán y Heparán sulfatasa
Método para la determinación enzimática	Fluorométrico	1.) Radiométrico 2.) Fluorométrico
Sustrato artificial empleado en el método	4-metilumbelliferil B-D-galactopiranosido 6 sulfato sal de sodio.	1.) O-(sulfatasa alfa-L-ácido 2-idopiranosilurónico sulfato) – (1-2,5 manitol – 6 – sulfato anhidro –D -(³ H-1) 2.) MU-α-iduronato-2-sulfato

Adaptada de la referencia 63.

Tabla 2. Incidencia de la MPS II

INCIDENCIA	LUGAR
1:78000 a 1:111000	Columbia Británica
1:132000	Gran Bretaña
1:36000	Israel

Adaptada de la referencia 63.

La IDS actúa en los lisosomas, como una exosulfatasa para hidrolizar la unión éster sulfato del carbono 2 de los residuos terminales del ácido idurónico del heparán y dermatán sulfato. La enzima ha sido purificada de plasma humano, placenta e hígado (63).

La MPS II es un desorden progresivo, la sintomatología clínica incluye facies toscas, disostosis múltiple, estatura corta, anomalías esqueléticas, hepatoesplenomegalia, enfermedad cardiovascular, hipertensión pulmonar, obstrucción de las vías aéreas, varios grados de anomalías en sistema nervioso central (SNC), retardo mental y muerte prematura (63,72,129,130).

Se han establecido dos presentaciones clínicas de la enfermedad:

Forma severa (MPS II A): Se presenta entre los 2 y 4 años de edad, con retardo mental, disturbios en el comportamiento y en la mayoría de los casos muerte antes de la adolescencia. Hay presentación de hernias inguinales y umbilicales. La disostosis y cifoescoliosis se hacen más obvias con la edad y son la causa primordial de la baja estatura de estos pacientes. La principal causa de muerte es la falla respiratoria obstructiva y falla cardíaca por disfunción valvular. La expectativa de vida es de aproximadamente 15 años. (31, 63, 72, 129,130).

Forma intermedia (MPS II B): Las personas afectadas preservan la inteligencia, la estatura es cercana a los estándares normales. Los pacientes pueden sobrevivir hasta la quinta o sexta década de la vida y normalmente la causa de muerte es la insuficiencia cardíaca. Se ha reportado descendencia de afectados. En esta forma de MPS II no se ha observado hidrocefalos (31, 63, 72, 129,130).

Usualmente el criterio empleado para determinar la severidad, está dado por el grado de retardo mental, el cual es difícil de determinar en pacientes jóvenes (31). Adicionalmente, se ha intentado crear relaciones genotipo-fenotipo para explicar no sólo la gran heterogeneidad clínica, sino también para establecer el pronóstico de la enfermedad (31). Sin embargo, no siempre es

posible la predicción del fenotipo de un paciente basándose en el genotipo. La eficacia de terapias para enfermedades lisosomales puede depender de la instauración de las mismas en etapas tempranas de la enfermedad, cuando a menudo no es posible predecir la severidad clínica. Esto tiene implicaciones en terapias para MPS II, como el trasplante de médula ósea, el cual no es exitoso en paciente con la forma severa de la entidad (31, 62)

La caracterización de la IDS hace posible el diagnóstico definitivo del síndrome mediante determinación de la actividad enzimática. En la actualidad, se encuentran disponibles dos clases de sustratos artificiales: 1.) Sustrato radiométrico, ácido O-(alfa-L-iduropiranosilurónico 2 sulfato) – (1-2,5 anhidro-D-(3H-1) manitol – 6 – sulfato (87). 2.) Sustrato fluorométrico, 4-metilumbeliferil- α -iduronato-2-sulfato. En pacientes con el síndrome, la actividad enzimática varía entre no detectable y algo de actividad residual.

La MPS II es la única MPS que presenta un patrón de herencia ligado al cromosoma X. Mediante análisis de ligamiento en familias Hunter, se logró mapear el locus de la IDS en el cromosoma Xq27-28 (9, 63, 72,118). Se ha aislado y secuenciado un cADN de 2.3 kb que codifica para la secuencia completa de la IDS humana. Los análisis del precursor de 550 aminoácidos, indican que la IDS tiene una secuencia señal de 25 aminoácidos y siete sitios potenciales de glicosilación. Se ha encontrado una fuerte homología en las secuencias de la IDS con las arilsulfatasas humanas A, B, C y con la glucosamina 6 sulfatasa (58, 63,118).

En posteriores estudios, se reportó la estructura del gen de la IDS, el cual está conformado por 9 exones y 8 intrones (29). Ellos caracterizaron las secuencias intrónicas alrededor de los 9 exones, encontrando que el gen de la IDS no presenta relación alguna con la organización exónica de las sulfatasas esteroideas (71). Esto sugiere que la división de las sulfatasas en dos subgrupos, basada en la especificidad de sustrato, refleja el nivel de la estructura génica. Posteriormente, se descifró la organización del gen de la IDS y suministró la secuencia completa que tiene aproximadamente 24 kb (117).

Estudios moleculares usando hibridación y secuenciación del cADN mostraron un amplio espectro de alteraciones genéticas en el gen de la IDS. Los pacientes con deleciones totales o grandes rearrreglos tienen una presentación clínica severa. Hasta el momento se han reportado 309 mutaciones en el gen (Tabla 3)

(<http://uwcmml1s.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/120521.html>) [Consulta: 17 marzo 2005]

Tabla 3. Mutaciones en el gen IDS

Tipo de Mutación	Número Total de Mutaciones
Sustitución de nucleótidos (sin sentido/ sentido equivocado)	167
Sustitución de nucleótidos (splicing)	27
Deleciones pequeñas	55
Inserciones pequeñas	23
Deleciones/inserciones pequeñas	2
Deleciones grandes	26
Inserciones grandes y duplicaciones	1
Rearreglos complejos (incluyendo inversiones)	8
TOTAL	309

Adaptada de la referencia 63.

2.2. Mucopolisacaridosis tipo IVA o Síndrome de Morquio A

El Síndrome de Morquio o MPS IVA (McKusick 253000) es un error innato del metabolismo, el cual se hereda como un carácter autosómico recesivo. Es causado por deficiencia en la actividad de la enzima lisosomal GALNS (E.C.3.1.6.4), con la consecuente acumulación sistémica de queratán y condroitín 6 sulfato degradados parcialmente y aumento en la excreción urinaria (7,103). La incidencia de la enfermedad es desconocida, pero se estima entre 1:40000 y 1:50000 nacidos vivos (63,64).

La enfermedad puede ser clasificada clínicamente en varios subtipos: forma severa, forma intermedia y forma leve. La enfermedad es caracterizada por displasia esquelética severa con estatura corta, facies toscas, disostosis múltiple, anormalidades articulares, opacidad corneal estromal que esta presente en todos los pacientes adultos, hipoplasia odontoide, cuello corto, pectus carinatum, cifoescoliosis y enanismo, el intelecto se conserva normal (63,64,99).

El gen responsable de este desorden fue secuenciado y mapeado en 6q24. GALNS es una enzima que hidroliza las uniones sulfato-ester de la GalNac-6S en el extremo no reductor del condroitín 6 sulfato y la galactosa 6 sulfato en el extremo no reductor del queratán sulfato (7). Tomatsu y colaboradores, clonaron y secuenciaron el cADN de la GALNS humana placentaria. La secuencia codificante tiene 1566 nucleótidos que codifican un polipéptido de 522 residuos aminoácidos (11). Hasta el momento se han reportado 96 mutaciones en el gen que codifica para la GALNS (Tabla 4) (99, 100, 102,103).

(<http://uwcmml1s.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/129085.html>) [Consulta: 17 marzo 2005]

Tabla 4. Mutaciones en el gen GALNS

Tipo de Mutación	Número total de mutaciones
Sustitución de nucleótidos (sin sentido/ sentido equivocado)	71
Sustitución de nucleótidos (splicing)	6
Deleciones pequeñas	13
Inserciones pequeñas	2
Deleciones grandes	2
Rearreglos complejos (incluyendo inversiones)	2
TOTAL	96

Adaptada de la referencia 63.

2.3. Tratamiento de las MPS

El manejo clínico de las MPS se hace corrigiendo las manifestaciones clínicas de la enfermedad, suministrando cuidados y manejando las complicaciones. El establecimiento de un tratamiento temprano es crítico para prevenir las secuelas desarrolladas a largo término.

La terapia de reemplazo enzimático (TRE), es una estrategia bien establecida para el tratamiento de enfermedades de depósito lisosomal incluyendo las MPS. Después de administración intravenosa, la entrada de la enzima a las células blanco está mediada por receptores específicos para oligosacáridos presentes en la enzima. Se sabe que los receptores manosa (RM), principalmente ubicados en células del sistema del retículo endotelial tienen afinidad por oligosacáridos ricos en manosa presentes en las enzimas lisosomales. Así mismo, los receptores manosa 6 fosfato (RM6F) pueden interactuar con oligosacáridos fosforilados ricos en manosa (50). En las últimas tres décadas, las investigaciones enfocadas a desarrollar TRE han tenido grandes progresos. Estudios iniciales en TRE utilizando la enzima β -glucuronidasa (GUS), mostraron corrección de la acumulación de GAGs en fibroblastos de pacientes con MPS VII (38). Trabajos realizados con ratas, las cuales recibieron inoculaciones de la enzima GUS, principalmente no fosforilada, mostraron la importancia de los oligosacáridos ricos en manosa para entregar la enzima a macrófagos presentes en los tejidos (1). En algunas de las enfermedades de almacenamiento lisosomal, el depósito compromete tipos celulares que carecen de RM, por lo tanto el direccionamiento de estas enzimas se hace gracias a los RM6F. Por ejemplo, α -L-iduronidasa, GALNS, GUS, IDS, α -galactosidasa A, enzimas deficientes en MPS I, MPS IVA, MPS VII, MPS II y enfermedad de Fabry, respectivamente, son internalizadas por fibroblastos mediante unión con el RM6F. La importancia de la existencia de residuos manosa 6

fosfato en las enzimas para el direccionamiento a células no pertenecientes al sistema retículo endotelial fue demostrado en el modelo murino de la MPS VII (82). Sin embargo, dicho direccionamiento a células con RM6F ha sido difícil puesto que muchas de las enzimas lisosomales inyectadas en los modelos animales tienen una vida media corta en circulación, básicamente debido a la depuración rápida de la enzima por los RM presentes hígado y bazo (1).

Gracias a que las células pueden tomar estas enzimas del medio a través de receptores específicos, se han realizado investigaciones basadas en infusión de plasma normal o leucocitos a pacientes, pero estas no arrojaron los resultados esperados (8). La TRE está clínicamente disponible o en ensayos clínicos para varias de las MPS incluyendo MPS I (47), MPS II (61) y MPS VI. Estas terapias han mostrado una clara reducción de la patología en órganos viscerales, pero poca o ninguna eficacia en hueso, cartílago, cornea y cerebro puesto que las enzimas no han logrado llegar eficientemente a estos tejidos.

La TRE para la MPS II está en la fase clínica I/II, en estudios adelantados por la compañía farmacéutica Transkaryotic Therapies, Inc. (TKT). (Ya esta autorizada su comercialización en Europa). El esquema de terapia consistió de infusiones intravenosas de IDS a 12 pacientes, utilizando tres dosis diferentes (0.15, 0.5 y 1.5 mg/kg) de la enzima, las cuales fueron suministradas durante una hora, cada dos semanas con una duración de un año (61). Después del año de tratamiento la excreción de GAGs urinarios se mantiene 45% por debajo de los niveles mostrados al comienzo del estudio. En todos los pacientes, la capacidad respiratoria se mantiene. En los pacientes que recibieron dosis altas de IDS, se lograron adelantos en la prueba de caminar durante 6 minutos. Aunque en 6 de 8 pacientes tratados con las dos dosis más altas se detectaron anticuerpos IgG específicos para IDS (61).

Por otro lado, se han realizados intentos clínicos con trasplante alogénico de médula ósea, los cuales muestran evidencia de corrección del defecto metabólico en algunos tejidos, pero la poca disponibilidad de donantes limita esta terapia. Existe una significativa tasa de mortalidad y se pueden presentar complicaciones como rechazo al trasplante (8). Otras investigaciones han encontrado que el trasplante de médula ósea alogénico en pacientes con MPS II, no fue efectivo en prevenir las consecuencias neurológicas (57).

2.4. Expresión de enzimas lisosomales humanas

Los sistemas de expresión son invaluable para la producción estable de proteínas humanas, las cuales requieren varias modificaciones post-transcripcionales para el plegamiento, estabilidad, y/o función (10). Hay varios sistemas disponibles, entre los cuales están los vectores basados en secuencias SV-40 que contienen marcadores seleccionables, tales como, dihidrofolato reductasa,

para permitir una integración estable, niveles altos de expresión del marcador seleccionable y del gene de interés en las células de mamíferos. La sobreexpresión de cADN en células CHO resulta en la síntesis de proteínas recombinantes con modificaciones postranslacionales similares a las de los nativos. Estos sistemas producen grandes cantidades de proteína recombinante, lo que facilita la eficiente caracterización de las proteínas biosintetizadas y provee abundante proteína (10).

La mayoría de los cADNs sobreexpresados en células de ovario de hamster (CHO) pueden codificar para proteínas secretoras o de membrana. Sin embargo proteínas dirigidas a organelos específicos no han sido expresadas establemente. Después de la producción estable de altos niveles de proteína, cada una de las glucoproteínas es retenida normalmente en retículo endoplasmático (RE), donde son procesadas y secretadas selectivamente. Sin embargo, ningún mecanismo de secreción ha sido identificado. Estos estudios de biosíntesis y de procesamiento de sobreproducción lisosomal, de vías secretorias de RE aparato de golgi en células CHO podrían determinarse si otras proteínas con tráfico intracelular específico pueden ser localizadas y secretadas selectivamente (10).

La enzima es sintetizada normalmente y procesada hasta que alcanza el sistema trans-Golgi. La enzima sobreproducida se acumula en un medio ambiente más ácido, pH ~6.0, lo cual causa aumento en las interacciones proteína – proteína que generan agregados solubles. Como resultado de esta agregación las enzimas que entran vía manosa 6 fosfato se vuelven inaccesibles o menos accesibles por unión al RM6F. Los agregados inaccesibles, son re-enrutados por la vía secretoria constitutiva. Una cierta cantidad de enzima sintetizada, puede mantenerse soluble por lo cual puede interactuar con el RM6F y puede ser transportada a los lisosomas. Una porción de la enzima secretada se puede volver soluble y se puede internalizar y ser llevada a los lisosomas después de la unión al RM6F ubicado en la superficie celular (10).

Una hipótesis alternativa para la entrega de agregados de enzima a los lisosomas, podría involucrar auto fagocitosis de los agregados conteniendo porciones del sistema trans Golgi.

2.5. Terapia Génica

Es una estrategia terapéutica basada en la modificación de un gen en células somáticas mediante la administración de ácidos nucleicos destinada a curar enfermedades de origen hereditario y adquirido (39). En la actualidad no cabe duda que la adecuada articulación de estos conocimientos junto con los avances propiciados por el Proyecto Genoma Humano, así como el mejor conocimiento de las bases moleculares de la patología, los estudios experimentales en terapia génica y el desarrollo de vectores que permitan la entrega selectiva, segura y eficaz de

genes, permitirán en un futuro próximo la utilización ácidos nucleicos como fármacos o medicamentos sea una realidad (68, 91, 106).

La terapia génica es de gran potencial para el tratamiento de muchos procesos incluyendo el cáncer y enfermedades genéticas e infecciosas (39, 55, 60). Esta terapia involucra el tratamiento a nivel molecular a través de la inserción de la información genética, ADN o genes en células afectadas. A la célula se le da una información que codifica para la producción de proteínas empleadas terapéuticamente (65, 122). Esto convierte la célula en una fábrica farmacéutica para la producción personalizada de una droga terapéutica. Esta terapia puede reemplazar un gen defectuoso, puede suplir genes supresores de tumores, genes anti-oncogénicos, así como también genes que estimulan la respuesta inmune y genes anti-virales (55, 91, 106).

La mayor parte de los ensayos clínicos en terapia génica, dirigidos principalmente a corregir desórdenes hereditarios o al tratamiento del cáncer, han utilizado como vectores virales los retrovirus o adenovirus y como vectores no-virales los complejos ADN-liposoma (55, 111, 114).

2.5.1 Vectores Virales

2.5.1.1. Retrovirus

Tienen un genoma de aproximadamente 9.7 kb. Está constituido por una cadena simple de RNA, se replican mediante la formación de una cadena doble de ADN (provirus) como intermediario. En el ciclo vital del virus existe una etapa obligatoria en la que la doble cadena de ADN se inserta en el genoma de la célula huésped (merced a las secuencias LTR del virus), llegando así a formar parte del material genético de la célula que infectada (74). Los vectores retrovirales utilizados en terapia génica humana, pierden su capacidad de replicación al eliminar del virus las secuencias gag, pol y env que codifican nucleoproteínas, proteínas responsables de la síntesis o recombinación de los ácidos nucleicos y componentes de la envoltura de la partícula viral, respectivamente (49, 79). Al genoma viral se le incorpora una nueva secuencia génica que contiene el gen terapéutico (26, 96).

El vector retroviral, deficiente en replicación, se amplifica mediante crecimiento en una línea celular especial (células empaquetadoras) que contienen en su genoma las secuencias gag, pol y env necesarias para la replicación y empaquetamiento del virus. El vector con el gen terapéutico infecta a la célula blanco y una vez en el citoplasma, la transcriptasa inversa convierte el vector

RNA en el ADN proviral el cual se integra al azar en el genoma de la célula infectada y se expresará el producto terapéutico (26, 96).

Se han efectuado estudios evaluando la transferencia génica mediada por retrovirus en células hematopoyéticas, para entidades como MPS II (8), MPS IVA (97), MPS VII (44), MPS I (5) y MPS VI (90), logrando detener el proceso de la enfermedad, lo cual abre las expectativas de la terapia génica.

Estudios *"in vitro"* demostraron la corrección del defecto enzimático en el síndrome de Hunter, empleando un vector retroviral que contiene la secuencia que codifica para la IDS humana. El vector recombinante se introdujo en líneas celulares linfoblastoides de pacientes, mostrándose aumento en la actividad enzimática de 10 a 70 veces más que los niveles en leucocitos normales de sangre periférica humana o en líneas de células linfoblastoides. La IDS recombinante participó en el metabolismo de los GAGs, previniendo la acumulación de los mismos (8).

El único estudio reportado hasta la fecha para tratamiento de MPS IVA fue realizado por Toietta et al., en el cual construyeron el vector retroviral LGSN, para corregir la deficiencia enzimática (97). Ellos evaluaron la expresión del cADN de GALNS en una línea celular linfoblastoide, linfocitos, queratinocitos humanos, mioblastos murinos y sinoviocitos de conejo. Co-cultivos de estas células con fibroblastos humanos deficientes de la enzima mostraron corrección del defecto enzimático y reducción de los GAGs acumulados (97).

2.5.1.2. Herpes Virus Simplex

El Herpes virus simplex tipo I (HSV-1) es neurotrópico y se ha utilizado para mediar la transferencia génica a sistema nervioso (48, 120). El HSV-1 nativo es capaz de infectar neuronas y producir ciclo lítico o permanecer en estado latente como episoma intranuclear (84). Aunque cuando el virus está en estado latente es transcripcionalmente silencioso, los que se utilizan como vectores tienen promotores específicos que le permiten funcionar durante el estado de latencia (59, 94). En los humanos es común encontrar anticuerpos contra HSV-1 y complicaciones debidas a la infección con herpes, como la encefalitis, son muy raras. Tienen un genoma lineal de doble cadena de ADN de 152 Kb (112, 123).

2.5.1.3. Adenovirus

Los adenovirus son virus cuyo genoma (aprox. 36 Kb) está constituido por una doble cadena lineal de ADN (85). Existe una amplia variedad de adenovirus pero los serotipos 2 y 5 son los

utilizados para construir vectores (6, 93). El genoma de los adenovirus se divide en genes tempranos (E1 a E4) y genes tardíos (L1 a L5). Puesto que la capacidad del genoma adenoviral para dirigir la producción de adenovirus reside en las secuencias ubicadas en E1, las estrategias para producir vectores adenovirales consisten en eliminar dichas secuencias e incorporar en su lugar el gen terapéutico, generando así un vector adenoviral sin capacidad de replicación (34, 93). La amplificación del vector se lleva a cabo utilizando una línea celular complementaria, conteniendo la secuencia E1 en su genoma (85). Por último, el vector adenoviral con el gen terapéutico entra a célula blanco mediante interacción de la fibra del penton con receptores específicos en la célula (88, 116). El vector se internaliza por un mecanismo mediado por receptor y una vez en el endosoma se produce la lisis del mismo (116). El ADN viral que contiene el gen terapéutico es liberado al citoplasma desde donde alcanza el núcleo y permanece como un ADN (episomal) dirigiendo la expresión del gen terapéutico. Estos vectores están dentro de los más utilizados hasta la fecha en estudios de terapia génica (53, 115, 121, 127).

Algunos grupos de investigación están construyendo vectores adenovirales y hasta el momento, han logrado generar un vector capaz de expresar “*in vitro*” niveles altos de IDS (22). Di Francesco et al., reportaron un modelo adenoviral para corregir la deficiencia lisosomal de IDS “*in vitro*”. Ellos describieron la generación de un vector adenoviral sin capacidad de replicación, AdRSVIDS, el cual es capaz de expresar niveles altos de la IDS. Después de la inyección, la acumulación de mucopolisacáridos en las células Hunter se normalizó. Además, se encontró que la endocitosis de IDS traducida ocurrió vía RM6F (7).

2.5.1.4. Virus Adenoasociados (AAV)

Los AAV pertenecen al género Dependovirus, subfamilia Parvovirinae, familia Parvoviridae. Son virus no patogénicos en los humanos, producen una expresión estable de la información genética que se transfiere a las células (42, 92). Los AAV se descubrieron como virus contaminantes en preparaciones purificadas de adenovirus. A diferencia de los adenovirus, no estimulan inflamación en el huésped, pueden infectar células que no están en división (78, 124,126). Son virus defectuosos que requieren para su replicación eficiente y producción de progenie de la co-infección con un virus ayudador como el adenovirus o el herpes simple virus (28, 107). En ausencia del virus ayudador, la infección con AAV da como resultado la integración del genoma del AAV en el ADN genómico de la célula huésped (78). Análisis del ADN genómico extraído de células infectadas en estado de latencia indican que los AAV se integran específicamente en el cromosoma 19 región q13.4 (81).

Los AAV permiten la inserción de un tamaño limitado de ADN, aproximadamente 4.7 kb. Son viriones no envueltos, con nucleocápside isométrica. Tiene 60 capsómeros por nucleocápside. Los viriones tienen una cadena sencilla de ADN lineal, con sentido positivo o negativo (28, 78). No son virus patogénicos para los humanos.

Tienen simetría icosaédrica y un diámetro de 18 a 22 nm. Las tres proteínas de cápside son VP1, VP2, VP3 y tienen un peso molecular de 87, 72 y 62 KDa, respectivamente. Con una proporción en la partícula madura de 1:1:10. Las tres proteínas de cápside son codificadas por uno de los dos marcos de lectura del virus "cap" y tiene una secuencia de aminoácidos que difiere solo en la longitud del N-terminal. Las mutaciones que afectan las tres proteínas de cápside producen virus defectuosos. Estas mutaciones permiten la síntesis de cadenas de doble hélice intermedias en la replicación, pero no permite la acumulación de ADNss. Estos viriones parecen tener baja infectividad, sugiriendo que VP1 es requerida para la estabilidad de la partícula viral y para que la infección sea eficiente (51). La expresión de varias combinaciones de las tres proteínas de cápside en células intactas sugiere que VP2 se requiere para el ensamblaje de partículas. La principal proteína de cápside es VP3 y parece que requiere la presencia de una de las proteínas de cápside menores para una eficaz localización nuclear (51).

Se cree que el ensamblaje del virus ocurre en el núcleo (107). Estudios de inmunofluorescencia indican que las proteínas de cápside y las proteínas virales no estructurales rep, se colocan en el núcleo. Estudios de distribución subcelular de proteínas de cápside sugieren que las tres proteínas de cápside forman una variedad de complejos con coeficientes de sedimentación de 10S a 180S, con picos principales a los 66S y 110S, Algunos de estos complejos están asociados con proteínas Rep (28).

Las proteínas "Rep" forman parte de una familia de cuatro proteínas. Son necesarias para la replicación del ADN viral y para el control de la expresión del gen de los AAV. Experimentos genéticos y bioquímicos sugieren que las dos proteínas más pequeñas; Rep52 y Rep40, no se necesitan para la síntesis ADN viral de doble cadena, pero son necesarias para la acumulación de ADNss y para partículas virales, sugiriendo que Rep52 y Rep40 están involucradas en el ensamblaje (27).

El genoma viral tiene dos secuencias repetidas terminales invertidas (ITRs) de 145 nucleótidos y los 125 nucleótidos terminales constituyen secuencias palindrómicas que pueden formar puentes de hidrogeno originando una horquilla. Los ITRs contienen el origen de replicación del ADN y se necesitan para el empaquetamiento viral, aunque no es muy claro cuales secuencias de los ITRs son necesarias para dicho empaquetamiento (28).

Algunos experimentos sugieren que las proteínas de cápside sintetizadas son rápidamente ensambladas en cápsides y se asocian con el ADN. Estos intermediarios son luego convertidos en viriones maduros en un proceso lento que requiere varias horas. Uno de los intermediarios se logró identificar como una partícula 60S con una densidad idéntica a la de partículas maduras, pero los componentes ADN fueron sensibles a ADNasa. La inhibición de la síntesis de ADN con hidroximetiluracilo inhibe también el empaquetamiento, sugiriendo que es necesario algún paso en la síntesis de ADN para que dicho empaquetamiento se logre. El empaquetamiento viral es un paso esencial en el ciclo de vida del virus, aunque el mecanismo es todavía poco conocido (107).

Cuando el AAV se utiliza como vector, los genes rep y cap se reemplazan por el transgen y por sus secuencias reguladoras asociadas. El tamaño total del inserto no puede exceder 4.7 Kb, que es la longitud del genoma del virus nativo, haciendo limitada la capacidad de empaquetamiento (28, 81, 92). La producción del vector recombinante requiere que rep y cap estén proporcionados en trans, junto con los productos del genoma del virus ayudador (E1a, E1b, E2a, E4 y RNA del VA del genoma del adenovirus). El método convencional requiere la utilización de dos plásmidos, uno como vector ayudador y otro como vector de empaquetamiento suministrando rep y cap. La co-trasfección se realiza en la línea celular 293, previamente infectadas con adenovirus (81). Sin embargo, este método es de bajo rendimiento (< 10⁴ partículas/ml) y es propenso a contaminarse con adenovirus y con AAV nativo (81).

Una de las razones de la producción baja es el efecto inhibitorio del producto génico de rep en la replicación del adenovirus. Los protocolos más recientes quitan todos los genes estructurales adenovirales y utilizan plásmidos rep o conjugan un plásmido de expresión de rep al virus maduro antes de la infección (28, 81).

En ausencia de rep, el vector AAV se integrará al azar, como un provirus. El interés en los AAV se debe a su integración en el genoma del huésped permitiendo la expresión prolongada del transgen (51, 81). Se ha reportado transferencia génica en células epiteliales vasculares (54), en músculo estriado (42), en células del SNC (56) y en células hepáticas (92), mostrándose una expresión prolongada (66).

Se ha demostrado que el mecanismo de integración de los AAV nativos involucra un complejo entre el ADN del cromosoma humano 19 y el ADN de los ITRs de los AAV en presencia de las proteínas Rep78/68. Por esa capacidad para integrarse cromosomalmente y su naturaleza no patogénica, los AAV son potencialmente importantes como vectores en la terapia génica (51).

Se han identificado 9 serotipos de AAV, los cuales difieren básicamente en las proteínas de capsida (3, 11, 12, 36, 69, 77, 125). Puesto que el paso inicial para la infección viral involucra la

unión de las proteínas de capsida a receptores ubicados en las superficies celulares, los diferentes serotipos de AAV difieren en su capacidad para infectar y expresar el gen de interés en los órganos. Las diferencias en los receptores utilizados por los AAV tipo 2 (AAV2) y AAV tipo 5 (AAV5), explican los diferentes patrones de transducción en cerebro, pulmón y músculo (2, 4, 21, 24, 43, 69, 73, 95, 110, 131). Aunque los receptores para los AAV tipo 1 (AAV1), no se han identificado todavía, este serotipo es un buen candidato para mediar la transferencia génica en hígado, músculo y retina, en comparación con los otros serotipos (69).

2.5.1.4.1. Aplicaciones De Los Virus Vectores Adenoasociados En La Terapia De Las Mucopolisacaridosis

Investigaciones con diferentes sistemas basados en vectores AAV se han utilizado principalmente para el manejo del Síndrome de Sly (20, 18, 19, 25, 30, 86, 89). La administración de los vectores se ha realizado mediante diferentes rutas de inoculación, buscando la vía más adecuada para llegar a todos los tejidos. Los reportes describen inoculación de partículas virales recombinantes con el cADN de GUSB en ratones con MPS VII utilizando diferentes vías; intravenosa (20, 18, 25), intramuscular (20, 113), intracraneal dirigida a tálamo e hipotálamo (30, 86, 89) e intravitreal (41, 66). Se ha logrado obtener niveles terapéuticos de la enzima en las primeras semanas de edad en hígado, corazón, pulmón, bazo, riñón, cerebro, músculo y retina. En todos los trabajos reportados, la expresión de la enzima ha persistido en la mayoría de los órganos por largo tiempo, el cual varía entre 16 y 24 meses en niveles suficientes para reducir y prevenir completamente el almacenamiento lisosomal. En neuronas, microglia y meninges del SNC también se ha observado el mismo efecto (30, 86).

Se ha demostrado que en ratones inoculados intravenosamente con los AAV recombinantes, hay expresión de la enzima en SNC, evitando métodos más invasivos como la inyección intracraneal, en la cual hay solo expresión limitada a la región cercana al sitio de inoculación (20, 18, 25, 113).

Los resultados obtenidos sugieren que la transferencia génica mediada por AAV puede lograr niveles terapéuticamente relevantes de la enzima, en las etapas tempranas de la vida y el crecimiento y la diferenciación rápida de los tejidos no limita la expresión a largo plazo (20). Es por esta razón que otros grupos que trabajan en MPS I (40) y IIIB (32, 66), decidieron emplear esta clase de vectores. Los trabajos en estas dos entidades no están tan adelantados como en la MPS VII.

En la MPS I, solo se han realizado estudios “*in vitro*” con fibroblastos provenientes de pacientes, en los cuales la expresión de la enzima alcanzó niveles de 50 a 140 veces los niveles normales y se mantuvo por 6 semanas, tiempo que duro el estudio (40).

Investigaciones realizadas en el modelo murino de MPS IIIB, lograron la expresión localizada de α -N-acetilglucosaminidasa y disminución de los GAGs acumulados en cerebro, después de inyección intracraneal (16, 32). Así mismo, se ha comparado la distribución cerebral de dos vectores derivados de AAV (AAV2 y AAV5). Después de inyecciones intracraneales, la actividad de la enzima α -N-acetilglucosaminidasa fue mayor en los animales tratados con los AAV5, así mismo se evidenció una distribución más amplia con este tipo de vector que con los AAV2 (16). Aunque, en otro estudio realizado por Passini et al., vectores derivados de AAV5 produjeron una muy limitada expresión de la enzima GUS, después de inyección intraventricular en ratones neonatales. Dicha expresión se restringió a los plexos coroideos y a las células epindemales (70)

2.5.2. Vector No-Viral: Complejo ADN-Liposoma

Está basado en la asociación del ADN plasmídico a vesículas formadas por auto ensamblaje de bicapas de lípidos. Comparados con los vectores virales y con otros vectores no-virales tales como, complejos ADN-polilisina, los liposomas son vectores de baja toxicidad que inducen una escasa o nula respuesta cuando se administran in vivo, pero con baja eficiencia de transfección (111). Los primeros han sido preparados para encapsular ADN en el liposoma, mientras que los liposomas catiónicos han sido formulados como complejos ADN-liposoma, para la transferencia de genes (109, 114).

Se han descrito dos modelos de terapia génica somática no viral, los cuales están basados en células heterólogas encapsuladas y electro-transferencia génica muscular. En la primera, fibroblastos provenientes de pacientes con síndrome de Hunter se co-cultivaron con células heterólogas encapsuladas, produciendo incremento de la actividad enzimática en los fibroblastos deficientes de IDS. La electro-transferencia genica muscular, permitió expresar la enzima en células musculares, incrementando 10 veces la actividad de la enzima (98).

2.5.3. El vector Ideal

Aunque las prioridades del vector ideal pueden variar en función de la aplicación concreta, en todos los casos el vector desempeña una importante función en el éxito del proceso completo de la terapia génica, cuyas principales etapas son: destino, entrega y expresión del gen (109, 114).

En este sentido, las principales características en un vector son (68);

- ✚ Que pueda ser destinado con la mayor especificidad celular posible a un órgano o tejido.
- ✚ Que proteja al ADN de posibles degradaciones enzimáticas durante su transporte.
- ✚ Que facilite la entrega del gen terapéutico a la célula con una elevada biodisponibilidad.
- ✚ Que permita la expresión del gen con eficiencia.
- ✚ Que no sea reconocido por el sistema inmune, ni despierte respuestas inflamatorias.
- ✚ Que sea seguro para el paciente y el entorno.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Desarrollar un modelo de terapia génica utilizando un sistema de producción de virus adenoasociados libre de adenovirus para corregir la deficiencia enzimática en las mucopolisacaridosis.

3.2. Objetivos Específicos

Desarrollar un sistema construido para expresar en células de mamíferos el cADN codificante de las enzimas IDS y GALNS.

Demostrar la expresión "*in vitro*" del constructo pIRESneo₂-IDS en fibroblastos humanos deficientes de la enzima.

Construir un plásmido pAAV-GALNS que debe tener el casete de expresión pIRESneo₂-GALNS, flanqueado por secuencias repetidas (ITRs) cis activantes.

Producir partículas virales recombinantes rAAV-GALNS, mediante un sistema libre de virus ayudadores (adenovirus).

Demostrar la expresión "*in vitro*" de la GALNS en células 293 y en fibroblastos humanos deficientes de la enzima.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Cultivos bacterianos - Escherichia coli

Para la clonación y amplificación de los plásmidos, pUC13-IDS, pIRESneo₂, pIRESneo₂-IDS, se empleó la cepa E. coli DH5 α , del banco de cepas del Laboratorio de Patogénesis y Biología Molecular, de la Universidad del Valle.

Para la clonación y amplificación de los plásmidos, pIRESneo₂-GALNS, psub201, pXX2, pXX6 y pAAV-GALNS, se empleó la cepa E. coli XL10-Gold células ultracompetentes (Stratagene).

Los cultivos bacterianos se realizaron en el medio Luria Bertani (LB 0,5% de extracto de levadura, 1% triptona, 0,5% NaCl a pH 7.2 - 7.3). Se colocaron 5.0 ml del medio en tubos de 15 ml y se inocularon con el microorganismo, se incubaron por 12 horas a 37°C y agitando a 250 rpm. Para la conservación de las cepas en congelación, se tomó una alícuota del cultivo y se le agregó un volumen igual de medio suplementado con glicerol al 60%. Alícuotas de 1 ml fueron congeladas a -70°C en viales de frío-congelación.

4.2. Construcción del Sistema de Expresión en Células de Mamífero: pIRESneo₂-IDS

El cADN que codifica para la IDS humana se obtuvo por digestión con EcoRI (GIBCO) del plásmido pUC13-IDS, donado por el doctor Shunji Tomatsu del Departamento de Pediatría de la Escuela de Medicina, Universidad de St. Louis, MO, US. El pUC13-IDS tiene un tamaño aproximado de 2.7 Kb, que contiene la secuencia regulatoria y la 3' del gen de la β -galactosidasa (gen lacZ) del operón lac. El vector contiene un sitio múltiple de clonación (MSC), un origen de replicación, un sitio de transcripción-terminación (TT) y el gen de resistencia a la ampicilina (amp) (33). El pUC13-IDS se construyó insertando el cADN de la IDS (1.7 kb), en el sitio de restricción para la enzima EcoRI, el tamaño total de este constructo fue de 4.4 kb.

El fragmento correspondiente al cADN de la IDS que es de 1.7 Kb, se aisló mediante elución por electroforesis del ADN plasmídico digerido en agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% y se purificó mediante extracción del ADN con fenol - cloroformo (80). El fragmento de 1.7 Kb se insertó en el vector de expresión en células mamíferas pIRESneo₂ (CLONTECH) previa desfosforilación del vector con fosfatasa alcalina CIP (GIBCO). La ligación se realizó mediante incubación a 16°C por 16 horas, reacción catalizada por la T4 ADN ligasa (GIBCO). El esquema del vector empleado se puede observar en la figura 1.

4.3. Transformación de E. coli con los plásmidos.

4.3.1. Escherichia coli competentes

La transformación de células de E. coli competentes se hizo con CaCl_2 (80). Se inocularon 40 ml de medio LB con una colonia de E. coli y se incubó en agitación toda la noche a 37°C , con 500 μl de este cultivo se inoculó 40 ml de medio fresco y se incubó a 37°C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica (DO) entre 0.3 y 0.4 medida a 600 nm. El cultivo se colocó en hielo por 10 min, se centrifugó a 3000 rpm, por 5 min a 4°C , se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 20 ml de una solución fría de CaCl_2 50 mM, se colocó en hielo por 30 minutos, se centrifugó a 4°C , por 5 minutos a 2500 rpm. El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió de nuevo en 4 ml de CaCl_2 50 mM frío. Las bacterias resuspendidas se incubaron 24 horas a 4°C . Después de la incubación las bacterias están listas para la transformación (80).

4.3.2. Transformación de las bacterias competentes

Aproximadamente 10 ng de ADN plasmídico o 5 μl del producto de las ligaciones se agregaron a 100 μl de células E. coli competentes. La mezcla se colocó en hielo por 20 minutos, después de este tiempo se sometió a choque térmico a 42°C por dos minutos y se le adicionó 1.0 ml de medio LB, se incubó con agitación por una hora a 37°C . Se sembraron 50, 100 y 200 μl de las bacterias transformadas, en LB agar suplementado con ampicilina (amp) 100 $\mu\text{g/ml}$, como antibiótico de selección. Los cultivos se incubaron entre 12 y 16 horas a 37°C . Se seleccionaron las colonias transformadas resistentes a ampicilina y se realizaron cultivos en LB líquido suplementado con amp en una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ para hacer alícuotas de los clones obtenidos, almacenarlos según procedimiento descrito anteriormente y para realizar extracción de ADN plasmídico (80).

4.3.3. Extracción del ADN de los plásmidos

La extracción del ADN plasmídico se hizo por el método de mini preparación (17), las células E. coli transformadas se cultivaron en 1.5 ml de LB suplementado con amp a 37°C durante toda la noche con agitación. El cultivo se centrifugó a 12.000 rpm por tres minutos, el sobrenadante se removió suavemente y al precipitado se le agregaron 100 μl de solución A (Sacarosa 5mM, EDTA 10mM, Tris-HCl 25mM pH 8.0 y RNasa 10 mg/ml) y 200 μl de solución B (NaOH 0.2 N, SDS 1%), se mezcló por inversión y se incubó durante tres minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 150 μl de acetato de sodio 3 M, pH 4.8, se mezcló por inversión y se colocó en hielo por 30 minutos, pasado ese tiempo, se centrifugó por cinco minutos a 13.000

rpm y tomo el sobrenadante para adicionarle 2.5 volúmenes de etanol absoluto pre - enfriado y el ADN se precipitó por una hora a -70 °C. La solución se centrifugó por 15 minutos a 13.000 rpm, el precipitado se lavó 2 veces con etanol al 75%, centrifugando por 15 minutos a 13.000 rpm. El ADN precipitado se secó a temperatura ambiente y se disolvió en 50 µl de agua destilada. La concentración se determinó midiendo la absorbancia a 260, 280 y 320 nm en un espectrómetro Beckman DU 640. Los plásmidos obtenidos quedaron listos para analizar mediante digestión con enzimas de restricción, clonación, PCR o expresión.

4.4. Selección de clones positivos para el plásmido pIRESneo₂-IDS

Al ADN plasmídico extraído de los clones obtenidos, se le realizó análisis de restricción con EcoRI (GIBCO), para identificar los clones con el inserto. El plásmido se digirió utilizando dos unidades de enzima por cada µg de ADN plasmídico, en un volumen final de 50 µl. La mezcla se incubó durante 4 horas a 37°C. Los productos de la digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y la corrida se realizó en buffer TBE 1X (Trizma base 1M, ácido bórico 1M y EDTA 20mM). Como marcador se usó 1 Kb plus ladder (GIBCO).

La confirmación se realizó mediante amplificación por PCR, utilizando como cebadores los siguientes oligonucleótidos: IDSP1: ATGCCGCCACCC CGGACCGGCCGA, IDSP2: TTCCAACAACACTGTATGGCTTGCTC. Se realizaron 30 ciclos de amplificación con 30 segundos de denaturalización a 94°C, 1 minuto de anillamiento a 68°C, 90 segundos de extensión a 72°C. Los productos de PCR se sometieron a separación electroforética en gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 1X. Una vez se confirmó que los clones obtenidos tenían inserto el cADN de la IDS, los plásmidos recombinantes se clonaron, se amplificaron en *E. Coli* DH5α y se les asignaron números del 1 al 8 (pIRESneo₂-IDS-1, pIRESneo₂-IDS-2, etc.).

4.5. Cultivo de fibroblastos y transfección

El Laboratorio “di Diagnosi Pre-Postnatale Malattie Metaboliche” (Istituto G. Gaslini) suministró los fibroblastos de la colección “Cell lines and ADN bank from patients affected by Genetic disease”. Los fibroblastos son provenientes de un paciente con Síndrome de Hunter, nacido en 1967, procedente del sur de Italia. La línea celular ha sido caracterizada mediante análisis moleculares, encontrándose la mutación R468Q. En 1978, cuando comenzó atención médica presentaba un fenotipo severo/intermedio de la enfermedad.

Los fibroblastos se cultivaron en medio Dulbecco's D-MEM (GIBCO), suplementado con 10% de suero bovino fetal (GIBCO), glutamina 2 mM (GIBCO), HEPES 40 mM (SIGMA), penicilina 300

U/ml, estreptomina 3%, anfotericina 5 µg/ml y gentamicina 25 µg/ml. Todos los antibióticos fueron suministrados por GIBCO. Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera microaerofílica de 5% de CO₂.

La transfección de las células se realizó mediante el método de fosfato de calcio (80). Las células se sembraron 20 horas antes de la transfección y se cultivaron 3 x 10⁵ células por caja cultivo de T-25 en medio completo, 4 horas antes de la transfección, se hizo cambio de medio y se incubó a 37°C en una atmósfera microaerofílica de 5% de CO₂.

Para establecer la funcionalidad del plásmido pIRESneo₂-IDS construido, se transfectaron fibroblastos Hunter con dos clones diferentes: pIRESneo₂-IDS-1 y pIRESneo₂-IDS-2. Como control negativo se realizó transfección con pIRESneo₂. Cada transfección se hizo por duplicado.

4.5.1 Transfección mediante el método de fosfato de calcio

Para la transfección se disolvió 15 µg de ADN plasmídico en CaCl₂ 2 M y rápidamente se mezcló con buffer HBSP 2X (Na₂HPO₄ 1.5 mM, KCl 10 mM, NaCl 280 mM, glucosa 12 mM, HEPES 50 mM, pH 7). Se adicionó muy lentamente a las células y se incubó a 37°C en una atmósfera microaerofílica de 5% de CO₂. El medio se cambió 4 horas después de la transfección. Las células que expresaron el plásmido se seleccionaron pasándolas 48 horas después de la transfección a un medio selectivo, para lo cual se incubaron en medio completo suplementado con G418 0.4 mg/ml.

La transfección se realizó dos veces, la primera vez no se determinó la actividad enzimática, ya que sólo se pensaba hacer al mes, pero las células lograron sobrevivir 20 días, por eso en la segunda transfección la expresión del cADN de la IDS se estableció mediante determinación de la actividad enzimática en las células a las 48 horas, 10 días y 1 mes después de la transfección.

4.6. Determinación de la actividad enzimática de la IDS

Para poder establecer la funcionalidad y estabilidad de la enzima expresada, los fibroblastos transfectados y no transfectados (control) se lisaron mediante ciclos de congelación y descongelación en nitrógeno líquido a las 48 horas, 10 días y 1 mes después de la transfección.

El análisis se hizo en los lisados celulares, donde se encuentra la proteína libre. Para evitar el efecto inhibitorio del cloruro de sodio en la cromatografía de intercambio iónico, previa a la determinación de la actividad enzimática, los lisados celulares se sometieron a diálisis en agua destilada durante 16 horas.

La determinación de la actividad enzimática se realizó utilizando un método que emplea el sustrato radiactivo O-(ácido α -L-iduropiranosilurónico-2- sulfato)-(1-4)-2,5 anhidro-D-(3H)-Manitol-6-sulfato (Toronto Research Chemicals INC), 50 μ l del lisado celular se incubaron con 30 μ l (34.4 mM y $\sim 2.5 \cdot 10^6$ cpm/ml) del sustrato Tritoado, preparado en buffer acetato de sodio 0.2 M pH 4.5, suplementado con azida de sodio 10 mM. La mezcla se incubó por 90 minutos a 37°C. La reacción se detuvo adicionando 0.9 ml de Na_2HPO_4 1.0 mM. La mezcla de reacción se sometió a cromatografía de intercambio iónico en columna de 2.0 cm, con 1.0 ml de ecteola-celulosa (Cellex E de Merck), previamente equilibrada con agua, el tubo de reacción se lavó con 1.0 ml de agua y se adicionó a la columna. La columna se lavó cuatro veces con 1.0 ml de formato de sodio 0.07 M. Todas las fracciones se recogieron en un vial con 10 ml de líquido de centelleo CytoScint™ (ICN) y las cuentas por millón se determinaron en un contador de radiación Beta (Beckman Instruments 3.1A). Los blancos se trataron de la misma forma que las muestras, excepto que se denaturalizaron por calentamiento a 80°C.

La actividad de la IDS es directamente proporcional a la cantidad de sustrato catalizado y por ende al número de cuentas por millón de los eluidos provenientes de las columnas de ecteola. La actividad enzimática se expresa en nanomoles de sustrato catalizado en una hora/ miligramos de proteína total de la muestra. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry modificado (87).

4.7. Construcción del casete de expresión episomal pIRESneo₂-GALNS

El cADN que codifica para la GALNS se obtuvo mediante digestión con EcoRI (GIBCO) del plásmido pCXN-GALNS, siguiendo el mismo protocolo de digestión previamente descrito. El plásmido fue suministrado por el doctor Shunji Tomatsu del departamento de Pediatría, Escuela de Medicina, Saint Louis University, St Louis, MO, US. El pCXN-GALNS tiene un tamaño de 8.14 Kb. El fragmento correspondiente al cADN de la GALNS es de 1.63 Kb.

El fragmento de 1.63 Kb se insertó en el vector de expresión en células de mamífero pIRESneo₂ (CLONTECH), ver figura 1, el cual posee en el sitio de clonación múltiple una secuencia blanco para EcoRI, esta clonación se realizó mediante el mismo procedimiento que se empleó para la construcción del pIRESneo₂ – IDS.

El producto de la ligación se amplificó en la cepa de E. Coli XL10-Gold y para encontrar el vector que contiene el cADN insertado, a las colonias resistentes a ampicilina se les realizó extracción de ADN plásmido con el kit “High pure plasmid isolation” (Roche Molecular Biochemicals). El

procedimiento consiste en una lisis alcalina para liberar el ADN de la bacteria, seguida de un tratamiento con RNAsa para remover todo el RNA del lisado. En presencia de guanidina-HCl el ADN plasmídico se une selectivamente a la fibra de vidrio empacada en las columnas, el ADN se purifica mediante lavados y finalmente se realiza una elución con un buffer bajo en sales para liberar el ADN.

Al ADN plasmídico extraído de los clones obtenidos, se le practicó análisis de restricción con EcoRI para identificar los clones con el ADN inserto. La digestión con BamH I y Bgl II permitió seleccionar los clones con el inserto en la dirección correcta (Anexo 1). Todas las enzimas de restricción fueron suministradas por Promega y el protocolo de digestión se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor.

La confirmación del cADN inserto, se hizo mediante amplificación por PCR utilizando los siguientes cebadores: TOMF33R y HG2, figura 2. Se realizaron 35 ciclos de amplificación con 30 segundos de denaturalización a 95°C, 30 segundos de anillamiento a 62°C, 2 minutos de extensión a 72°C. Los productos de PCR se sometieron a separación electroforética en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X para visualizar la banda de 1.3 Kb y la confirmación se realizó digiriendo los productos con BamHI (GIBCO).

El inserto en el plásmido de expresión pIRESneo₂-GALNS se secuenció siguiendo el método descrito por Sanger (83), en un secuenciador ABI PRIMS 310 de Perkin Elmer, utilizando el kit de secuenciación Big Dye cycle sequencing (4303152 de Perkin Elmer). La reacción de amplificación se realizó utilizando los siguientes cebadores: TOMF19, TOMF21, TOMF22 y TOMF23 (ver figura 2). 100 ng del vector recombinante fueron agregados a 6 µl de la mezcla de reacción BigDye terminator (Perkin Elmer), 2 µl del buffer de dilución, 5 pmol del correspondiente primer y se completó hasta un volumen final de 20 µl. La reacción se realizó bajo las siguientes condiciones: 25 ciclos de 96°C por 30 segundos, 50°C por 15 segundos y 60°C por 4 minutos, la reacción se detuvo a 4°C.

Para la precipitación del ADN producto de la reacción, la mezcla (20 µl) se llevó a 200 µl con agua destilada, se agregaron 20 µl de acetato de sodio 3 M, pH 5.2, se precipitó con 0.5 ml de etanol absoluto y se incubó 30 minutos a -70°C. La solución se centrifugó a 13.000 rpm, 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó tres veces con etanol al 75%, centrifugando a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó, el ADN precipitado se secó a temperatura ambiente y se reconstituyó en 15 µl de reactivo de resuspensión del template (RRT: Perkin Elmer), la muestra fué denaturada por ebullición durante

cinco minutos y se colocó en el equipo de secuenciación. La secuencia fué comparada con la secuencia reportada en el Gene Bank Database.

```

1   gtggccgtcc aggccccgcc cgcagccca gccggaaggg ccggaggadg ctcgctaggt
61  eggctcgctg gccggggctc cgcggctccc gtggttgcc a tggcggcggt tgcgcggcg
121 acgaggtggt ggcagctggt gctggtgctc agcgcgcgg ggatgggggc ctcgggcgcc
181 ccgagcccc ccaacatcct gctcctgctc atggacgaca tgggatgggg tgacctcggg
241 gtgtatggag agccctccag agagaccccg aatttgacc ggatggctgc agaagggctg
301 cttttcccaa acttctattc tgccaacct ctgtgctcgc catcgagggc ggcactgctc
361 acaggacggc taccatccg caatggcttc tacaccacca acgcccattg cagaaacgcc
421 tacacaccgc aggagattgt gggcggcatc ccagactcgg agcagctcct gccggagctt
481 ctgaagaagg ccggctacgt cagcaagatt gtcggaagt ggcactctggg tcacaggccc
541 cagttccacc cctgaagca cggattgat gagtggtttg gatccccaa ctgccacttt
601 ggacattatg acaacaaggc caggccaac atccctgtgt acagggactg ggagatggtt
661 ggagatatt atgaagaatt tcctattaat ctgaagacgg ggaagccaa cctcaccag
721 atctacctgc aggaagccct ggacttcatt aagagacagg cacggacca ccccttttc
781 ctctactggg ctgtcgacgc cagcagcga cccgtctatg cctccaaacc cttctgggg
841 accagtcagc gagggcggta tggagacgcc gtccgggaga ttgatgacag cattgggaag
901 atactggagc tcctccaaga cctgcacgtc gcgacaaca ccttcgtctt cttcacgctg
961 gacaacggcg ctgccctcat ttccgcccc gaacaagggt gcagcaacgg cccctttctg
1021 tgtgggaagc agaccacggt tgaaggaggg atgaggagc ctgccctcgc atggtggcca
1081 gggcacgtca ctgcaggcca ggtgagccac cagctgggca gcatcatgga cctcttcacc
1141 accagcctgg cccttgccgg cctgacgccc cccagcgaca gggccattga tggcctcaac
1201 ctcttccccca ccctcctgca gggccggctg atggacaggc ctatcttcta ttaccgtggc
1261 gacacgctga tggcggccac cctcgggcag cacaaggctc acttctggac ctggaccaac
1321 tcctgggaga acttcagaca gggcattgat ttctgcctg ggcagaacgt ttcaggggtc
1381 acaactcaca atctggaaga ccacacgaag ctgcccctga tcttccacct gggacgggac
1441 ccaggggaga ggttccccct cagctttgcc agcgcgagt accaggaggg cctcagcagg
1501 atcacctcgg tegtccagca gcaccaggag gccttggctc ccgcgagcc ccagctcaac
1561 gtgtgcaact gggcggctcat gaactgggca cctccgggct gtgaaaagt agggaagtgt
1621 ctgacacctc cagaatccat tccaagaag tgccctcgtt cccactagca cctgcgcaga
1681 ctcaggccag gcctagaatc tccggttggc cctgcaagt cctggaggaa ... 2390

```

FIGURA 2. Secuencia parcial del cADN de la GALNS: Se puede observar la secuencia del cADN empleado, la cual comienza en el sitio (cta) señalado con la flecha verde y termina en el sitio (tag – codon de parada) señalado con la flecha roja. El codon de inicio (atg) se muestra en letras azules. La ubicación de los cebadores para amplificar y secuenciar la región codificante de GALNS, está simbolizada por regiones resaltadas en un color específico para cada cebador. Las flechas lila representan la dirección de adición de nucleótidos. Convenciones asignadas:



4.8. Construcción del vector derivado de AAV

El sistema empleado en este trabajo permite la producción de partículas virales infecciosas de AAV recombinantes sin utilizar virus ayudadores. En este sistema los productos génicos adenovirales requeridos para la producción de partículas infecciosas de AAV son suplementados en el plásmido ayudador. El modelo comprende la co-transfección en células "blanco" permisibles de los 3 plásmidos: 1.) Plásmido vector que debe contener el cADN de la enzima de interés (GALNS) dentro del casete de expresión flanqueado por los ITRs del AAV-2. 2.) Plásmido de empaquetamiento y 3.) Plásmido ayudador. Los vectores psub201, pXX2 y pXX6 se obtuvieron a través de un convenio de transferencia de plásmidos AAV, entre la Pontificia Universidad Javeriana y Universidad de Carolina del Norte (126). Los plásmidos fueron donados por los doctores Jude Samulski y Xiaohuai Zhou.

4.8.1. Plásmido vector pSub 201: Descrito por Samulski y colaboradores (81) (Figura 3). Este vector es ideal para clonación, ya que fue desarrollado de tal forma que mediante digestión con XbaI se permite la remoción de la región codificante del AAV mientras se mantienen intactos los ITRs en el plásmido. Esto es muy importante en la producción de virus recombinantes ya que los ITRs son secuencias que actúan solamente en cis (126)

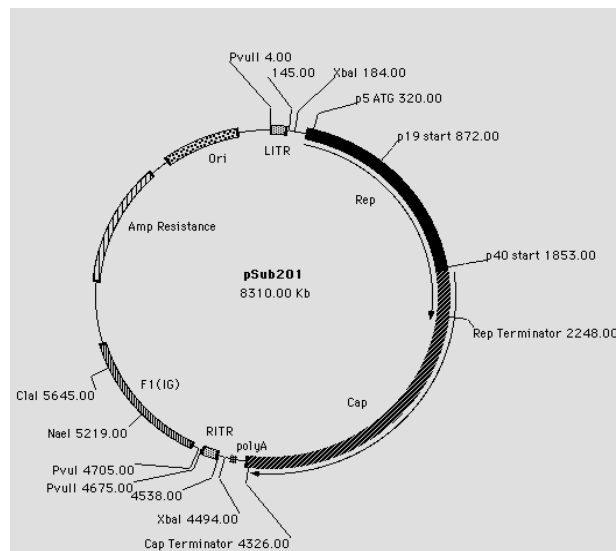


FIGURA 3. Esquema circular del pSub201: Este vector contiene todas las regiones codificantes del virus Adenoasociado (AAV-2) tipo 2 nativo y las secuencias repetidas (ITRs) cis activantes. (126).

4.8.2. Plásmido vector pXX2: Sirve como vector trans-complementario en la producción de AAV recombinantes (Figura 4A). Este vector tiene las regiones codificantes Rep y Cap. Es el vector de empaquetamiento y esta clonado en el vector pBR322 (126).

4.8.3. Plásmido vector pXX6: Los AAV necesitan para replicarse la presencia de los productos del genoma del virus ayudador: E1a, E1b, E2a, E4 y RNA del VA del genoma del adenovirus (Figura 4B). Estas secuencias se suministran en el pXX6 (126).

4.8.4. Construcción de pAAV-GALNS

El vector derivado de AAV contiene el cADN de GALNS inserto en el casete de expresión episomal pIRESneo₂, cuya eficiencia “*in vitro*” se evaluó previamente expresando la IDS. El plásmido vector AAV recombinante se construyó reemplazando los genes Rep y Cap presentes en el pSub201 por el casete de expresión pIRESneo₂-GALNS (Figura 5).

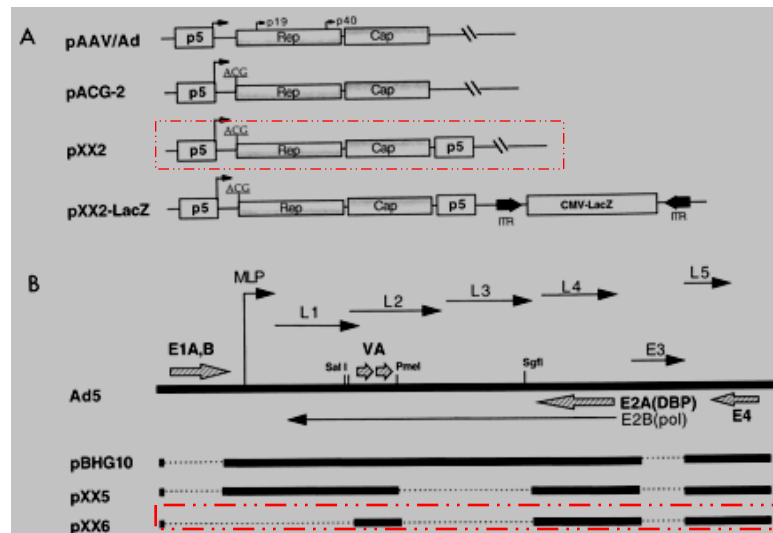


FIGURA 4. Esquema lineal de los plásmidos de empaquetamiento y ayudadores. A. Se muestran diferentes plásmidos de empaquetamiento contruidos para la producción de partículas virales de AAV, resaltándose el plásmido empleado en este trabajo pXX2. Todos tiene en la secuencia el promotor endógeno p5 y los genes Rep y Cap. El plásmido pXX2 utiliza el codón de inicio ACG para la síntesis de proteínas Rep y una copia extra del promotor p5 ubicada después del gen Cap. **B.** Plásmidos ayudadores derivados de adenovirus. Las líneas sólidas representan las de ADN del adenovirus tipo 5. Las líneas punteadas son las secuencias de ADN del adenovirus que fueron delecionadas en los constructos. Las flechas representan los genes tempranos (E) y tardíos (L). L1 – L5 representan los transcritos del los genes tardíos bajo regulación del principal promotor tardío (MLP). Los plásmidos pBHG10, pXX5 y pXX6 se construyeron conservando las regiones esenciales para la replicación de los AAV y eliminando las regiones codificantes de proteínas inmunogénicas (126).

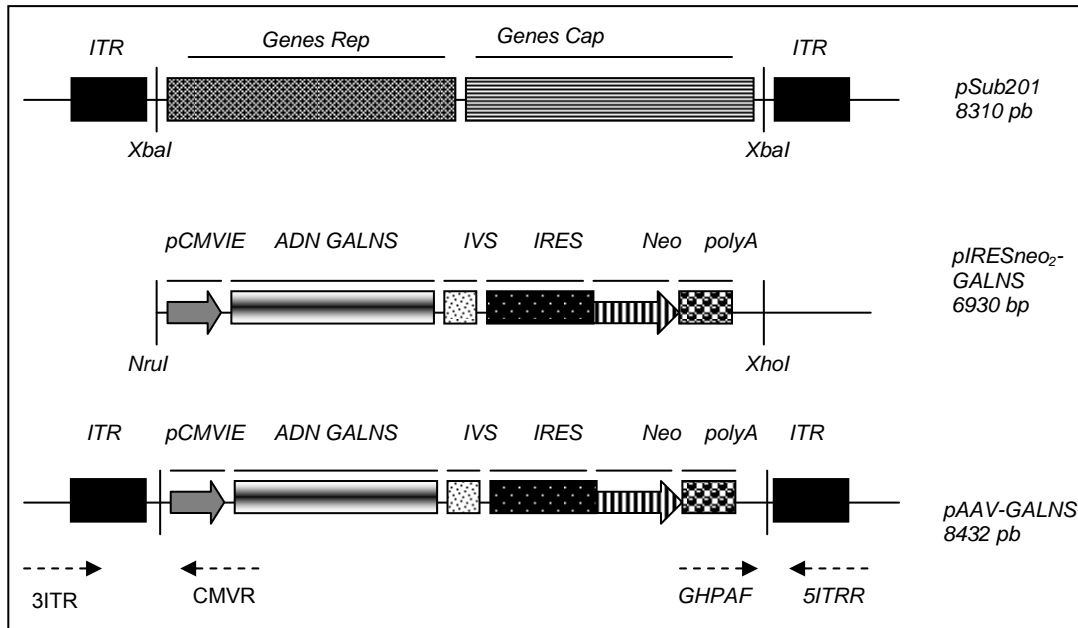


Figura 5. Esquema de construcción del plásmido pAAV-GALNS: El pAAV-GALNS se construyó a partir del pSub201 reemplazando las secuencias Rep y Cap por el casete de expresión del pIRESneo₂-GALNS.

El pSub201 tiene 2 sitios de restricción para la enzima XbaI y permite mantener intactos los ITRs en posición cis para reemplazar los genes Rep y Cap por el inserto de interés, al hacer la digestión se generan dos fragmentos de 4306 y 3999 bp. La separación de los 2 fragmentos mediante electroforesis es difícil por la similitud de tamaños, por lo cual se realizó una doble digestión con XbaI y XhoI (Promega), las dos enzimas trabajan con el mismo buffer y bajo las mismas condiciones. Así, se conserva intacto el fragmento de 3.9 kb que contiene los ITRs y la enzima XhoI digiere el fragmento de 4306 bp en las posiciones 2233 y 2419, generándose 3 fragmentos con las siguientes longitudes: 2072, 2048 y 186 pb (Figura 6).

El fragmento de 3.9 Kb se purificó utilizando el kit QIAEX II – QIAGEN, de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El casete de expresión se obtuvo haciendo doble digestión con la endonucleasa de restricción XhoI y NruI (GIBCO), generándose un fragmento de 4.533 kb (figuras 6 y 7). Como XhoI genera extremos cohesivos, NruI extremos romos y la enzima con que se digiere el vector (XbaI) es diferente a estas dos y produce extremos cohesivos, se rellenaron los extremos

cohesivos utilizando los nucleótidos complementarios y catalizando la reacción con la polimerasa klenow (Promega).

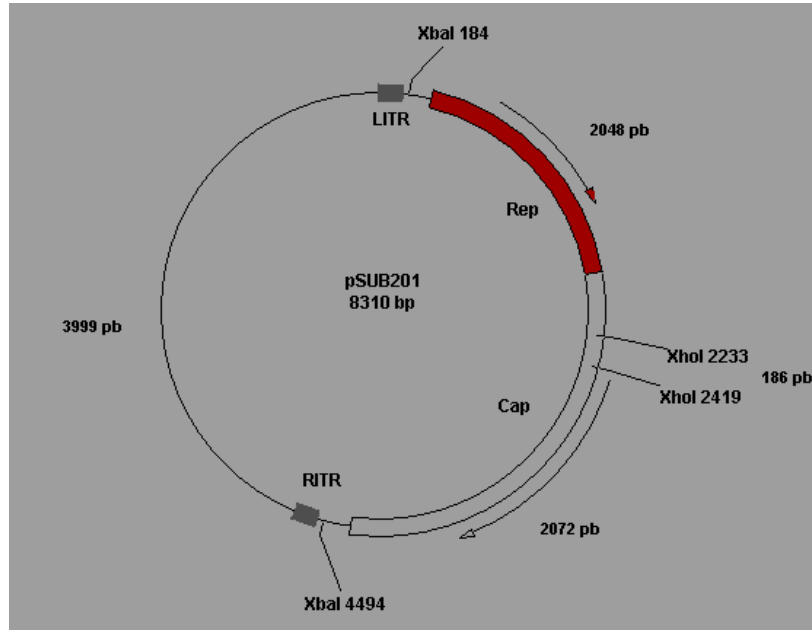


FIGURA 6. Esquema circular del pSub201. En el gráfico se muestran los sitios de restricción reconocidos por las enzimas XbaI y XhoI en el plásmido pSub201 y el tamaño de los fragmentos generados.

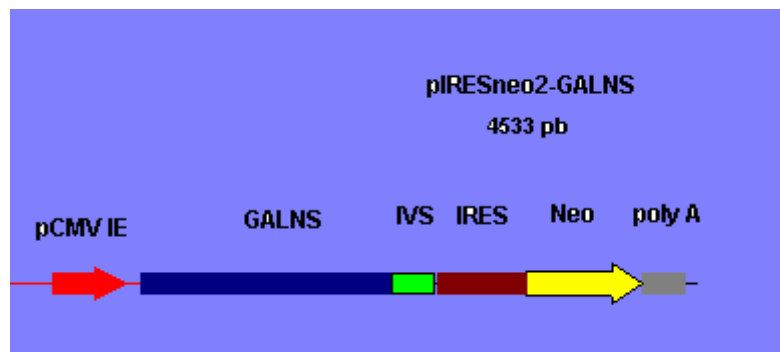


FIGURA 7. Casete de expresión pIRESneo₂-GALNS: En la figura se muestra el casete de expresión de la GALNS dirigida por el promotor pCMVIE.

La reacción se realizó así: 100 µl del plásmido digerido con XhoI (pIRESneo₂-GALNS) o XbaI (pSub201), previa inactivación de la enzima a 65°C por 30 minutos, se rellenó con 10 µl de dNTPs 1.25 mM, 2 µl de polimerasa klenow, 10 µl del buffer de dilución 10X en un volumen final de 200 µl y la mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 10 minutos. La polimerasa klenow y los nucleótidos se removieron utilizando el kit de Roche "High pure PCR products purification kit".

El pIRESneo₂-GALNS digerido con XhoI y con extremos romos (después de rellenar los extremos cohesivos), se digirió con NruI. El fragmento de 4533 pb se obtuvo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y la banda de interés se purificó con el kit "QIAEX II" - QIAGEN. Los 2 fragmentos: vector y casete de expresión, se ligaron mediante la acción de la ADN ligasa de T4 (Fisher) a 16°C durante 16 horas. Con el producto de la ligación se transformó la cepa de E. Coli XL10-Gold células ultracompetentes (Stratagene), según protocolo descrito anteriormente. Para encontrar el vector con el inserto, las colonias resistentes a amp se sometieron a extracción de ADN plasmídico con el kit "High pure plasmid isolation" (Roche Molecular Biochemicals) siguiendo las indicaciones del fabricante.

La confirmación de los plásmidos AAV recombinantes con el inserto se realizó mediante digestión con EcoRI (Promega) y la direccionalidad del inserto se comprobó realizando análisis de restricción con: Nde I y Nae I (Anexos 2 y 3). Todas las enzimas fueron suministradas por Promega y el protocolo de digestión se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor.

Para confirmar la presencia del cADN codificante de GALNS mediante PCR se utilizaron los siguientes cebadores: TOMF33R y HG2 (figura 2). La amplificación se realizó como se describió para la confirmación del pIRESneo₂-GALNS. Los productos de PCR se separaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X para visualizar la banda de 1.3 Kb y los productos del PCR se digirieron con BamHI (Promega). El casete de expresión inserto en el pSUB201 se secuenció siguiendo el método descrito para la secuenciación parcial del pIRESneo₂-GALNS (83). La reacción de amplificación se realizó utilizando los siguientes cebadores: CMVR, GHPAF, 3'ITRF y 5'ITRR. Los cebadores se diseñaron exclusivamente para secuenciar parcialmente el pAAV-GALNS (Figura 8), estos cebadores permiten secuenciar las regiones cercanas a los sitios de ligación, confirmar la direccionalidad del inserto y la integridad de los ITRs.

CMVR: ACG TCA ATG GAA AGT CCC TA
GHPAF: AGC CTC GAC TGT GCC TTC TA
3'ITRF: CGC CTT TGA GTG AGC TGA TA
5'ITRR: CGC TCA TGG AAA TAC CTA CA

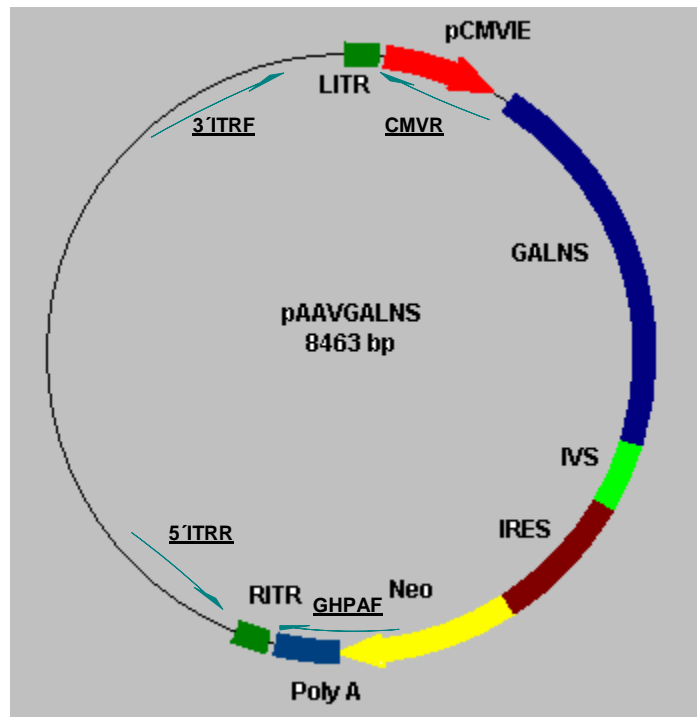


FIGURA 8. Esquema circular del plásmido pAAV-GALNS: La gráfica muestra el esquema circular del plásmido pAAV-GALNS construido. Las flechas señalan las regiones de reconocimiento de los primers (nombres subrayados) y la dirección en la que se realiza la amplificación para la posterior secuenciación. El producto de la amplificación permite analizar las secuencias del plásmido cercanas a la región de la ligación, confirmar la direccionalidad del inserto y la integridad de los ITRs.

4.9. Producción de partículas virales AAV recombinantes (rAAV-GALNS)

Las partículas virales se producen co-transfectando las células 293 con los 3 plásmidos descritos anteriormente: 1.) Recombinante pAAV-GALNS, 2.) Ayudador pXX6 y 3.) Empaquetamiento pXX6.

La línea 293 (ATCC CRL1573), es una línea celular permanente de riñón embrionario humano transformadas con ADN del adenovirus tipo 5 (Ad5) humano. Aunque algunos reportes sugieren que las células contienen ADN del Ad5 procedente tanto del extremo terminal derecho, como del izquierdo, ahora es claro que sólo están presentes las secuencias del extremo terminal izquierdo. Las células de morfología epitelial, se obtuvieron de "American Type Culture Collection". Las células son altamente permisibles para el ADN del adenovirus. Deben ser manejadas como un material con riesgo biológico bajo las condiciones mínimas de bioseguridad nivel 2. La línea celular se ha empleado en el aislamiento de Ad 5 mutantes con defectuosa transformación, son excelentes para la titulación de adenovirus humanos.

Los cultivos se realizaron utilizando como medio de crecimiento: medio esencial mínimo Eagle's MEM (GIBCO), suplementado con penicilina-estreptomicina (GIBCO) 100 U/ml, glutamina (GIBCO) 2 mM, aminoácidos no esenciales (GIBCO) 0.1 mM, HEPES (GIBCO), suero bovino fetal (GIBCO) 10%, en una atmósfera al 5% de CO₂ a 37°C.

4.9.1 Preparación de las células 293 para la co-transfección con los plásmidos pAAV-GALNS recombinantes, pXX2 y pXX6

Las células 293 se sembraron 48 horas antes de la transfección en cajas cultivo de 10 cm a una densidad de 1X10⁶ con 10 ml de medio MEM de crecimiento, preparación previamente descrita, pero libre de antibióticos.

Aunque hay una gran variedad de protocolos para transfección que pueden aplicarse a estos vectores y los cuales son más económicos, la transfección se realizó empleando liposomas catiónicos suministrados por Invitrogen bajo el nombre de Lipofectamine 2000, garantizando una eficiencia alta de transfección.

El protocolo se efectuó combinando las instrucciones del proveedor y del método descrito por Xiao y colaboradores (126). Entre 1 y 2 horas antes de la transfección se cambió el medio de cultivo a las células 293 con 15 ml de medio de crecimiento MEM, libre de antibióticos y suero bovino fetal. Para la transfección con lipofectamine 2000 se requiere un total de 25 µg de ADN plasmídico para cada caja de cultivo 10 cm. Los plásmidos pAAV-GALNS, pXX2, pXX6 se mezclaron en relación 5:5:15 respectivamente en términos de microgramos de ADN para cada caja de 10 cm de diámetro, lo cual corresponde a una relación molar de 1:1:1. Los ADNs plasmídicos utilizados para la transfección se purificaron mediante el kit QUIAEX-Maxi-prep QIAGEN, acorde con las instrucciones del proveedor.

Las transfecciones se realizaron con 3 diferentes clones de pAAV-GALNS construidos, los cuales contenían el ADN inserto en la orientación adecuada y conservaban los ITRs intactos. Para facilitar la identificación, a cada plásmido se le asignó una numeración específica: pAAV-GALNS 4, pAAV-GALNS 24, pAAV-GALNS 39 (Tabla 5).

Para controlar la co-transfección y la producción de partículas virales de AAV nativos, se realizó una co-transfección con los 3 plásmidos originales, suministrados por el doctor Samulski: pSUB201, pXX2 y pXX6 (Tabla 5)

El ADN plasmídico (25 µg) se diluyó en 1.25 ml de medio de cultivo libre de suero Opti-MEM®I (Invitrogen) y se mezcló suavemente. En otro tubo se diluyeron 60 µl de lipofectamine 2000 con

1.5 ml de Opti-MEM®. La mezcla se agitó suavemente y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Pasado este tiempo se combinó el lipofectamine 2000 diluído con el ADN diluído y la mezcla se incubó 20 minutos a temperatura ambiente, para permitir que los liposomas formen complejos con el ADN.

Tabla 5. Co-transfecciones realizadas en células 293 para la producción de AAV nativos y AAV recombinantes.

Transfección	Plásmido vector	Plásmido de empaquetamiento	Plásmido ayudador
1 (Control)	pSUB201	pXX2	pXX6
2	pAAV-GALNS 4	pXX2	pXX6
3	pAAV-GALNS 24	pXX2	pXX6
4	pAAV-GALNS 39	pXX2	pXX6

Los complejos formados son estables hasta por 6 horas a temperatura ambiente. Pasados lo 20 minutos de incubación la solución ADN -Lipofectamine 2000 se adicionó a los cultivos de células 293. Se mezcló suavemente por rotación para permitir que los complejos se distribuyeran uniformemente en la caja de cultivo de 10 cm. Las células transfectadas se incubaron en una atmósfera del 5% de CO₂ a 37°C. 12 horas post-transfección el medio se reemplazó con medio de crecimiento MEM fresco y se continuó con la incubación en las mismas condiciones descritas. La producción de partículas virales en los cultivos, se pudo monitorear observando los cambios fenotípicos del cultivo celular. El cambio de color del medio de naranja a amarillo en poco tiempo, es el signo de infección viral más fácil de apreciar.

Como las partículas virales están presentes tanto en las células como en el medio de cultivo, para obtener un mayor número de virus, las preparaciones virales "stock" se hicieron combinando las células en suspensión con el medio de crecimiento. 48 horas después de la transfección las células junto con medio de cultivo se transfirieron a tubos cónicos de 15 ml y las suspensiones se sometieron a ciclos de congelación y descongelación, alternando los tubos entre un baño de hielo seco con etanol y un baño serológico a 37°C, mezclando con vortéx después de cada ciclo.

Después de la realización de los ciclos de congelación y descogelación, la suspensión se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante representó la solución viral primaria y las partículas vírales se almacenaron a -80°C en alícuotas para la posterior titulación de los virus y las infecciones. Bajo éstas condiciones las suspensiones virales son estables por un año.

4.10. Titulación de partículas vírales de AAV

La titulación de los virus se realizó con el kit de Progen – Biotechnik "AAV titration ELISA: Enzyme immunoassay for the quantitative determination of AAV particles in cell culture supernatants and purified virus preparations". El ensayo se basa en una técnica de ELISA tipo sándwich, en la cual el anticuerpo monoclonal A20 reconoce un epítoto conformacional ubicado sobre las cápsides de los AAV, se encuentra fijo en tiras de pozos con fondo plano. Este método permite capturar específicamente cápsides de AAV-2, pero no se une a proteínas de cápsides aisladas (37).

Las partículas virales capturadas se detectaron en dos pasos. Primero, la biotina conjugada al anticuerpo monoclonal A20 se unió al complejo inmune. En el segundo paso, el conjugado estreptoavidina – peroxidasa reaccionó con las moléculas de biotina. La adición del sustrato produjo una reacción coloreada, la cual fue directamente proporcional a las partículas vírales fijadas. La absorbancia se midió espectrofotométricamente en un lector de micro Elisa a 450 nm (37). Como control se empleó una preparación de partículas de AAV suministrada en el kit y que a su vez permitió la realización de una curva de calibración (1.4×10^9 , 7×10^8 y 3.5×10^8 cápsides por ml) para cuantificar las partículas virales presentes en las suspensiones primarias. La ELISA se realizó con las soluciones virales primarias sin diluir y con diluciones de 1:10 y 1:40.

4.11. Infección de las células con los rAAV-GALNS

Para evaluar la funcionalidad de las partículas virales rAAV-GALNS, se infectaron células 293 y fibroblastos de piel provenientes de un paciente con síndrome de Morquio A (MO19). Las células se obtuvieron del banco de células del departamento de bioquímica y biología molecular de la universidad de St. Louis, MO. USA. Las células fueron mantenidas en el mismo medio de crecimiento utilizado para los cultivos de las células 293, el cual se describió previamente y se incubaron a 37°C en una atmósfera microaerofílica de 5% de CO₂.

Las células se sembraron 3 días antes de la infección, en cajas cultivo de 6 pozos a una densidad de 1.5×10^5 por pozo en 5 ml de medio MEM de crecimiento, la preparación del cual se describió previamente, pero libre de antibióticos. La incubación se realizó durante 48 horas a 37°C, en una atmósfera al 5% de CO₂, con chequeo de las células utilizando el microscopio de luz invertido a las 24 horas. Para continuar el procedimiento las células deben alcanzar aproximadamente el 70% de confluencia.

El medio permisible para AAV se preparó utilizando el medio de crecimiento MEM sin antibióticos, suplementado con hidroxurea (HU) 240 mM (Sigma-Aldrich) y butirato de sodio 6 mM (Sigma-Aldrich). Una vez alcanzada la confluencia requerida se adicionó 1 ml del medio permisible para AAV a cada pozo, sin remover el medio colocado anteriormente. Se mezcló por rotación suave y los cultivos se incubaron por 5 horas en una atmósfera al 5% de CO₂ a 37°C. Pasado este tiempo el medio se aspiró y las células se lavaron una vez con medio de crecimiento MEM sin antibióticos y cambiando la concentración del suero bovino fetal del 10 al 2% (76).

Para infección de las células permisibles, a cada pozo se adicionó 0.5 ml de las soluciones virales: rAAV-GALNS 4, rAAV-GALNS 24 y AAV-2 nativo utilizado como control. Los cultivos se incubaron a 37°C por un tiempo de 2 horas y las cajas de cultivo se agitaron mediante rotación suave cada 30 minutos. Transcurridas las 2 horas, a cada pozo se adicionó 0.5 ml de medio de crecimiento MEM suplementado con suero bovino fetal al 18%, para el control negativo de infección las células se incubaron con 1 ml del mismo medio sin previa adición de partículas virales y se continuó la incubación por 24 y 48 horas.

4.12. Determinación de la actividad enzimática de la GALNS

Para poder establecer la funcionalidad y estabilidad de la enzima expresada, las células infectadas y no infectadas (control) se sometieron a ciclos de congelación y descongelación en nitrógeno líquido a las 24 y 48 horas después de la infección.

El análisis se hizo en los lisados celulares, donde se encuentra la proteína libre. La determinación de la actividad enzimática se hizo utilizando un método que emplea el sustrato fluorogénico 4-Methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside-6-sulphate sodium (Research Products International Corporation). 2 μ l de los lisados celulares o de agua para el blanco de reacción, se incubaron con 18 μ l de sustrato de concentración 22 mM (preparado en buffer acetato de sodio 0.1 M y NaCl 0.1 M, pH 4.3), a la mezcla de reacción se le colocó 2 μ l de albúmina sérica bovina (6 mg/ml) y se llevó a volumen final de 30 μ l con agua destilada. Después de incubar las muestras durante 16 horas a 37°C, se adicionaron 2 μ l de una solución de β -galactosidasa purificada de *Aspergillus oryzae* (Sigma) de 10 mg/ml, preparada en el mismo buffer que se utilizó para la disolución del sustrato. La mezcla se incubó por 30 minutos adicionales a 37°C. La reacción se detuvo con 1.9 ml de buffer de glicina 0.5 M, pH 10.5 y se analizó en un fluorómetro (Jasco, Tokio, Japón, mod FP777; λ_{ex} 366, λ_{em} 450 a 25°C). Una unidad de actividad enzimática corresponde a la liberación de 1 nmol de 4-metilumbeliferona por minuto.

La actividad enzimática de la GALNS es directamente proporcional a la cantidad de sustrato catalizado y por ende a la fluorescencia emitida. La actividad enzimática se expresa en

nanomoles de sustrato catalizado en una hora por miligramos de proteína total de la muestra. La concentración de proteína se determinó con el método de Bradford (Pierce, Rockford, IL), empleando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

5. RESULTADOS

El principal objetivo de este estudio, fue establecer un modelo de terapia génica utilizando como vehículo de transferencia del material genético un vector derivado de AAV, el cual puede aplicarse para corregir la deficiencia enzimática en cualquiera de las MPS actualmente descritas y en las cuales el cADN codificante de la enzima, comparta características similares a las de los cADN utilizados en este trabajo: IDS y GALNS.

Para lograr la expresión de una enzima lisosomal es necesario que el cADN codificante este haciendo parte de un sistema complejo, que tenga en la secuencia elementos mínimos como promotor, intrón, entre otros, que aseguren la expresión de dicha enzima en las células de interés, en este caso células de mamífero. Por esta razón, para construir el vector AAV recombinante, primero, se hizo necesario insertar el cADN de las enzimas IDS y GALNS en el plásmido de expresión en células de mamíferos pIRESneo₂ obtenido comercialmente y que ha demostrado eficiencia en la de expresión de niveles altos de proteínas recombinantes (15).

5.1. Construcción del vector de expresión episomal pIRESneo₂-IDS

Se construyó el vector pIRESneo₂-IDS (figura 9), para generar un sistema de expresión que permita lograr la corrección *in vitro* de la deficiencia de IDS en los fibroblastos provenientes de un paciente con el síndrome de Hunter. El fragmento de cADN codificante para la IDS de 1.7 Kb obtenido mediante digestión del pUC13IDS con EcoRI (figura 10), se ligó e insertó dentro del sitio EcoRI del vector pIRESneo₂ y la secuencia del cADN de la IDS se ubicó bajo el control del pCMVIE. El casete de expresión comprende el pCMVIE, seguido por el cADN de la IDS, un intrón sintético para mejorar la estabilidad del mensaje, el sitio IRES de entrada al ribosoma y el cADN de la neomicina transferasa para seleccionar las células de mamíferos que expresan la información transferida.

Para la selección de los clones recombinantes, el ADN plasmídico producto de la ligación y clonación en *E. coli* DH5 α , se digirió con la enzima de restricción EcoRI. Se lograron obtener y aislar 8 clones diferentes resistentes a ampicilina, los cuales contenían el cADN de la IDS y recibieron un código con números consecutivos del 1 al 8, así: pIRESneo₂-IDS1, pIRESneo₂-IDS2-8 (figura 11).

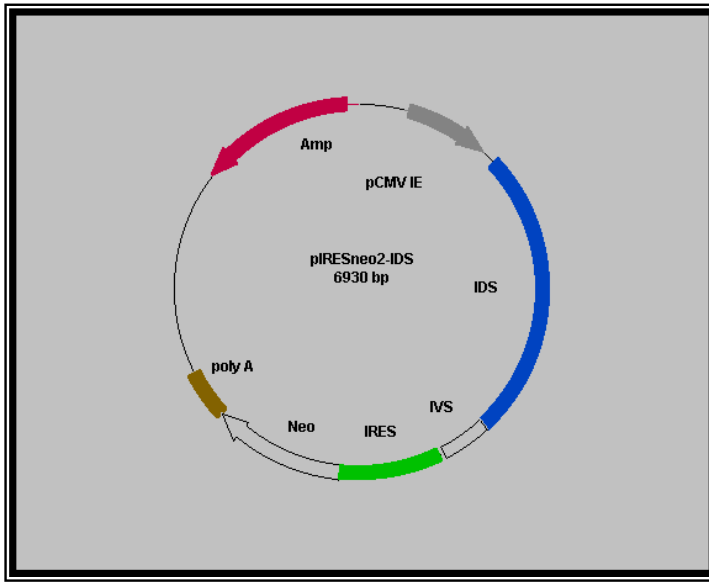


Figura 9. Esquema circular del pIRESneo₂-IDS: Plásmido de expresión en células de mamífero construido. La región comprendida entre el promotor temprano intermedio del citomegalovirus (pCMVIE) y la señal del poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (poly A), corresponde al casete de expresión. IVS: Intrón sintético, IRES: Sitio de entrada al ribosoma, Neo: cADN de la neomicina transfererasa.

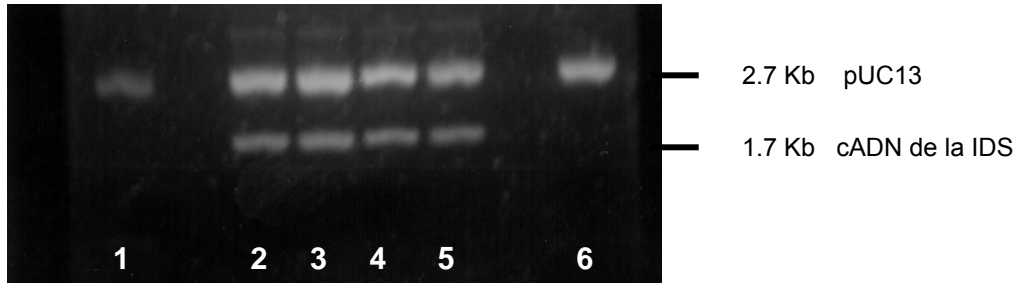


Figura 10: Patrón de restricción en EcoRI del pUC13-IDS: En la foto se observa la electroforésis realizada en gel de agarosa al 1.5% del plásmido pUC13-IDS digerido con EcoRI. Los carriles 1 y 6 corresponde a la separación electroforética del control negativo que es el pUC13 digerido con EcoRI, evidenciándose una banda de 2.7 Kb. En los carriles 2, 3, 4 y 5 se muestran digestiones del vector pUC13-IDS con la misma enzima, obteniéndose 2 bandas: una de 2.7 Kb correspondiente al vector pUC13 y otra de 1.7 Kb correspondiente al cADN de la IDS.



Figura 11: Selección de los clones recombinantes pIRESneo₂-IDS mediante digestión con EcoRI. En la foto se muestra una electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos de la digestión con EcoRI del ADN plasmídico obtenido de las células *E. Coli* DH5 α transformadas con pIRESneo₂-IDS. Carril 1: Marcador de peso molecular λ hindIII (Gibco-BRL). Carril 2: pUC13-IDS digerido con EcoRI. Carril 3: pIRESneo₂. Carriles 6-14: ADN plásmido digerido con EcoRI, ninguno de esos clones tenía el cADN de la IDS insertado. Carriles 4, 5 y 15: ADN plasmídico digerido con EcoRI, se observan dos bandas una de 5.3 Kb correspondiente al tamaño del pIRESneo₂ y otra banda de 1.7 Kb correspondiente al cADN de la IDS.

La presencia del cADN de la IDS en el plásmido pIRESneo₂, se confirmó mediante amplificación por PCR del ADN plasmídico extraído de las colonias de *E. coli* DH5 α resistentes a amp y los productos de amplificación se visualizaron en un gel de electroforesis en gel de agarosa 1.5% (figura 12), los productos de amplificación con un tamaño de 1.3 kb representaron los clones positivos confirmados.

5.2. Expresión "in vitro" del pIRESneo₂-IDS en fibroblastos deficientes de la enzima

Fibroblastos de piel provenientes de un paciente con síndrome de Hunter, con deficiencia parcial de la enzima se transfectaron con los clones 1 y 2 del plásmido pIRESneo₂-IDS y la selección de las células que recibieron el plásmido de expresión se realizó mediante incubación de las mismas en G418. Las células transfectadas sobrevivieron en estas condiciones durante un mes indicando que el vector se transfirió efectivamente (Figuras 13a, 13b, 13c, 13d). Como se observa en la figura 14, cuando se determinó la actividad enzimática utilizando el sustrato artificial específico de la enzima, las células transfectadas con los plásmidos recombinantes lograron incrementar la actividad intracelular de la IDS.

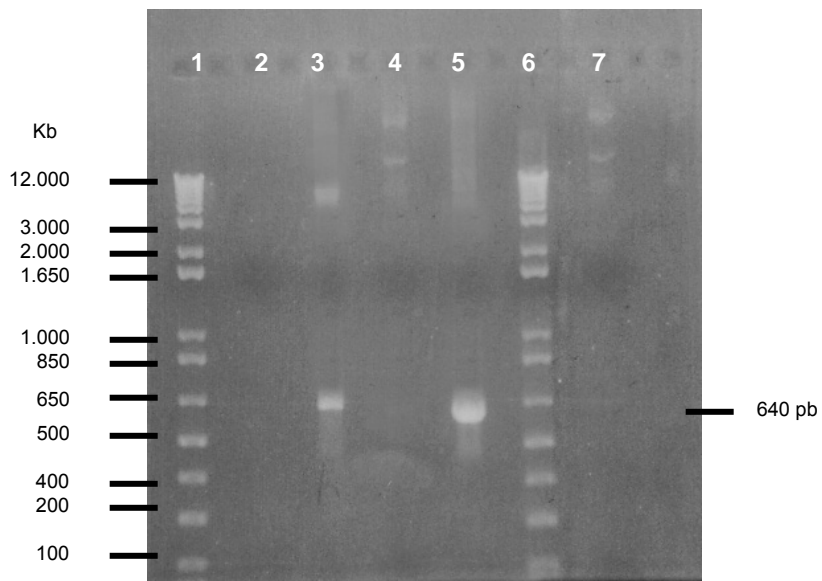


Figura 12. PCR del ADN plasmídico pIRESneo₂ y pIRESneo₂-IDS. En la foto se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación (PCR) del pUC13-IDS, pIRESneo₂ y pIRESneo₂-IDS. La amplificación de un fragmento de 640 pb, confirma que el plásmido obtenido pIRESneo₂-IDS contiene el cADN de la IDS. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb plus ADN (GIBCO). Carril 2: Blanco de PCR. Carril 3: pUC13-IDS. Carril 4: pIRESneo₂. Carril 5: pIRESneo₂-IDS. Carril 6: Marcador de peso molecular 1 Kb plus ADN (GIBCO). Carril 7: pIRESneo₂.



Figura 13. Fibroblastos provenientes de un paciente con síndrome de Hunter. A. Se observan las células Hunter formando monocapa antes de las transfección. **B.** Células Hunter 4 horas post-transfección. **C.** Células Hunter 48 horas post-transfección. **D.** Células Hunter 15 días post-transfección.

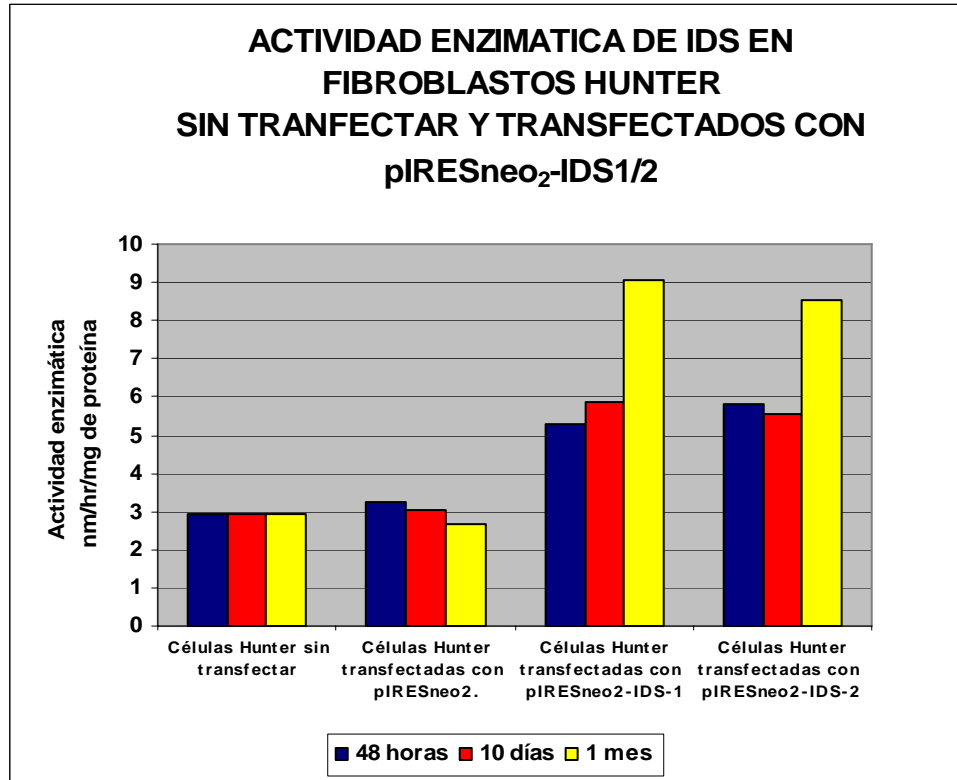


Figura 14. Expresión *in vitro* de la IDS mediada por el construido pIRESneo₂-IDS en fibroblastos deficientes de la enzima. En la figura se observa la actividad de IDS en los fibroblastos Hunter transfectados con pIRESneo₂-IDS1-2 y no transfectados. Para establecer la expresión a largo plazo las células Hunter transfectadas y no transfectadas se cosecharon a las 48 horas, 10 días y un mes post-transfección para realizar la determinación de la actividad enzimática de la IDS. Los valores de actividad enzimática se expresan en nmol de sustrato clivado en una hora por mg de proteína.

Las células transfectadas expresaron de 2 a 3 veces más actividad enzimática que las células no transfectadas o transfectadas con el plásmido control pIRESneo₂ (tabla 6). La expresión enzimática se mantuvo durante un mes.

Tabla 6. Actividad enzimática intracelular de IDS en fibroblastos después de la transfección con pIRESneo₂-IDS.

LISADOS CELULARES	Actividad Enzimática de la IDS en nm/hora/mg de proteína		
	48 horas	10 días	1 mes
Células Hunter sin transfectar	2.93	N.R	N.R
Células Hunter transfectadas con pIRESneo ₂ .	3.24	3.29	3.10
	N.R	2.80	2.26
Células Hunter transfectadas con pIRESneo ₂ -IDS-1	6.10	6.12	6.79
	4.52	5.59	8.88
	N.R	N.R	11.5
Células Hunter transfectadas con pIRESneo ₂ -IDS-2	5.39	5.54	7.67
	6.27	N.R	9.45
Leucocitos (control del ensayo enzimático)	16.9		

En la tabla se muestran los datos obtenidos al realizar la determinación de la actividad enzimática de la IDS en lisados celulares de fibroblastos Hunter sin transfectar, fibroblastos Hunter transfectados con pIRESneo₂ (control negativo), fibroblastos Hunter transfectados con dos diferentes clones de pIRESneo₂-IDS (1/2). Cada transfección se realizó por duplicado, por eso se muestran dos valores diferentes. Para poder establecer la estabilidad de la enzima se determino la actividad de IDS a diferentes tiempos post-transfección: 48 horas, 10 días y 1 mes. Como control del método se determinó la enzima en lisado celular de leucocitos de una persona normal. Los valores promedio normales de IDS en suero, fibroblastos y leucocitos es de 0.61, 16.63 y 18.75 nmol/mg de proteína/hora respectivamente (99). N.R: No se realizó.

5.3. Generación del vector de expresión pIRESneo₂-GALNS

El Instituto de Errores Innatos del Metabolismo pretende desarrollar terapias alternativas para algunas enfermedades lisosomales, como son las MPS. Es así como, la mayor parte de los esfuerzos se están destinando a proyectos tendientes a establecer tecnología de terapia de reemplazo enzimático y terapia génica, que sea aplicable a corregir la deficiencia enzimática de cualquiera de la mucopolisacaridosis. Por esta razón, una vez comprobada la funcionalidad del sistema de expresión en células de mamíferos y siguiendo la metodología empleada para la construcción del pIRESneo₂-IDS, se generó el pIRESneo₂-GALNS.

El cADN que codifica para la GALNS con un tamaño de 1.63 Kb, se obtuvo por digestión del pCXN-GALNS con Eco RI (figura 15) y se clonó en el sitio EcoRI del pIRESneo₂. Se generó un plásmido de 6.930 Kb (figura 16).

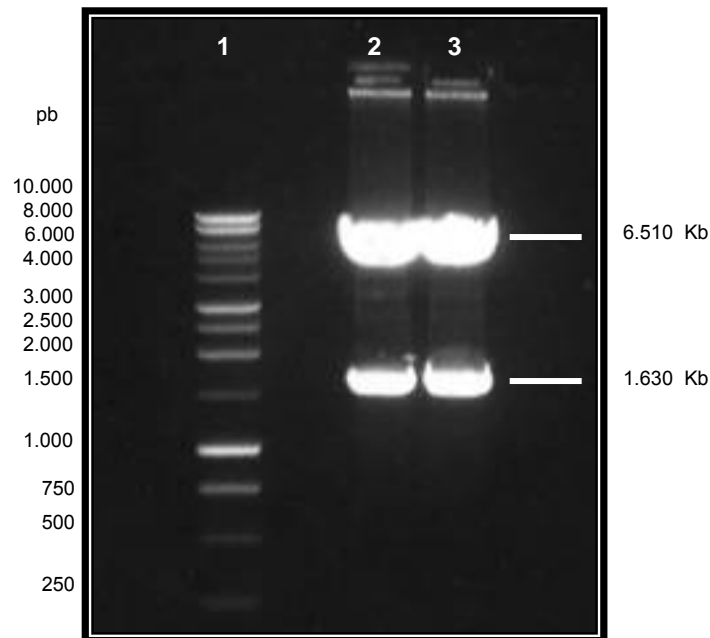


Figura 15. pCXN-GALNS digerido con EcoRI: En la foto se observa una electroforésis en gel de agarosa al 1.0% del plásmido pCXN-GALNS digerido con EcoRI. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular 1 Kb DNA (Promega). En los carriles 2 y 3 se muestran digestiones del vector pCXN-GALNS con EcoRI, obteniéndose 2 bandas: una de 6.51 Kb correspondiente al vector pCXN y otra de 1.63 Kb correspondiente al cADN de la GALNS.

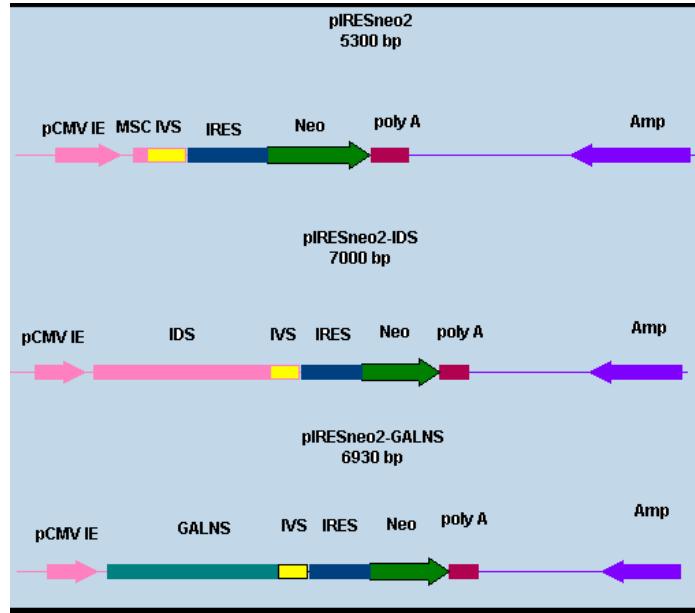


Figura 16. Esquema lineal de los plásmidos pIRESneo₂, pIRESneo₂-IDS, pIRESneo₂-GALNS. Representación comparativa de los plásmidos de expresión construidos, resaltándose los pesos moleculares de cada uno. Los plásmidos construidos, servirán como casetes de expresión y dependiendo de las necesidades podrán digerirse con enzimas de restricción e insertarse en un vector derivado de virus para mediar una transferencia génica.

5.4. Confirmación de la integridad y direccionalidad del cADN inserto en el pIRESneo₂-GALNS

La inserción del cADN de la GALNS se confirmó mediante análisis de restricción con EcoRI del ADN plasmídico extraído de las colonias de *E. coli* XL10-Gold resistentes a amp. La direccionalidad del insertó se logró evidenciar digiriendo el plásmido obtenido con BamH I y Bgl II y la integridad se demostró secuenciando parcialmente el plásmido.

5.4.1. Análisis de restricción del pIRESneo₂-GALNS

La digestión con EcoRI permitió identificar los clones con el ADN inserto, de está forma los clones que mostraron un patrón de restricción con dos bandas: una de 5.3 Kb (pIRESneo₂) y otra de 1.63 Kb (cADN de la GALNS), se establecieron como clones positivos (figura 17). Se logró obtener un clon recombinante con el cADN de la GALNS.

Para determinar la direccionalidad del cADN clonado, el ADN plasmídico se digirió con BamH I y Bgl II. Estas enzimas se escogieron por que el patrón de digestión permitía diferenciar claramente el vector con el cADN insertado en la dirección correcta del que se había insertado erróneamente.

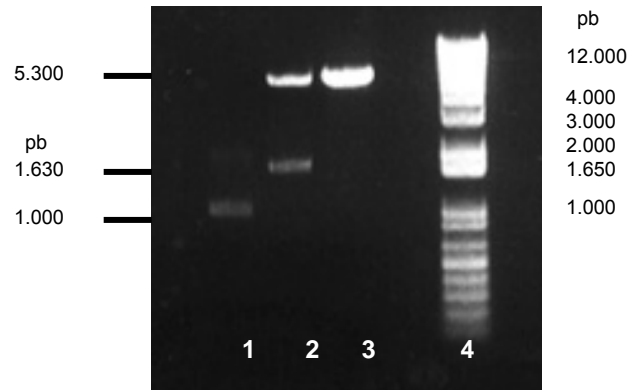


Figura 17: Selección de clones recombinantes pIRESneo₂-GALNS por digestión con EcoRI. En la foto se muestra una electroforesis en gel de agarosa 1.2% de los productos de la digestión con EcoRI del ADN plasmídico obtenido de las células E. coli XL10-Gold transformadas con pIRESneo₂-GALNS. Carril 1: ADN plásmido digerido con EcoRI, el plasmido aislado no posee el cADN de la GALNS, ya que el fragmento que se visualiza es menor a 1000 pb. Carril 2: ADN plasmídico digerido con EcoRI, se observan dos bandas una de 5.3 Kb correspondiente al tamaño del pIRESneo₂ y otra banda de 1.63 Kb correspondiente al cADN de la GALNS. Carril 3: pIRESneo₂ digerido con EcoRI. Carril 4: Marcador de peso molecular 1 Kb plus ADN (GIBCO).

Cuando el pIRESneo₂-GALNS tenía el inserto orientado en el sentido adecuado, la digestión con BamH I generó dos bandas: una de 5831 pb y la otra de 1169 pb. Cuando el cADN no se había insertado correctamente el patrón esperado eran dos bandas; una de 6457 y la otra de 543 pb (figura 18). La digestión de los vectores recombinantes con Bgl II generó un patrón electroforético en el que se podían visualizar 3 bandas (4088, 1637 y 1275 pb) cuando el cADN de la GALNS se orientó en sentido correcto. Los patrones que tenían 3 bandas de 4089, 1985 y 926 pb, representaban los plásmidos que tenían el inserto en sentido equivocado (figura 18).

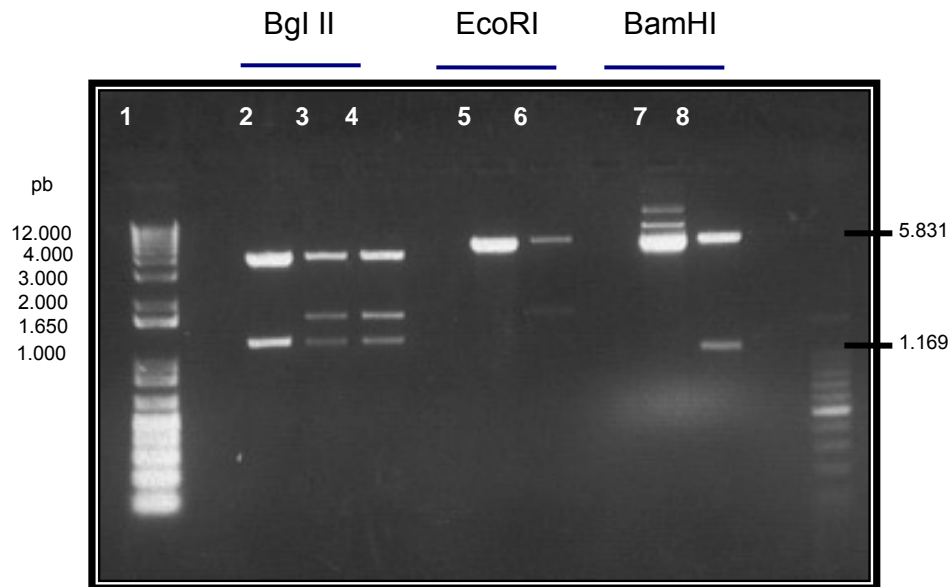


Figura 18: Confirmación de la direccionalidad del cADN de la GALNS inserto, mediante análisis de restricción. En la foto se muestra una electroforésis en gel de agarosa 1.2% de los productos de la digestión con BamHI y Bgl II del ADN plasmídico obtenido de las células E. coli XL10-Gold transformadas con pIRESneo₂-GALNS. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb plus ADN (GIBCO). En los carriles 2 – 4, se observa las separaciones electroforéticas de diferentes clones de pIRESneo₂-GALNS digeridos con Bgl II. El pIRESneo₂-GALNS con el inserto en la orientación correcta debe generar 3 bandas de los siguientes pesos moleculares: 4088, 1637 1275. Carril 2: pIRESneo₂, sólo se observan dos bandas de aproximadamente 4000 pb y otra 1275 pero no se visualiza la de 1637. Carriles 3 y 4: ADN plásmido digerido con Bgl II, se observan las tres bandas y los pesos moleculares corresponden a los esperados para el vector con el inserto en dirección correcta. En los carriles 5 y 6 se muestra la separación electroforética del pIRESneo₂ (5) y El pIRESneo₂-GALNS (6) digerido con EcoRI. Carriles 7 y 8: ADN plásmidico digerido con BamHI. El pIRESneo₂-GALNS con el inserto orientado correctamente debe producir 2 bandas: una de 5831 y la otra de 1169 pb. Carril 7: pIRESneo₂ al digerirse con BamHI se genera una banda de 5300 pb. Carril 8: pIRESneo₂-GALNS digerido, se pueden observar las dos bandas de 5831 y 1169 pb, demostrándose un vez más que el clon obtenido tenía el cADN de la GALNS insertado adecuadamente.

5.4.2. Secuenciación del pIRESneo₂-GALNS

Al realizar los análisis descritos previamente, sólo un clon demostró tener las características para ser el plásmido de expresión pIRESneo₂-GALNS. Para confirmar la integridad y correcta orientación del ADN, el plásmido se secuenció parcialmente, empleado 4 cebadores diferentes. Se demostró un 100% de homología entre las secuencias obtenidas y la secuencia del cADN de la GALNS reportada en GenBank.

5.5. Generación de pAAV-GALNS

Para mediar la transferencia génica de la secuencia codificante de la GALNS, se desarrolló el constructo pAAV-GALNS, en el cual los genes Rep y Cap del pSub201 se removieron y reemplazaron por el cADN de la enzima bajo dirigido por el pCMVIE, localizados dentro el casete de expresión pIRESneo₂-GALNS de 4533 pb. Los ITRs fueron las únicas secuencias virales que se mantuvieron en el constructo.

De los 91 clones obtenidos después de la ligación y de la clonación en *E. coli* XL10-Gold, sólo 3 de ellos (pAAV-GALNS 4, pAAV-GALNS 24 y pAAV-GALNS 39) tenían el tamaño esperado para el plásmido construido de 8.432 Kb y contenían en la secuencia el casete de expresión pIRESneo₂-GALNS orientado correctamente. Lo anterior se pudo demostrar mediante análisis de restricción con *EcoRI*, *Nde I* y *Nae I*. La digestión con *EcoRI* seleccionó los 20 clones que tenían inserto el cADN de la GALNS (figura 19). A esos 20 clones se les realizó análisis de restricción por separado con *Nde I* y *Nae I* para chequear la direccionalidad del inserto y establecer los 3 plásmidos pAAV-GALNS que se emplearon para hacer la co-transfección en las células 293 y por ende para la producción de las partículas virales recombinantes.

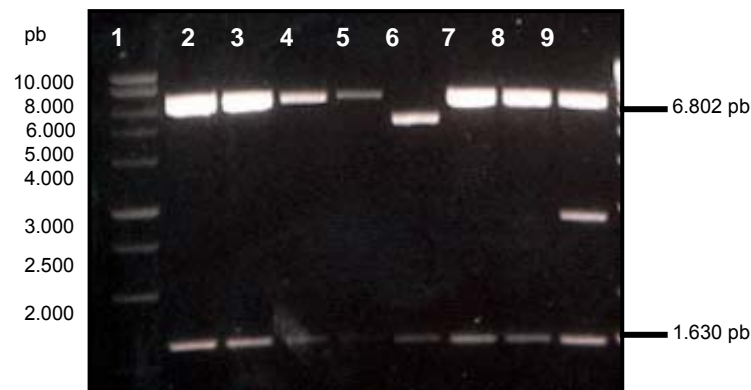


Figura 19. Selección de los plásmidos pAAV-GALNS recombinantes mediante restricción con *EcoRI*. Los únicos sitios de reconocimiento de la *EcoRI*, en el plásmido generado son los que flanquean el cADN de la GALNS, ya que el fragmento de 1.63 kb se obtuvo por digestión del pCXN-GALNS con *EcoRI*. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular 1 Kb DNA (Promega). En los carriles 2-5, 7 y 8 muestran digestiones del vector pAAV-GALNS con *EcoRI*, obteniéndose 2 bandas: una de 6.802 Kb correspondiente al vector plásmido y otra de 1.63 Kb correspondiente al cADN de la GALNS. Aunque en los carriles 6 y 9 se observa el fragmento de 1.63 Kb, los otros fragmentos no tienen la longitud esperada para el patrón de restricción del pAAV-GALNS digerido con *EcoRI*. Gel de agarosa al 1.2%.

El patrón de restricción esperado para la digestión del pAAV-GALNS orientado correctamente con Nde I, es de tres fragmentos con longitudes de 461, 2695 y 5307 pb, este patrón electroforético se puede diferenciar fácilmente del que se origina cuando el casete de expresión se encuentra insertado en posición invertida (figura 20). Con el mismo objetivo, los 20 clones pAAV-GALNS se digirieron con Nae I. Acorde a lo esperado para el plásmido con el casete de expresión insertado correctamente, los plásmidos pAAV-GALNS 4, pAAV-GALNS 24 y pAAV-GALNS 39 digeridos, mostraron un patrón electroforético de 4 bandas con longitudes de 733, 1186, 2059 y 4485 pb. Este patrón se podía diferenciar del esperado para los plásmidos que no tenían el inserto en sentido correcto, en los cuales se observaron 4 bandas con tamaños de 733, 1943, 2059 y 3728 pb (figura 21).

5.5.1. Secuenciación parcial del pAAV-GALNS

Como para la replicación y empaquetamiento de los AAV se hace necesario que las secuencias terminales invertidas se encuentren intactas y ubicadas en posición cis con respecto al gen que se desea expresar, el plásmido construido se secuenció parcialmente con primers diseñados exclusivamente para analizar las regiones cercanas a los sitios de ligación. La comparación de las secuencias obtenidas con la secuencia de los ITRs reportadas (51, 81), confirmó la integridad de los ITRs.



Figura 20. Análisis de restricción del pAAV-GALNS con NdeI. La digestión del plásmido pAAV-GALNS se realizó con NdeI para confirmar la direccionalidad del casete de expresión episomal insertado. Sólo 3 clones (pAAV-GALNS 4, pAAV-GALNS 24 y pAAV-GALNS 39) mostraron el patrón de restricción esperado para el constructo con el inserto orientado correctamente, el cual consiste en 3 bandas con longitudes de 461, 2695 y 5307 pb. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA (promega). Carriles 2 y 5: pAAV-GALNS 39 y pAAV-GALNS 24 respectivamente, digeridos con NdeI, se pueden observar las tres bandas correspondientes a los tamaños esperados para el inserto orientado en sentido. En los carriles 3, 4, 6 – 9, se muestra la separación electroforética del ADN plasmídico digerido, como se puede observar ninguno de ellos sigue el patrón esperado para el constructo pAAV-GALNS ideal. Gel de agarosa al 1.2%.

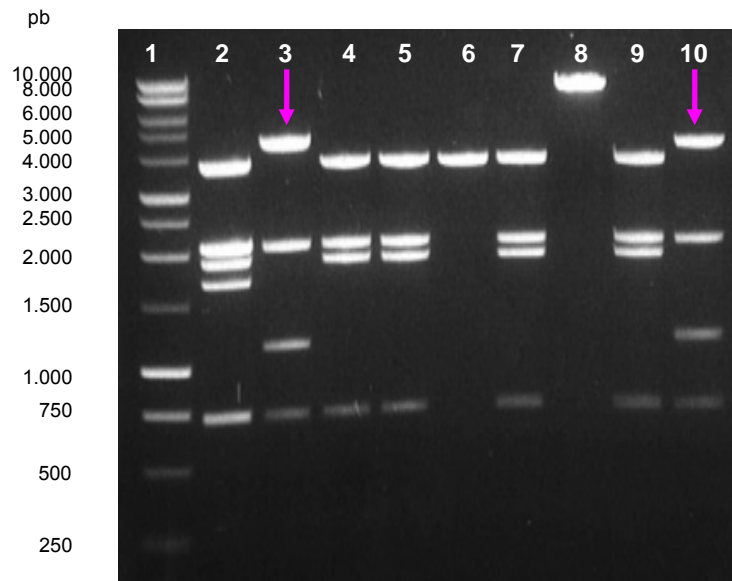


Figura 21. Análisis de restricción del pAAV-GALNS con NaeI. La digestión del plásmido pAAV-GALNS se realizó con NaeI para confirmar la direccionalidad del casete de expresión episomal insertado. Los datos obtenidos con esta digestión, arrojaron los mismos resultados que cuando se realizó el análisis de restricción con NdeI, confirmando a los plásmidos pAAV-GALNS 4, pAAV-GALNS 24 y pAAV-GALNS 39, como los recombinantes con el casete de expresión orientado adecuadamente. El patrón de restricción esperado para el constructo con el inserto orientado correctamente, consiste en 4 bandas con longitudes de 733, 1186, 2059 y 4485 pb. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA (promega). En la figura es posible observar se que los plásmidos pAAV-GALNS 4 y pAAV-GALNS 39 digeridos con NaeI, carriles 3 y 10 respectivamente, mostraron el patrón esperado. En los carriles restantes, se muestra la separación electroforética del ADN plasmídico digerido, ninguno de los plásmidos analizados siguen el patrón correspondiente al constructo pAAV-GALNS requerido para la expresión de la enzima. Gel de agarosa al 1.2%.

5.5.2. Amplificación por PCR del pIRESneo₂-GALNS, pAAV-GALNS y análisis de restricción de los productos de PCR.

El PCR se realizó con los cebadores HG2 y TOMF33R. En la figura 22 se pueden visualizar los productos de amplificación de los plásmidos construidos en este trabajo: pIRESneo₂-GALNS y pAAV-GALNS. En los clones que se logró amplificar una banda de 1.3 Kb, se confirmó la presencia del cADN de la GALNS en el vector. Después del PCR, los productos de amplificación de 1.3 Kb se digirieron con BamHI, en los casos en los que el fragmento correspondía al cADN de la GALNS se obtuvieron 2 bandas de 876 y 481 pb (figura 23).

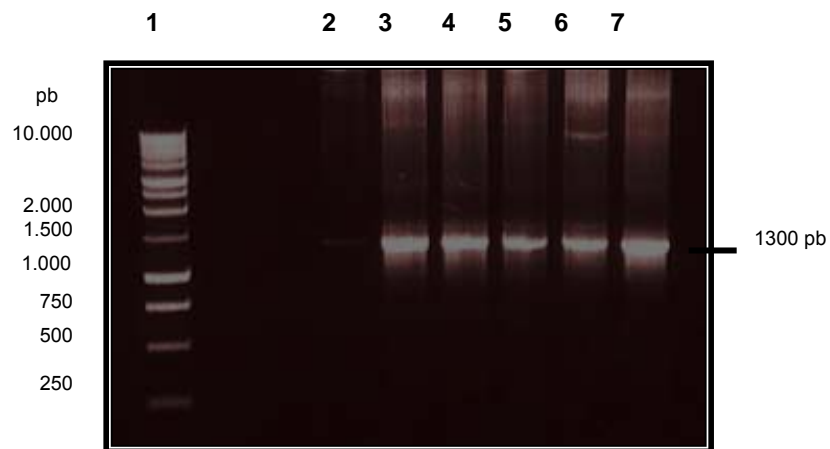


Figura 22. PCR del ADN plásmidico pIRESneo₂-GALNS y pAAV-GALNS. En la foto se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los productos de PCR del pIRESneo₂-GALNS y pAAV-GALNS. La amplificación de un fragmento de 1300 pb, confirma que el plásmido obtenido contiene el cADN de la GALNS. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb ADN (Promega). Carril 2: Control de PCR pSub201. Carril 3: pAAV-GALNS 4. Carril 4: pAAV-GALNS 24. Carril 5: pAAV-GALNS 39. Carril 6: pIRESneo₂-GALNS. Carril 7: pCXN-GALNS.

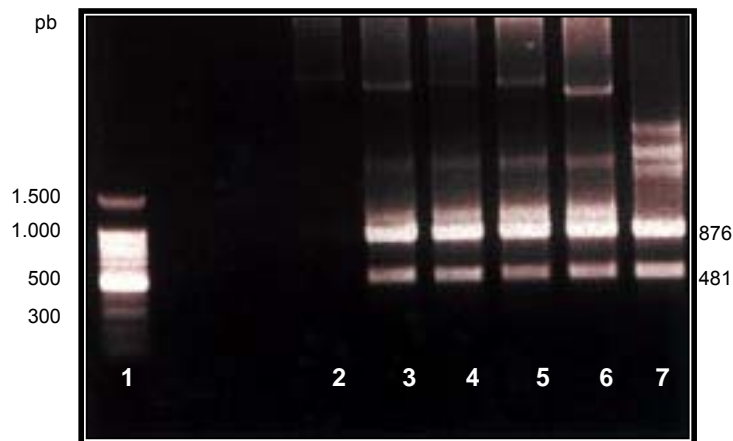


Figura 23. Confirmación del PCR realizado a pIRESneo₂-GALNS y pAAV-GALNS mediante digestión con BamHI. Cuando se visualizaron los productos del PCR en el gel de agarosa, en el control del PCR con pSub201 se pudo observar la amplificación de una banda de longitud similar a la esperada. Para confirmar el PCR, los productos de amplificación se sometieron a digestión con BamHI, el fragmento del cADN de la GALNS amplificado tiene un sitio de restricción que reconoce esa enzima y produce 2 bandas de 876 y 481 pb. Solamente los amplificados correspondientes al cADN de la GALNS generaran las dos bandas. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega). Carril 2: Control pSub201. Carril 3: pAAV-GALNS 4. Carril 4: pAAV-GALNS 24. Carril 5: pAAV-GALNS 39. Carril 6: pIRESneo₂-GALNS. Carril 7: pCXN-GALNS. Gel de agarosa al 1%.

5.6. Producción de partículas vírales de AAV recombinantes

La producción de los rAAV-GALNS se realizó co-transfectado las células 293 con el pAAV-GALNS (plásmido vector), el pXX2 (plásmido de empaquetamiento) y el pXX6 (plásmido ayudador), en una relación de 5:5:15 respectivamente, en términos de μg de ADN por cada caja de cultivo de 10 cms. Se produjeron AVV recombinantes para los 3 clones construidos en este trabajo (pAAV-GALNS 4, pAAV-GALNS 24, y pAAV-GALNS 39) y para controlar el procedimiento se realizó una transfección empleado el psub201 como plásmido vector. Según reportes de Xiao y colaboradores (126), el tiempo optimo para obtener el mayor número de partículas vírales es 48 horas después de la co-transfección, por esa razón, las partículas vírales se cosecharon a las 48 horas post-transfección y la titulación se hizo mediante un ELISA, que utiliza el anticuerpo monoclonal A20 (37). En la figura 24 se puede observar el número de partículas vírales recombinantes con cápside producidas. La estrategia de transfección utilizada resultó en la producción alta de partículas recombinantes libres de adenovirus, con títulos más altos que los reportados en la literatura (126). Cuando se realizó la transfección con el psub201 como

plásmido vector, los títulos virales obtenidos en este trabajo fueron de $4,7 \times 10^{11}$ cápsides/ml, comparado con el número de partículas producidas por Xiao ($< 1,1 \times 10^{10}$ cap/ml) (126).

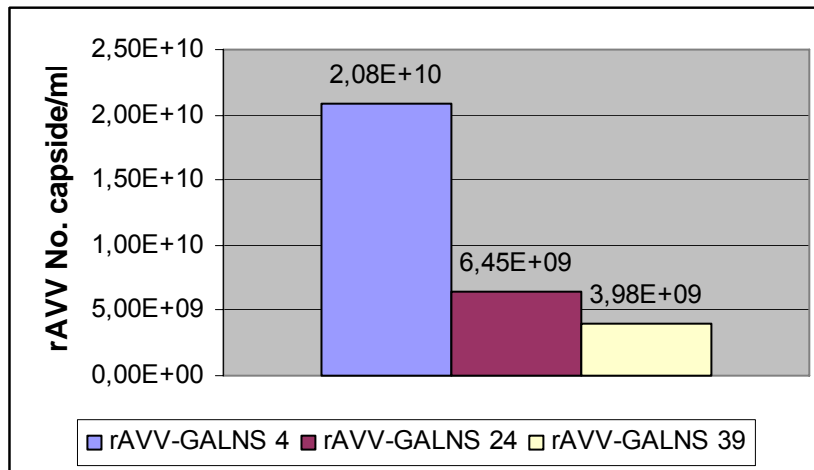


Figura 24. Partículas virales recombinantes rAAV-GALNS producidas a las 48 horas post-transfección. En la figura muestra el número de cápsides por ml de rAAV-GALNS, producidas a las 48 horas después de la co-transfección de las células 293 con: los 3 pAAV-GALNS construidos (plásmido vector), el pXX2 (plásmido de empaquetamiento) y el pXX6 (plásmido ayudador). La titulación se realizó en diluciones seriadas de las suspensiones virales mediante una prueba de ELISA que emplea el anticuerpo monoclonal A20. El número de partículas virales se determinó comparando las absorbancias con las obtenidas en una curva de calibración realizada con una suspensión viral suministrada en el kit. Cuando se realizó la transfección con el pSub201 como plásmido vector, los títulos virales obtenidos fueron de $4,7 \times 10^{11}$ capsides/ml (barra no mostrada).

5.7. Expresión "in vitro" de los vectores rAAV-GALNS generados en células 293 y en fibroblastos Morquio A.

Las células 293 y los fibroblastos provenientes de dos pacientes con síndrome de Morquio A se infectaron con aproximadamente 1×10^{10} partículas de rAAV-GALNS y la determinación enzimática se estableció a las 24 y 48 horas después de la infección. La eficiencia del sistema de transferencia del material genético empleado se demostró mediante el incremento de la actividad enzimática de la GALNS en las células 293 y los fibroblastos Morquio A infectados con los rAAV-GALNS (figuras 25 y 26), haciéndose evidente que el cADN de la GALNS produjo una proteína funcionalmente activa.

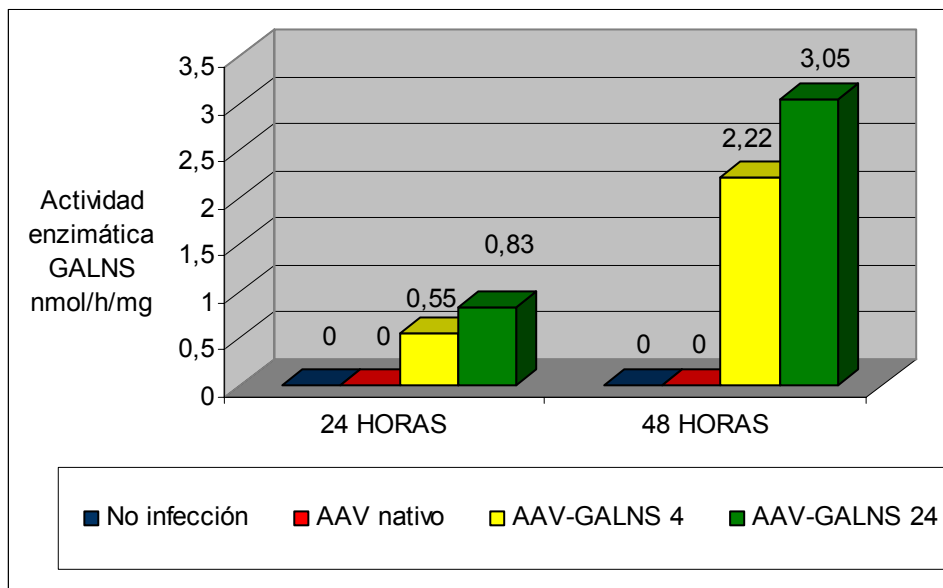


Figura 25. Expresión "in vitro" de los rAAV-GALNS en células 293. En la figura se observa la actividad de GALNS en células 293 infectadas con rAAV-GALNS 4, rAAV-GALNS 24, AAV nativos y no infectadas. Para establecer la expresión las células se cosecharon a las 24 y 48 horas y se realizó la determinación de la actividad enzimática de la GALNS. Los valores de actividad enzimática se expresan en nmol de sustrato clivado por hora por mg de proteína.

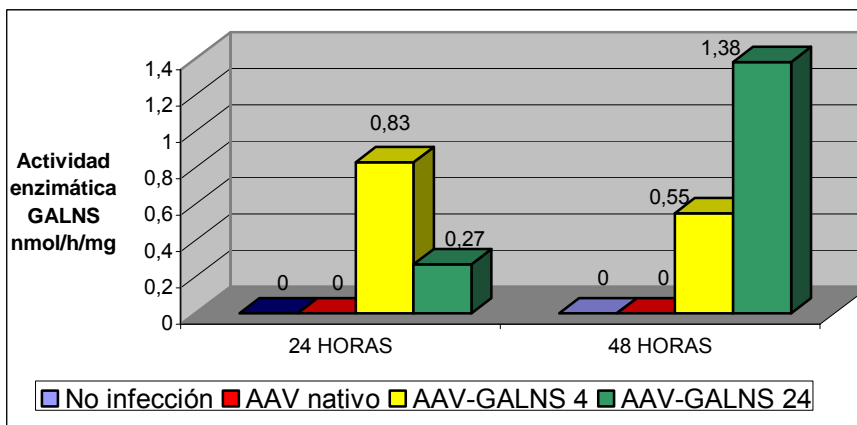


Figura 26. Expresión "in vitro" de los rAAV-GALNS en fibroblastos con deficiencia en la actividad enzimática de GALNS. En la figura se observa la actividad de GALNS en los fibroblastos Morquio A infectados con rAAV-GALNS 4, rAAV-GALNS 24, AAV nativos y no infectados. La expresión se estableció a corto plazo determinando la actividad de la enzima en las células Morquio A infectadas y no infectadas a las 24 y 48 horas después de la infección. Los valores de actividad enzimática se expresan en nmol de sustrato clivado por hora por mg de proteína.

6. DISCUSIÓN

El establecimiento de una terapia exitosa para muchas de las MPS requiere de procedimientos capaces de cambiar el curso de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Una alternativa para el tratamiento de enfermedades lisosomales, podría ser la entrega de un elemento recombinante de expresión episomal para expresar trascientemente una enzima y corregir la deficiencia enzimática en un tejido específico.

El pIRESneo₂ es un vector comercial, que tiene el IRES del virus del encéfalo miocarditis, el cual permite la traducción de dos marcos de lectura de un RNA mensajero. Después de la selección con G418, todas las colonias sobrevivientes, expresan el gen de interés y además disminuye la necesidad de tamizar grandes números de colonias para encontrar clones funcionales.

Para seleccionar las células que expresan altos niveles del gen de interés, la presión selectiva por resistencia a antibióticos se incrementa en este vector, ubicando el codón de iniciación del gen de la neomicina fosfotransferasa en una mejor posición para la traslación dirigida por la secuencia IRES. La expresión del casete de pIRESneo₂ contiene el principal promotor-amplificador temprano del citomegalovirus humano (CMV), seguido por el cADN de la IDS, que precede codones de parada en todos los tres marcos de lectura. Tiene un intrón sintético que mejora la estabilidad del mRNA. El ECMV IRES está seguido por el gen de la neomicina fosfotransferasa y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Los ribosomas puede entrar el RNAm bicistrónico por el extremo 5' para trasladar el gen de interés y el ECMV IRES traslada el marcador de resistencia al antibiótico.

En este vector la presión selectiva es ejercida por el antibiótico sobre la expresión completa del casete, además una dosis alta de antibiótico selecciona las células que expresan el gen de interés. La presión selectiva asegura que la expresión del gen de interés sea estable en el tiempo de cultivo.

Se desarrolló un nuevo casete de expresión episomal que contiene la secuencia del cADN codificante de la IDS humana "pIRESneo₂-IDS", el cual se traduce en los fibroblastos del paciente Hunter, produciendo niveles de IDS más altos que los encontrados en las células sin transfectar o transfectadas con el plásmido que no tiene el cADN de la enzima.

Los resultados obtenidos en los análisis de determinación de la actividad de la IDS en lisados celulares de las células Hunter, demuestran que la IDS expresada es funcional, ya que se incrementó 2 y 3 veces la actividad enzimática de la IDS en las células transfectadas con el casete construido, comparado con las células Hunter no transfectadas. Estos resultados se

esperaban pues las células del paciente Hunter tienen actividad residual alta y la expresión episomal de vectores normalmente no es muy eficiente.

Actualmente se desconoce, el número adecuado de casetes transcripcionales por célula, para producir niveles altos de expresión del gen. Aunque un número de copias excesivo puede limitar la expresión genica debido a la inducción de toxicidad celular por enzimas de replicación, factores de transcripción y posiblemente ribosomas. Además, los plásmidos que se replican activamente pueden tener eficiencias disminuidas de la expresión génica. Los vectores que persisten como elementos extracromosomales no replicativos, incluyendo vectores adenovirales y construidos plasmídicos estándar, están sujetos a destrucción por nucleasas y pueden ser inactivos funcionalmente. Además el número de copias de ADN extracromosomal por célula cae exponencialmente cuando las poblaciones celulares que se replican son el blanco de la transferencia génica (15).

Para obviar las limitaciones y optimizar los niveles de expresión de genes heterólogos, los vectores de ADN pueden modificarse para permitir la replicación extracromosomal en células humanas. La modificación puede estar acompañada de replicones de virus ADN que infectan células humanas y de primates, incluyendo Virus Epstein, virus BK y SV40. Tales replicones consisten en dos elementos: origen de replicación de ADN viral y un producto temprano del gen viral que funcione como transactivador de la replicación (15).

Como nuestro interés es insertar el casete episomal construido en un vector adenoasociado, no se necesita incluir estos replicones, ya que el virus de empaquetamiento pXX2 contiene las regiones Rep y Cap que permitirán una expresión eficiente y estable. La construcción del pIRESneo₂-IDS 1 – 2, representó el primer paso en la generación de un vector adenoasociado que en el futuro permitirá realizar terapia génica somática en las MPS.

Una vez comprobada la funcionalidad del pIRESneo₂-IDS, pensando en el futuro de la investigación, teniendo en cuenta que después de evaluar el AVV recombinante *in vitro*, es necesario la realización de estudios de expresión *in vivo* en animales de laboratorio y dado que en ese momento no se disponía de un modelo animal de MPS II relativamente económico, fue necesario aplicar la experiencia adquirida a otra MPS que tuviera un modelo murino establecido, fácilmente trabajable, no costoso, de fácil adquisición para el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo.

La cooperación del Dr. Shunji Tomatsu permitió trabajar en el síndrome de Morquio A y se construyó el pIRESneo₂-GALNS utilizado para la generación del plásmido pAAV-GALNS y para la producción de las partículas virales recombinantes rAAV-GALNS.

En este estudio, se logró obtener un título alto de partículas virales recombinantes comparado con estudios previos (126). Gracias a esto y que el sistema empleado para la producción de los AVV recombinantes fue libre de adenovirus o herpes virus como virus ayudadores, no se necesitó purificar y concentrar los virus mediante gradientes de cloruro de cesio, método empleado usualmente (126).

El vector rAVV-GALNS logró mediar la transferencia génica y expresar “*in Vitro*” la enzima en dos líneas celulares diferentes: células 293 y fibroblastos totalmente deficientes de la enzima, provenientes de un paciente con Síndrome de Morquio A. El nivel de expresión de la enzima se pudo detectar desde las 24 horas después de la infección con las partículas virales. Este constituye el primer estudio realizado con AAV como mediadores de la transferencia génica en el Síndrome de Morquio A.

En este trabajo no se realizaron estudios de expresión enzimática a largo plazo, pero se espera continuar con la investigación evaluando el vector construido y comparando el promotor intermedio temprano del citomegalovirus que dirige la expresión en el rAAV-GALNS, con otros promotores más fuertes, como por ejemplo; el promotor de β -actina de gallina, utilizado en varios trabajos de terapia génica mediada por AAV para la MPS VII o Síndrome de Sly (18-20, 30, 35, 119). Sin embargo, la utilización de promotores más fuertes en la construcción de los AAV, debe evaluarse muy cuidadosamente, ya que algunos estudios han demostrado que la expresión de niveles muy altos de GUS y α -galactosidasa A, causan cristalización y agregación intralisosomal de las enzimas (2,45). La toxicidad de enzimas lisosomales sobre-expresadas no se ha estudiado completamente. Algunos reportes han descrito la aparición de tumores en ratones MPS VII después de inyección neonatal de AAV recombinantes que tienen el promotor pCAGGS, el cual contiene la región amplificadora del citomegalovirus, el promotor de β -actina de gallina, una secuencia intrónica de la β -globina de conejo y la cola de poly A del SV40A (23). No obstante, no se ha establecido si los carcinomas hepatocelulares y los angiosarcomas presentes en los MPS VII fueron causados por mutagénesis insercional del promotor o por expresión exagerada de la enzima en algunos tipos celulares específicos (23,108). Cabe resaltar, que hasta la fecha no se han reportado tumores en experimentos con AAV recombinantes que emplean el mismo promotor para mediar la expresión de otros genes.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, es posible que los niveles enzimáticos de GALNS obtenidos con el vector construido en este trabajo, sean suficientes para corregir el depósito lisosomal en los ratones Morquio A, sin correr el riesgo de causar patologías anexas por la expresión exagerada del constructo. Recientemente, se identificó el gen llamado, factor 1 modificador de las sulfatasas (SUMF1), responsable de la oxidación de cisteína a C α -formilglicina,

siendo este último, el residuo catalítico del sitio activo en las sulfatasas eucarióticas (13, 14, 52). Introduciendo este elemento en el constructo para la generación de los AAV recombinantes que tienen inserto el cADN de GALNS, se podría co-expresar GALNS con la enzima generadora de α -formilglicina, produciéndose una GALNS completamente activada, mas estable y probablemente más eficiente en terminos de reducción de depósitos de GAGs. Con lo cual no sería necesario expresar niveles exagerados de GALNS.

Diferentes estudios tanto "*in vivo*" como "*in vitro*" mostraron que los rAAV libres de Ad tienen idéntica o igual infectividad y transducción comparados con los procedimientos convencionales que usan partículas de Ad como ayudadores (126). Con este método no hay riesgo de generación de partículas de Ad y como en el pXX6 las proteínas estructurales son eliminadas, no tendremos problemas de respuesta inmune en el ratón, haciendo la expresión enzimática más estable, lo cual permitiría disminuir los depósitos lisosomales de GAGs.

Uno de los principales propósitos de la línea de investigación conjunta con la Universidad de Saint Louis, es lograr la expresión a largo plazo del cADN GALNS humano después de la infusión intravenosa de los AAV recombinantes en ratones Morquio A tolerantes a la enzima humana (105), como parte de los estudios previos a la terapia génica en humanos. Recientemente, se han desarrollado técnicas de ELISA que permiten la cuantificación de queratán sulfato (103, 104), estas pruebas permitirán monitorear los depósitos de GAGs en los tejidos de los ratones Morquio en tratamiento.

7. CONCLUSIONES

✚ Mediante la realización de este trabajo se logró hacer la introducción de un gen corrector en células de paciente con Síndrome de Hunter utilizando un casete de expresión bicistrónico regulado.

✚ Debido a que la expresión del gen neo^r es proporcional a la expresión del gen de IDS insertado, por encontrarse los dos en un mismo casete de expresión se puede concluir que se logró construir eficientemente el vector pIRESneo₂-IDS que permite la expresión episomal de la IDS.

✚ Se logró la expresión de la IDS en las células transfectadas con sobrevivencia y crecimiento de las mismas en medio con geneticina, hasta por los menos 30 días después de la transfección, alcanzando aproximadamente un 80% de confluencia.

✚ Los análisis de determinación de la actividad de IDS en lisados de las células Hunter transfectadas, demuestran que la IDS expresada es funcional, ya que células transfectadas con el casete construido mostraron 2 a 3 veces más actividad enzimática que las células no transfectadas o transfectadas con el plásmido control pIRESneo₂.

✚ Se construyó el pIRESneo₂-GALNS y aunque no se realizaron estudios de expresión in vitro con el plásmido de expresión episomal, se comprobó la funcionalidad del sistema de expresión por los resultados obtenidos con el pIRESneo₂-IDS.

✚ Se logró construir el plásmido vector pAAV-GALNS, el cual se utilizó para la producción de partículas vírales rAAV-GALNS mediante un sistema libre de adenovirus o herpes virus como virus ayudadores, eliminando así la necesidad de realizar purificación viral con Cloruro de Cesio.

✚ Se obtuvieron títulos altos de partículas virales recombinantes e incluso los títulos logrados en esta investigación fueron más altos que los reportados en la literatura.

✚ Los análisis de determinación de la actividad enzimática de la GALNS en lisados celulares de las células 293 y de los fibroblastos Morquio A infectados con los rAAV-GALNS, demuestran que la GALNS expresada es funcional, ya que se demostró aumento de la actividad enzimática de las células infectadas.

✚ Este es el primer estudio realizado para corregir la deficiencia en el Síndrome de Morquio utilizando AAV como vectores mediadores de la transferencia génica.

1. RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS

- ✚ Evaluar la expresión “*in vitro*” de la GALNS a largo plazo en cultivos de diferentes líneas celulares provenientes de pacientes con Síndrome de Morquio A infectadas con los rAAV-GALNS producidos en este estudio.
- ✚ Generar nuevos rAAV-GALNS introduciendo en el constructo el gen SUMF1, para permitir la co-expresión de la enzima generadora de $\text{C}\alpha$ -formilglicina y GALNS, con el objetivo de originar una GALNS completamente activada.
- ✚ Producir nuevos rAAV-GALNS reemplazando el promotor intermedio temprano del citomegalovirus por un promotor fuerte, que asegure mayor expresión de la enzima.
- ✚ Comparar la eficiencia de los dos tipos de vectores descritos en términos de reducción de los depósitos de GAGs en los tejidos afectados en los ratones morquio A tolerantes a la enzima humana.
- ✚ Determinar la actividad enzimática en diferentes tejidos de ratones Morquio tolerantes a la GALNS humana, después de inyección intravenosa de partículas virales recombinantes rAAV-GALNS.
- ✚ Realizar pruebas inmunohistoquímicas que permitan detectar los GAGs acumulados en diferentes órganos, lo cual permitiría establecer si la terapia génica mediada por los AAV producidos es capaz de reducir los depósitos intralisosomales de GAGs.

REFERENCIAS

1. Achord DT, Brot FE, Bell CE, Sly WS. (1978) Human beta-glucuronidase: in vivo clearance and in vitro uptake by a glycoprotein recognition system on reticuloendothelial cells. *Cell*, 15:269-78.
2. Alisky JM, Hughes SM, Sauter SL, Jolly D, Dubensky TW Jr, Staber PD, Chiorini JA, Davidson BL. (2000) Transduction of murine cerebellar neurons with recombinant FIV and AAV5 vectors. *Neuroreport*, 11:2669-73.
3. Bantel-Schaal U, Delius H, Schmidt R, zur Hausen H. (1999) Human adeno-associated virus type 5 is only distantly related to other known primate helper-dependent parvovirus. *Journal of Virology*, 73:939-47.
4. Bartlett JS, Wilcher R, Samulski RJ. (2000) Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *Journal of Virology*, 74:2777-85.
5. Baxter MA, Wynn RF, Deakin JA, Bellantuono I, Edington KG, Cooper A, Besley GT, Church HJ, Wraith JE, Carr TF, Fairbairn LJ. (2002) Retrovirally mediated correction of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with mucopolysaccharidosis type I. *Blood*, 99:1857-9.
6. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett, G, Kurt-Jones AE, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW. (1997) Isolation of a common receptor for coxsackie virus B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*. 275:1320-23.
7. Bielicki J, Fuller M, Guo XH, Morris P, Hopwood JJ, Anson DS. (1995) Expression, purification and characterization of the recombinant human N-acetylgalactosamine 6 sulphatase. *Biochemical Journal*, 311:333-39.
8. Braun SE, Aronovich EL, Anderson RA, Crotty PL, Mclvor RS, Whitley CB. (1993) Metabolic correction and cross-correction of mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome) by retroviral-mediated gene transfer and expression of human iduronate-2-sulfatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 118830-34.

9. Bunge S, Steglich C, Beck M, Paschke E, Schinzel A, Schwinger E, Hopwood JJ, Gal A. (1992) Mutation spectrum of the iduronate-2-sulfatase gene in patients with Hunter syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 51:A166.
10. Cheng L, Ziegelhoffer PR, Yang NS. (1993) In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90:4455-59.
11. Chiorini JA, Kim F, Yang L, Kotin RM. (1999) Cloning and characterizing of adeno-associated virus type-5. *Journal of Virology*, 73:1309-19.
12. Chiorini JA, Yang L, Liu Y, Safer B, Kotin RM. (1997) Cloning of adeno-associated virus type-4 (AAV4) and generation of recombinant AAV4 particles. *Journal of Virology*, 71:6823-33.
13. Cosma MP, Pepe S, Annunziata I, Newbold RF, Grompe M, Parenti G, Ballabio A. (2003) The multiple sulfatase deficiency gene encodes an essential and limiting factor for the activity of sulfatases. *Cell*, 113:421-2.
14. Cosma MP, Pepe S, Parenti G, Settembre C, Annunziata I, Wade-Martins R, Di Domenico C, Di Natale P, Mankad A, Cox B, Uziel G, Mancini GM, Zammarchi E, Donati MA, Kleijer WJ, Filocamo M, Carozzo R, Carella M, Ballabio A. (2004) Molecular and functional analysis of SUMF1 mutations in multiple sulfatase deficiency. *Human Mutation*, 23:576-81.
15. Craenenbroeck KV, Vanhoenacker P, Haegeman G. (2000) Episomal vectors for gene expression in mammalian cells. *European Journal of Biochemistry*, 267:5665-78.
16. Cressant A, Desmaris N, Verot L, Bréjot T, Froissart R, Vanier MT, Maire I, Heard JM. (2004) Improved Behavior and Neuropathology in the Mouse Model of Sanfilippo Type IIIB Disease after Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer in the Striatum *Journal of Neuroscience*, 24: 10229 - 39.
17. Cull M, McHenry C. (1990) Preparation of extracts from prokaryotes. In: *Guide to protein purification*. Murray P. Deutscher editors. *Methods and Enzymology*, 82:147 – 148.

18. Daly TM, Ohlemiller KK, Roberts MS, Vogler CA, Sands MS. (2001) Prevention of systemic clinical diseases in MPS VII mice following AAV-mediated neonatal gene. *Gene Therapy*, 8:1-8.
19. Daly TM, Okuyama T, Vogler C, Haskins ME, Muzyczka N, Sands MS. (1999) Neonatal intramuscular injection with recombinant adeno-associated virus results in prolonged B-glucuronidase expression in situ and correction of liver pathology in mucopolysaccharidosis type VII. *Human Gene Therapy*, 10:85-94.
20. Daly TM, Vogler C, Levy B, Haskins ME, Sands MS. (1999) Neonatal gene transfer leads to widespread correction of pathology in a murine model of lysosomal storage disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96:2296-300.
21. Davidson BL, Stein CS, Heth JA, Martins I, Kotin RM, Derksen TA, Zabner J, Ghodsi A, Chiorini JA. (2000) Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97:3428-32.
22. Di Francesco C, Cracco C, Tomanin R, Picci L, Ventura L, Zancchello E, Di Natale P, Anson DS, Hopwood JJ, Graham FL, Scarpa M. (1997) In vitro correction of iduronate 2 sulfatase deficiency by adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Therapy*, 4:442-8.
23. Donsante A, Vogler C, Muzyczka N, Crawford JM, Barker J, Flotte T, Campbell-Thompson M, Daly T, Sands MS. (2001) Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Therapy*, 8:1343-6.
24. Duan D, Yan Z, Yue Y, Ding W, Engelhardt JF. (2001) Enhancement of muscle gene delivery with pseudotyped adeno-associated virus type 5 correlates with myoblast differentiation. *Journal of Virology*, 75:7662-71.
25. Elliger SS, Elliger CA, Lang C, Watson GL. (2002) Enhanced secretion and uptake of beta-glucuronidase improves adeno-associated viral-mediated gene therapy of Mucopolysaccharidosis type VII mice. *Molecular Therapy*, 5:617-26.

26. Ferry N, Duplessis O, Houssin D, Danos O, Heard J. (1991) Retroviral mediated gene transfer into hepatocytes in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88:8377-81.
27. Fisher KJ, Jooss K, Alston J, Yang Y, Haecker SE, High K, Pathak R, Raper SE, Wilson JM. (1997) Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene delivery. *Nature Medicine*, 3:306-16.
28. Fisher KJ, Kelley WM, Burda JF, Wilson JM. (1996) A novel adenovirus-adeno-associated virus hybrid vector that displays efficient rescue and delivery of the AAV genome. *Human Gene Therapy* 7: 2079-87.
29. Flomen RH, Green EP, Green PM, Bentley DR, Gfiannelli F. (1993) Determination of the organization of coding sequences within the iduronate sulphate sulphatase (IDS) gene. *Human Molecular Genetics*, 2:5-10.
30. Frisella WA, O'Connor LH, Vogler CA, Roberts M, Walkley S, Levy B, Daly TM, Sands MS. (2001) Intracranial injection of recombinant adeno-associated virus improves cognitive function in a murine model of Mucopolysaccharidosis type VII. *Molecular Therapy*, 3:351-57.
31. Froissart R, Moreira da Silva I, Guffon N, Bozon D, Maire I. (2002) Mucopolysaccharidosis type II. Genotype/phenotype aspects. *Acta Pædiatrica, Suppl.* 439:82-87.
32. Fu H, Salmuski RJ, McCown TJ, Picornell YJ, Fletcher D, Muenzer MJ. (2002) Neurological correction of lysosomal storage in a mucopolysaccharidosis IIIB mouse model by adeno-associated virus mediated gene delivery. *Molecular Therapy*, 5:42-49.
33. Gacesa P, Ramji DP. (1995) *Vectors essential data*. Iwood D. & Hamens BD. (eds). John Wiley & Sons New York. P 102.
34. Gahry-Sdard H, Molinier-Frenkel V, Le Boulaire C, Saulnier P, Opolon P, Lengange R, Gautier E, Le Cesne A, Zitvogel L, Venet A, Schatz C, Courtney M, Le Chevalier T, Tursz T, Guillet J, Farace F. (1997) Phase I trial of recombinant adenovirus gene transfer in lung cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 100:2218-26.

35. Gao C, Sands MS, Haskins ME, Parker Ponder K. (2000) Delivery of a retrovirus vector expressing human β -glucuronidase to the liver and the spleen decreases lysosomal storage in mucopolysaccharidosis VII mice. *Molecular Therapy*, 2:233-44.
36. Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM. (2002) Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:11854-59.
37. Grimm D, Kern A, Pawlita M, Ferrari F, Samulski R, Kleinschmidt JA. (1999) Titration of AAV-2 particles via a novel capsid ELISA: Packaging of genomes can limit production of recombinant AAV-2. *Gene Therapy*, 6:1322-30.
38. Hall CW, Neufeld EF. (1973) Alpha-L-iduronidase activity in cultured skin fibroblasts and amniotic fluid cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 158:817-21.
39. Harris JD, Lemoine NR. (1996) Strategies for targeted gene therapy. *Trends in Genetics*, 12:400-04.
40. Hartung SD, Reddy RG, Whitley CB, McIvor RS. (1999) Enzymatic correction and cross-correction of mucopolysaccharidosis type I fibroblast by adeno-associated virus-mediated transduction of the α -L-iduronidase gene. *Human Gene Therapy*, 10:2163-72.
41. Hennig AK, Levy B, Ogilvie JM, Vogler CA, Galvin N, Bassnett S, Sands MS. (2003) Intravitreal Gene Therapy Reduces Lysosomal Storage in Specific Areas of the CNS in Mucopolysaccharidosis VII Mice *Journal of Neuroscience*, 23: 3302 - 07.
42. Herzog RW, Hagstrom JN, Kung S, Tai SJ, Wilson JM, Fisher KJ, High KA. (1997) Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94:5804 – 09.
43. Hildinger M, Auricchio A, Gao G, Wang L, Chirmule N, Wilson JM. (2001) Hybrid vectors based on adeno-associated virus serotypes 2 and 5 for muscle-directed gene transfer. *Journal of Virology*, 75:6199-03.

44. Hofling AA, Vogler C, Creer MH, Sands MS. (2003) Engraftment of human CD34+ cells leads to widespread distribution of donor-derived cells and correction of tissue pathology in a novel murine xenotransplantation model of lysosomal storage disease. *Blood*, 101:2054-63.
45. Ioannou YA, Bishop DF, Desnick RJ. (1992) Overexpression of human alpha-galactosidase A results in its intracellular aggregation, crystallization in lysosomes, and selective secretion. *Journal of Cell Biology*, 119:1137-50.
46. Jooss K, Ertl HCJ, Wilson JM. (1998) Cytotoxic T-lymphocyte target proteins and their histocompatibility complex class I restriction in response to adenovirus delivered to mouse liver. *Journal of Virology*, 72:2945-54.
47. Kakkis ED, Muenzer J, Tiller GE, Waber L, Belmont J, Passage M, Izykowski B, Phillips J, Doroshov R, Walot I, Hoft R, Neufeld EF. (2001) Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *The New England Journal of Medicine*, 344:182-8.
48. Kennedy PGE. (1997) Potential uses of herpes simplex virus (HSV) vectors for gene therapy of neurological disorders. *Brain*, 120:1245-59.
49. Kim SH, Yu SS, Park JS, Robbins PD, An CS, Kim S. (1998) Construction of retroviral vectors with improved safety, gene expression, and versatility. *Journal of Virology*, 72:994-04.
50. Kornfeld S, Mellman I. (1989) The biogenesis of lysosomes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 5:483-525.
51. Kotin RM, Siniscalco M, Samulski RJ, Zhu XD, Hunter L, Laughlin CA, McLaughlin S, Muzyczka N, Rocchi M, Berns KI. (1990) Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87:2211-15.
52. Landgrebe J, Dierks T, Schmidt B, von Figura K. (2003) The human SUMF1 gene, required for posttranslational sulfatase modification, defines a new gene family which is conserved from pro- to eukaryotes. *Gene*, 316:47-56.
53. Lemig T, Brenner M, Ramsey J, Vanin E, Blaese M, Dilloo D. (1996) High-efficiency transduction of freshly isolated tumor cells using adenoviral interleukin-2 vectors. *Human Gene Therapy*, 7:1233-39.

54. Maeda Y, Ikeda U, Ogasawara Y, Urabe M, Takizawa T, Saito T, Colosi P, Kurtzman G, Shimada K, Ozawa K. (1997) Gene transfer into vascular cells using adeno-associated virus (AAV) vectors. *Cardiovascular Research*, 35: 514-21.
55. Marshall E. (1995) Gene therapy's growing pains. *Science*, 269:1050-55.
56. McCown TJ, Xiao X, Li J, Breese GR, Samulski J. (1996) Differential and persistent expression patterns of CNS gene transfer by an Adenoassociated virus (AAV) vector. *Brain Research*, 713:99-107.
57. McKinnis EJ, Sulzbacher S, Rutledge JC, Sanders J, Scott CR. (1996) Bone marrow transplantation in Hunter syndrome. *The Journal of Pediatrics*, 129:145-48.
58. Millat G, Froissart R, Maire I, Bozon D. (1997) Characterization of iduronate sulphatase mutants affecting N-glycosylation sites and the cysteine 84 residue. *Biochemical Journal*, 326:243-47.
59. Miyatake S, Iyer A, Martuza RL, Rabkin SD. (1997) Transcriptional targeting of herpes simplex virus for cell specific replication. *Journal of Virology*, 71:5124-32.
60. Miyoshi H, Takahashi M, Gage FH, Verma IM. (1997) Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94:10319-23.
61. Muenzer J, Lamsa JC, Garcia A, Dacosta J, Garcia J, Treco DA. (2002) Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a preliminary report. *Acta Pædiatrica, Suppl.* 439:98-99.
62. Muenzer J, Scarpa M. (2002) Commentary. *Acta Pædiatrica, Suppl.* 439:81.
63. Neufeld EF, Muenzer J. (1995) in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, eds. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (McGraw-Hill, New York), pp. 2465-94.
64. Northover H, Cowie RA, Wraith JE. (1996) Mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio syndrome); A clinical review. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 19:367-65.
65. Nunes FA, Raper SE. (1996) Liver-directed gene therapy. *Medical Clinics of North America*, 80:1201-13.

66. Ogilvie JM, Hennig AK, Ohlemiller KK, Sands MS. (2004) AAV-Mediated Intravitreal Gene Therapy Reduces Lysosomal Storage in the Retinal Pigmented Epithelium and Improves Retinal Function in Adult MPS VII Mice *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45: 3697.
67. Olsen I, Dean MF, Harris G, Muir H. (1981) Direct transfer of a lysosomal enzyme from lymphoid cells to deficient fibroblasts. *Nature*, 291:244-47.
68. Orkin SH, Motulsky AG (1995) Report and Recommendations of the Panel to Assess the NIH Investment in Research on Gene Therapy. Distributed by the National Institutes of Health, Bethesda, MD, www.nih.gov, Dec. 07, 1995.
69. Passini MA, Watson DJ, Vite CH, Landsburg DJ, Feigenbaum AL, 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 β -Glucuronidase-Deficient Mice. *Journal of Virology*, 77:7034-40.
70. Passini MA, Wolfe JH. (2001) Widespread Gene Delivery and Structure-Specific Patterns of Expression in the Brain after Intraventricular Injections of Neonatal Mice with an Adeno-Associated Virus Vector. *Journal of Virology*, 75: 12382-92.
71. Peters C, Schmidt B, Rommerskirch W, Rupp K. (1990) Phylogenetic conservation of arylsulfatases cDNA cloning and expression of human arylsulfatase B. *The Journal of Biological Chemistry*, 265:3374-80.
72. Petruschka L, Zschaiesche M, Bielicki J, Seidlitz G, Machill G, Hopwood J, Herrmann FH. (1994) Mucopolysaccharidosis Type II (Hunter Syndrome): Characterization of the Iduronate-2-Sulphatase in MPS II Skin Fibroblasts. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 17:89-92.
73. Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X, Samulski RJ. (2002) Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *Journal of Virology*, 76:791-801.
74. Rollins SA, Birks CW, Setter E, Squinto SP, Rother RP. (1996) Retroviral vector producer cell killing in human serum is mediated by natural antibody and complement: strategies for evading the humoral immune response. *Human Gene Therapy*, 7:619-26.

75. Roth JA, Nguyen D, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, Ferson DZ, Hong WK, Komaki R, Lee JJ, Nesbitt JC, Pisters KM, Putnam JB, Schea R, Shin DM, Walsh GL, Dolormente MM, Han CI, Martin FD, Yen N, Xu K, Stephens LC, McDonnell TJ, Mukhopadhyay T, Cai D. (1996) Retrovirus mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nature Medicine*, 2:985-91.
76. Russell DW, Alenxander IE, Miller AD. (1995) DNA synthesis and topoisomerase inhibitors increase transduction by adeno-associated virus vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92:5719-23.
77. Rutledge EA, Halbert CL, Russell DW. (1998) Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2. *Journal of Virology*, 72:309-319.
78. Rutledge EA, Russell DW. (1997) Adeno-associated virus vector integration junctions. *Journal of Virology*, 71:8429-36.
79. Saleh M. (1997) A retroviral vector that allows co-expression of two genes and the versatility of alternate selection markers. *Human Gene Therapy*, 8: 979-83.
80. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Pres. New York.
81. Samulski RJ, Chang L, Shenk T. (1989) Helper free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *Journal of Virology*, 63:3822-28.
82. Sands MS, Vogler CA, Ohlemiller KK, Roberts MS, Grubb JH, Levy B, Sly WS. (2001) Biodistribution, Kinetics, and Efficacy of Highly Phosphorylated and Non-phosphorylated β -Glucuronidase in the Murine Model of Mucopolysaccharidosis VII. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 43160-65.
83. Sanger SN, Coolson AR. (1977) DNA sequencing with chain – terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74:5463.
84. Sawtell NM, Thompson RL. (1992) Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcription unit promotes anatomical site-dependant establishment and reactivation from latency. *Journal of Virology*, 66:2157-69.

85. Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet A. L, Kochanek S. (1998) Genomic ADN transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nature Genetics*, 18:180-83.
86. Sferra TJ, Qu G, McNeely D, Rennard R, Clark KR, Lo WD, Johnson PR. (2000) Recombinant adenoassociated virus – mediated correction of lysosomal storage within the central nervous system of the adult mucopolysaccharidosis type VII Hum. *Gene Therapy*,11:507-19.
87. Shapira E, Blitzer MG, Miller JB, Africk DK. (1989) *Biochemical Genetics. A Laboratory Manual.* (Oxford University Press).
88. Shi Q, Wang Y, Worton R. (1997) Modulation of the specificity and activity of a cellular promotor in an adenoviral vector. *Human Gene Therapy*, 8:403-10.
89. Skrorupa AF, Fisher KJ, Wilson JM, Parente MK, Wolfe JH. (1999) Sustained production of B-glucuronidase from localized sites after AAV vector gene transfer results in widespread distribution of enzyme and reversal of lysosomal storage lesions in a large volume of brain Mucopolysaccharidosis. *Experimental Neurology*, 160:17-27.
90. Sleeper MM, Fornasari B, Ellinwood NM, Weil MA, Melniczek J, O'Malley TM, Sammarco CD, Xu L, Ponder KP, Haskins ME. (2004) Gene Therapy Ameliorates Cardiovascular Disease in Dogs with Mucopolysaccharidosis VII. *Circulation*, 110: 815-20.
91. Smith AE. (1995) Viral vectors in gene therapy. *Annual Review of Microbiology*, 49:807-38.
92. Snyder RO, Miao CH, Patijn GA, Spratt SK, Danos O, Nagy D, Gown AM, Winter B, Meuse L, Cohen LK, Thompson AR, Kay MA. (1997) Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nature Genetics*, 16:270-75.
93. Sparer TE, Wynn SG, Clark DJ, Kaplan JM, Cardoza LM, Wadsworth SC, Smith AE, Gooding LR. (1997) Generation of cytotoxic T lymphocytes against immunorecessive epitopes after multiple immunizations with adenovirus vectors is dependent on haplotype. *Journal of Virology*, 71: 2277-84.

94. Steiner I, Spivack JG, Lirette RP, Brown SM, MacLean AR, Subak-Sharpe JH, Fraser NW. (1989) Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts are evidently not essential for latent infection. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 8: 505-11.
95. Summerford C, Samulski RJ. (1998) Membrane-associated heparin sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *Journal of Virology*, 72:1438-45.
96. Tait DL, Obermiller PS, Redlin-Frazier S, Jensen RA, Welch P, Dann J, King M, Johnson DH, Holt JT. (1997) A phase I trial of retroviral BRCA1sv gene therapy in ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, 3:1959-68.
97. Toietta G, Severini GM, Traversari C, Tomatsu S, Sukegawa K, Fukuda S, Kondo N, Tortora P, Bordignon C. (2001) Various cells retrovirally transduced with N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase correct Morquio skin fibroblasts in vitro. *Human Gene Therapy*, 12:2007– 16.
98. Tomanin R, Friso A, Alba S, Piller Puicher E, Mennuni C, La Monica N, Hortelano G, Zacchello F, Scarpa M. (2002) Non-viral transfer approaches for the gene therapy of mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *Acta Pædiatrica, Suppl.* 439:100-04.
99. Tomatsu S, Dieter T, Schwartz IV, Sarmient P, Giugliani R, Barrera LA, Guelbert N, Kremer R, Repetto GM, Gutierrez MA, Nishioka T, Serrato OP, Montano AM, Yamaguchi S, Noguchi A. (2004) Identification of a common mutation in mucopolysaccharidosis IVA: correlation among genotype, phenotype, and keratan sulfate. *Journal of human genetics*, 49:490-4.
100. Tomatsu S, Filocamo M, Orii KO, Sly WS, Gutierrez MA, Nishioka T, Serrato OP, Di Natale P, Montano AM, Yamaguchi S, Kondo N, Orii T, Noguchi A. (2004) Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A): identification of novel common mutations in the N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) gene in Italian patients. *Human Mutation*, 24:187-8.
101. Tomatsu S, Fukuda S, Masue M, Sukegawa K, Fukao T, Yamagishi A, Hori T, Iwata H, Ogawa T, Nakashima Y, Hanyu Y, Hashimoto T, Titani K, Oyama R, Suzuki M, Yagi K, Hayashi Y, Orii T. (1991) Morquio disease: isolation, characterization and expression of full-length cDNA for human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 181:677-83.
102. Tomatsu S, Nishioka T, Montano AM, Gutierrez MA, Pena OS, Orii KO, Sly WS, Yamaguchi S, Orii T, Paschke E, Kircher SG, Noguchi A. (2004) Mucopolysaccharidosis IVA:

identification of mutations and methylation study in GALNS gene. *Journal of Medical Genetics*, 41:e98.

103. Tomatsu S, Okamura K, Maeda H, Taketani T, Castrillon SV, Gutierrez MA, Nishioka T, Fachel AA, Orii KO, Grubb JH, Cooper A, Thornley M, Wraith E, Barrera LA, Laybauer LS, Giugliani R, Schwartz IV, Frenking GS, Beck M, Kircher SG, Paschke E, Yamaguchi S, Ullrich K, Haskins M, Isogai K, Suzuki Y, Orii T, Kondo N, Creer M, Okuyama T, Tanaka A, Noguchi A. (2005) Keratan sulphate levels in mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 28:187-202.

104. Tomatsu S, Okamura K, Taketani T, Orii KO, Nishioka T, Gutierrez MA, Velez-Castrillon S, Fachel AA, Grubb JH, Cooper A, Thornley M, Wraith E, Barrera LA, Giugliani R, Schwartz IV, Frenking GS, Beck M, Kircher SG, Paschke E, Yamaguchi S, Ullrich K, Isogai K, Suzuki Y, Orii T, Kondo N, Creer M, Noguchi A. (2004) Development and testing of new screening method for keratan sulfate in mucopolysaccharidosis IVA. *Pediatric Research*, 55:592-7.

105. Tomatsu S, Orii KO, Vogler C, Nakayama J, Levy B, Grubb JH, Gutierrez MA, Shim S, Yamaguchi S, Nishioka T, Montano AM, Noguchi A, Orii T, Kondo N, Sly WS. (2003) Mouse model of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase deficiency (Galns^{-/-}) produced by targeted disruption of the gene defective in Morquio A disease. *Human Molecular Genetics*, 12:3349-58.

106. Verma IM, Somia N. (1997) Gene therapy - promises, problems and prospects. *Nature*, 389: 239-42.

107. Vincent KA, Piraino ST, Wadsworth SC. (1997) Analysis of recombinant adeno-associated virus packaging and requirements for rep and cap gene products. *Journal of Virology*, 71: 1897-1905.

108. Vogler C, Galvin N, Levy B, Grubb J, Jiang J, Zhou XY, Sly WS. (2003) Transgene produces massive overexpression of human beta -glucuronidase in mice, lysosomal storage of enzyme, and strain-dependent tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100:2669-73.

109. Wagner E, Cotten M, Foisner R, Birnstiel ML. (1991) Transferrin-polycation-ADN complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and ADN delivery to cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88: 4255-59.

110. Walters RW, Yi SM, Keshavjee S, Brown KE, Welsh MJ, Chiorini JA, Zabner J. (2001) Binding of adeno-associated virus type 5 to 2,3 sialic acid is required for gene transfer. *The Journal of Biological Chemistry*, 276:20610-16.
111. Wang C, Huang L. (1987) pH sensitive immunoliposomes mediate target-cell-specific delivery and controlled expression of a foreign gene in mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84:7851-55.
112. Wang S, Vos J. (1996) A hybrid herpesvirus infectious vector based on epstein-barr virus and herpes simplex virus type 1 for gene transfer into human cells in vitro and in vivo. *Journal of Virology*, 70: 8422-30.
113. Watson GL, Sayles JN, Chen C, Elliger SS, Elliger CA, Raju NR, Kurtzman GJ, Podsakoff GM. (1998) Treatment of lysosomal storage disease in MPS VII mice using a recombinant adeno-associated virus. *Gene Therapy*, 5:1642-49.
114. Wheeler CJ, Felgner PL, Tsai YJ, Marshall J, Sukhu L, Soeun GH, Hartikka J, Nietupski J, Manthorpe M, Nichols M, Plewe M, Liang X, Norman J, Smith A, Cheng SH. (1996) A novel cationic lipid greatly enhances plasmid delivery and expression in mouse lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93:11454-59.
115. Wickham TJ, Lee GM, Titus JA, Titus JA, Sconocchia G, Bakacs T, Kovesdi I, Segal DM. (1997) Targeted adenovirus-mediated gene delivery to T cells via CD3. *Journal of Virology*, 71:7663-69.
116. Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. (1993) Integrins avb3 and avb5 promote adenovirus internalisation but not virus attachment. *Cell*, 73:309-19.
117. Wilson PJ, Meaney CA, Hopwood JJ, Morris CP. (1993) Sequence of the human iduronate 2 sulfatase (IDS) gene. *Genomics*, 17:773-75.
118. Wilson PJ, Morris CP, Anson DS, Occhiodoro T, Bielicki J, Clements PR, Hopwood JJ. (1990) Hunter syndrome: Isolation of an iduronate 2 sulfatase cADN clone and analysis of patient ADN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87:8531-35.
119. Wolfe JH, Sands MS, Harel N, Weil MA, parente MK, Polesky AC, Reilly JJ, Hasson C, Weimelt S, Haskins ME. (2000) Gene transfer of low levels of B-gluconidase corrects hepatic

lysosomal storage in a large animal model of mucopolysaccharidosis VII. *Molecular Therapy*, 2:552-61.

120. Wood MJA., Byrnes AP, Pfaff DW, Rabkin SD, Charlton HM. (1994) Inflammatory effects of gene-transfer into the CNS with defective HSV-1 vectors. *Gene Therapy*, 1:283-91.

121. Worgall S, Wolff G, Falck-Pedersen E, Crystal RG. (1997) Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. *Human Gene Therapy*, 8:37-44.

122. Wu CH, Wilson JM, Wu GY. (1989) Targeting genes: delivery and persistent expression of a foreign gene driven by mammalian regulatory elements in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 264:16985-87.

123. Wygoda MR, Wilson MR, Davis MA, Trosko JE, Rehemtulla A, Lawrence TS. (1997) Protection of herpes simplex virus thymidine kinase-transduced cells from ganciclovir-mediated cytotoxicity by stander cells: the good virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94:5804-09.

124. Xiao W, Berta SC, Lu MN, Moscioni AD, Tazelaar J, Wilson JM. (1998) Adenoassociated virus as a vector for liver-directed gene therapy. *Journal of Virology*, 72:10222-26.

125. Xiao W, Chirmule N, Berta SC, McCullough B, Gao G, Wilson JM. (1999). Gene therapy based on adeno-associated virus type 1. *Journal of Virology*, 73:3994-4003.

126. Xiao X, Li J, Samulski RJ. (1998) Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *Journal of Virology*, 72: 2224-32.

127. Yang Y, Wilson JM. (1995) Clearance of adenovirus-infected hepatocytes by MHC class I restricted CD4+ CTLs in vivo. *Journal of Immunology*, 155:2564-69.

128. Yansura DG, Henner DJ. (1990) Use of *Escherichia coli trp* promoter for directs expression of proteins. *Methods and Enzymology*, 185:54-60.

129. Young ID, Harper PS, Newcombe RG, Archer IM. (1982) A clinical and genetic study of Hunter's syndrome. 1. Heterogeneity. *Journal of Medical Genetics*, 9:401-07.

130. Young ID, Harper PS, Newcombe RG, Archer IM. (1982) A clinical and genetic study of Hunter's syndrome. 2. Differences between the mild and severe forms. *Journal of Medical Genetics*, 19:408-11.
131. Zabner J, Seiler M, Walters R, Kotin RM, Fulgeras W, Davidson BL, Chiorini JA. (2000) Adeno-associated virus type 5 (AAV5) but not AAV2 binds to the apical surface of airway epithelia and facilitates gene transfer. *Journal of Virology*, 74:3852-58.
132. Zhou X, Muzyczka N. In vitro packaging of Adeno-Associated virus ADN. (1998) *Journal of Virology*, 72:3241-47.

ANEXO 1. Sitios de restricción del cADN del pIRESneo₂-GALNS

ANEXO 2. Sitios de restricción del pAAV-GALNS con el casete de expresión insertado en la orientación correcta

ANEXO 3. Sitios de restricción del pAAV-GALNS con el casete de expresión insertado en sentido equivocado