



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

## **Tesis Doctoral**

# Terapia génica para el MNGIE: Estudio comparativo de diferentes vectores adeno-asociados en el modelo preclínico de la enfermedad.

**Raquel Cabrera Pérez**

Tesis adscrita al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la  
Universitat Autònoma de Barcelona

Este trabajo ha sido realizado en el Grupo de Patología Neuromuscular y Mitocondrial del  
Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron.

Director

**Ramon Martí Seves**

Tutor

**Miquel Vila Bover**

Universitat Autònoma de Barcelona

2017



El MNGIE (encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial) es una enfermedad rara de herencia autosómica recesiva que provoca afectación de la función muscular, neuronal y gastrointestinal y cuya esperanza de vida se sitúa en torno a los 37 años. Está causada por mutaciones en el gen nuclear *TYMP*, que codifica la timidina fosforilasa (TP). La TP cataliza el primer paso del catabolismo de los nucleósidos timidina (dThd) y desoxiuridina (dUrd), por lo que disfunciones en esta enzima provocan la acumulación sistémica de estos nucleósidos. La sobrecarga de dThd y dUrd da lugar a un exceso de dTTP y una disminución de dCTP mitocondrial. Consecuentemente, se produce un desequilibrio del pool de los desoxiribonucleósidos trifosfato (dNTPs) mitocondriales que interfiere con la correcta replicación del ADN mitocondrial y provoca depleción, deleciones múltiples y mutaciones puntuales somáticas que conducen a disfunción mitocondrial.

Pese a que se han propuesto varias aproximaciones terapéuticas basadas tanto en la eliminación de los metabolitos tóxicos como en el reemplazo enzimático con el fin de lograr un aclaramiento sistémico de la concentración de nucleósidos, sólo el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas y el trasplante ortotópico de hígado han resultado ser efectivos en la corrección bioquímica a largo plazo. No obstante, ambas estrategias son agresivas, invasivas y están limitadas por la posibilidad de encontrar donantes compatibles. Además, presentan riesgos no desdeñables para la vida de los pacientes que se ven incrementados en los afectos de MNGIE debido al deteriorado estado de salud que éstos presentan en el momento del tratamiento.

El uso de la terapia génica puede suponer una alternativa para el tratamiento de esta enfermedad. El desarrollo de una estrategia basada en vectores lentivirales de tercera generación dirigidos al tejido hematopoyético demostró la prueba de concepto de la efectividad de la terapia génica en células linfoblastoides de pacientes y en el modelo murino de MNGIE. No obstante, debido al riesgo de transactivación oncogénica asociado al uso de vectores integrativos, desarrollamos una segunda aproximación basada en vectores adeno-asociados (AAV) transcripcionalmente dirigidos al hígado.

En este trabajo se ha estudiado el efecto del uso de diferentes promotores (TBG, PGK, HLP y AAT) y configuraciones genómicas (ADN de cadena sencilla, ssADN, o autocomplementario, scAAV) en la expresión del gen *TYMP* tras ser introducido en AAVs de serotipo 2/8. Para ello se han tratado ratones macho doble KO *Tymp*<sup>-/-</sup>*Upp1*<sup>-/-</sup> (modelo bioquímico de la enfermedad) mediante una única inyección intravenosa por vena caudal de las diferentes construcciones a diferentes dosis. Treinta y cuatro semanas después del tratamiento se ha evaluado la actividad TP, la concentración de nucleósidos, el número de copias de *TYMP* y el pool de dNTPs en diferentes tejidos. Aunque los resultados muestran que todos los vectores son capaces de restituir la actividad enzimática en hígado, reducir la concentración sistémica de nucleósidos y modular el pool de dNTPs mitocondriales en hígado, el uso de promotores específicos de hepatocitos (TBG, HLP y AAT) ha resultado ser más eficiente que el uso del promotor constitutivo PGK. Por el contrario, no se ha observado una mayor respuesta terapéutica al usar vectores con conformación scAAV. Tampoco se han detectado efectos adversos o signos evidentes de toxicidad hepatocelular asociados al uso de AAVs.

Los mejores resultados se han obtenido con los vectores TBG y AAT (ambos con configuración de ssADN). No obstante, a la dosis más baja testada (correspondiente a  $5 \cdot 10^{10}$  genomas víricos/kg) sólo el vector AAT ha resultado ser efectivo en el 100% de los casos, lo que sugiere que ésta debería ser la construcción elegida en posteriores ensayos clínicos en humanos en caso de implementación de la terapia génica basada en AAVs para el tratamiento del MNGIE.



MNGIE (Mitochondrial NeuroGastroIntestinal Encephalomyopathy) is a rare autosomal recessive disease characterized by muscular, neuronal and gastrointestinal symptoms. The average life-span of MNGIE patients is 37 years. The disease is caused by mutations in the nuclear gene *TYMP*, which encodes thymidine phosphorylase (TP). TP catalyzes the first step of thymidine (dThd) and deoxyuridine (dUrd) catabolism. In MNGIE patients, TP dysfunction results in systemic nucleoside accumulation and disturb mitochondrial deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP) pools. Concretely, nucleoside overload leads to mitochondrial deoxythymidine triphosphate (dTTP) increase and deoxycytidine triphosphate (dCTP) decrease. This imbalance interferes with correct mitochondrial DNA replication thus producing depletion, multiple deletions and somatic point mutations and resulting in mitochondrial dysfunction.

Despite the development of multiple therapeutic strategies based on the clearance of the toxic metabolites or in enzyme replacement with the aim of achieving systemic nucleoside clearance, only allogeneic hematopoietic stem cells transplantation and orthotopic liver transplantation have been effective in long-term biochemical correction. Nevertheless, both procedures are associated with non-negligible mortality rates as well as adverse complications that are compounded in MNGIE patients because of their poor medical condition at the time of treatment. Furthermore, compatible donors are required.

In recent years, gene therapy has emerged as an alternative therapeutic approach for the treatment of MNGIE. Previous preclinical studies carried out in lymphoblastoid cell lines obtained from MNGIE patients and in the murine model of the disease, demonstrated that the use of lentiviral vectors targeted to hematopoietic stem cells is effective in the restoration of TP activity. However, due to the risk of oncogenic transactivation associated to integrative vectors, we later developed an alternative strategy based on adeno-associated (AAV) vectors transcriptionally targeted to the liver.

In this work, we have studied the effect of some AAV2/8 vectors differing on the promoter (TBG, PGK, HLP and AAT) and the DNA configuration (single stranded, ssDNA, or self-complementary, scAAV) on the function of the *TYMP* transgene in the murine model of the disease. Specifically, we have treated double KO *Tymp*<sup>-/-</sup>*Upp1*<sup>-/-</sup> male mice with a single tail vein injection of the different vectors at different doses. Thirty-four weeks after treatment we have assessed TP activity, nucleoside concentration, *TYMP* copy number and mitochondrial dNTP content in different tissues. Despite the results show that all vectors provide TP activity to the liver, reduce systemic nucleoside overload and modulate mitochondrial dNTP concentration, the use of liver specific promoters (TBG, HLP and AAT) has been more effective than the use of the constitutive promoter PGK. The self-complementary configuration has not provided any significant improvements. We have not observed adverse side effects or signs of hepatocellular toxicity associated with the use of AAV vectors.

The best results correspond to that obtained with the use of the TBG and AAT promoters (which are both ssDNA vectors). However, at the lowest tested dose (which is  $5 \cdot 10^{10}$  genome copies/kg), only the AAT vector has been effective in all mice. Based on this, our data suggest that the AAT vector should be chosen for the clinical use if AAV-based gene therapy is implemented for MNGIE.



# ÍNDICE





<b>1. ABREVIATURAS.....</b>	<b>15</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>21</b>
2.1. Encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial: MNGIE.....	23
2.1.1. Historia y cuadro clínico.....	23
2.1.2. Causa genética del MNGIE.....	25
2.1.3. Metabolismo de nucleótidos.....	26
2.1.4. MNGIE: enfermedad mitocondrial causada por acumulación de nucleósidos.....	28
2.1.5. Modelo animal de MNGIE.....	30
2.1.6. Aproximaciones terapéuticas.....	31
2.2. Terapia génica.....	33
2.2.1. Introducción a la terapia génica.....	33
2.2.2. Métodos de transferencia génica.....	34
2.2.2.1. Vectores no virales.....	35
2.2.2.2. Vectores virales.....	35
2.2.2.2.1. Adenovirus.....	35
2.2.2.2.2. Retrovirus y lentivirus.....	36
2.2.2.2.3. Herpesvirus.....	36
2.2.2.2.4. Vacciniavirus.....	36
2.2.2.2.5. Virus adeno-asociados.....	36
I. Características moleculares de los AAV.....	37
II. Ciclo viral de los AAV.....	38
III. Serotipos y tropismo.....	41
IV. AAV con genoma autocomplementario.....	43
V. AAV recombinantes (rAAV).....	44
VI. AAV y respuesta inmune.....	49
VII. Ensayos clínicos basados en el uso de AAV.....	51
2.2.3. Técnicas de edición génica.....	52
2.2.4. Pros y contras de la terapia génica.....	53
2.3. Terapia génica y MNGIE.....	54
2.3.1. Terapia génica ex vivo mediante el uso de LV dirigidos al tejido hematopoyético.....	54
2.3.2. Terapia génica in vivo mediante el uso de AAV con tropismo hepático.....	55
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>
3.1. Hipótesis.....	59
3.2. Objetivos.....	59
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>61</b>
4.1. Metodología general.....	63

4.1.1.	Extracción de ADN.....	63
4.1.1.1.	Miniprep de ADN plasmídico.....	63
4.1.1.2.	Maxiprep de ADN plasmídico.....	63
4.1.1.3.	Extracción de ADN a partir de tejido de ratón. ....	63
4.1.1.3.1.	Extracción de ADN genómico para el genotipado de animales. ....	63
4.1.1.3.2.	Extracción de ADN total mediante kit comercial. ....	64
4.1.1.3.3.	Extracción por Fenol-Cloroformo.....	64
4.1.1.3.4.	Extracción por Hirt. ....	65
4.1.2.	Cuantificación de ADN.....	65
4.1.3.	Cuantificación de proteína. ....	65
4.1.4.	Electroforesis en gel de agarosa.....	66
4.2.	Técnicas de clonaje.....	66
4.2.1.	Estrategias de clonaje.....	66
4.2.1.1.	Construcción del vector AAV2/8-TBG-TYMP.....	66
4.2.1.2.	Construcción del vector AAV2/8-PGK-TYMP.....	67
4.2.1.3.	Construcción del vector scAAV2/8-HLP-TYMP.....	70
4.2.1.4.	Construcción del vector AAV2/8-AAT-TYMP.....	74
4.2.2.	Cultivo de bacterias.....	75
4.2.3.	Digestión con enzimas de restricción.....	75
4.2.4.	Purificación de fragmentos de ADN en geles de agarosa. ....	86
4.2.5.	Ligación de fragmentos de ADN.....	86
4.2.6.	Producción y transformación de bacterias quimiocompetentes.....	89
4.2.7.	Selección y amplificación de clones.....	89
4.2.8.	Amplificación por PCR.....	90
4.2.9.	Purificación de productos de PCR.....	90
4.2.10.	Secuenciación de fragmentos de ADN.....	90
4.3.	Producción y titulación de partículas víricas.....	92
4.3.1.	Producción de AAV.....	92
4.3.2.	Titulación de producciones víricas.....	92
4.4.	Técnicas de experimentación animal.....	93
4.4.1.	Condiciones de estabulación.....	93
4.4.2.	Genotipado de animales dKO.....	93
4.4.2.1.	Amplificación del gen murino <i>Tymp</i> .....	93
4.4.2.2.	Amplificación del gen murino <i>Upp1</i> .....	94
4.4.2.2.1.	Amplificación del alelo KO.....	95
4.4.2.2.2.	Amplificación del alelo WT.....	95

4.4.3.	Inyección intravenosa de AAVs. ....	95
4.4.4.	Extracción y procesamiento de muestras sanguíneas. ....	96
4.4.5.	Sacrificio y obtención de muestras. ....	97
4.5.	Ensayos bioquímicos. ....	97
4.5.1.	Determinación de dThd y dUrd. ....	97
4.5.1.1.	Plasma. ....	97
4.5.1.2.	Tejidos de ratón. ....	98
4.5.2.	Determinación de actividad timidina fosforilasa. ....	99
4.5.2.1.	Tejidos de ratón. ....	99
4.5.2.2.	Fracción celular de sangre. ....	100
4.5.2.3.	Células (muestra control de actividad TP). ....	100
4.5.3.	Determinación de dNTPs. ....	100
4.5.3.1.	Extracción de dNTPs mitocondriales de hígado. ....	100
4.5.3.2.	Determinación enzimática de dNTPs. ....	101
4.5.4.	Determinación de actividad alanina aminotransferasa (ALT). ....	104
4.6.	PCR cuantitativa a tiempo real. ....	105
4.6.1.	Determinación del número de copias de <i>TYMP</i> por qPCR. ....	105
4.6.2.	Determinación del número de copias de mtADN por qPCR. ....	106
4.7.	Identificación de proteínas por western-blot. ....	106
4.7.1.	Obtención de extractos proteicos. ....	106
4.7.2.	Electroforesis en gel de poliacrilamida. ....	106
4.7.3.	Transferencia. ....	107
4.7.4.	Inmunodetección y revelado. ....	108
4.8.	Análisis histoquímico. ....	108
4.8.1.	Tinción hematoxilina-eosina. ....	108
4.8.2.	Inmunohistoquímica de hígado para la detección de TP. ....	109
4.8.3.	Tinción de núcleos. ....	109
4.9.	Diseño experimental. ....	109
4.10.	Análisis estadístico. ....	110
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>111</b>
5.1.	Construcción de rAAV. ....	113
5.2.	Titulación de producciones víricas. ....	117
5.3.	Monitorización de parámetros físicos, bioquímicos y toxicológicos a lo largo del tratamiento. ....	117
5.3.1.	Control de peso. ....	117
5.3.2.	Concentración de nucleósidos en plasma. ....	118

5.3.3.	Evaluación de toxicidad hepática.....	124
5.4.	Estudio de los efectos del transgén <i>TYMP</i> 34 semanas después del tratamiento.....	127
5.4.1.	Número de copias de <i>TYMP</i> .....	127
5.4.2.	Inmunodetección, actividad y cuantificación de la enzima TP.....	130
5.4.2.1.	Inmunohistoquímica de hígado.....	130
5.4.2.2.	Actividad TP.....	132
5.4.2.3.	Cuantificación de los niveles de proteína.....	141
5.4.3.	Concentración sistémica de nucleósidos.....	142
5.4.4.	Concentración de dNTPs mitocondriales en hígado.....	149
5.4.5.	Número de copias de mtADN en hígado.....	155
5.4.6.	Caracterización histológica del hígado.....	155
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>159</b>
6.1.	Elección del hígado como principal diana terapéutica y diseño de rAAVs.....	161
6.2.	Eficiencia de transducción hepática de los diferentes AAV8 tras administración intravenosa periférica.....	163
6.3.	Restitución de actividad TP en el modelo murino de MNGIE.....	165
6.4.	Reducción de la concentración de nucleósidos en el modelo doble KO.....	168
6.5.	Efecto del tratamiento sobre el pool de dNTPs mitocondriales.....	170
6.6.	Valoración de los posibles efectos adversos derivados del uso de AAVs.....	172
6.7.	Perspectivas del uso de la terapia génica en pacientes de MNGIE.....	173
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>177</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>181</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXO.....</b>	<b>199</b>





## **1. ABREVIATURAS**





AAP	Proteína activadora del proceso de ensamblaje
AAT	Promotor hepático: región potenciadora de la apolipoproteína E + región promotora del gen $\alpha$ -1-antitripsina humano
AAV	Virus adeno-asociado
AAVR	Receptor común de virus adeno-asociado
Ab	Anticuerpo
Ad	Adenovirus
ADA-SCID	Inmunodeficiencia combinada severa debida a déficit en adenosina deaminasa
AHSCT	Trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas
ALT	Alanina aminotransferasa
AMP	Adenosina monofosfato
ApoE	Región potenciadora de la apolipoproteína E humana.
APS	Persulfato de amonio
ATP	Adenosina trifosfato
BGH	Hormona de crecimiento bovina
BSA	Albúmina de suero bovino
cADN	ADN codificante
CAPD	Diálisis intraperitoneal ambulatoria continuada
CDA	Citidina deaminasa
CRISPR	<i>“Clustered regularly interspaced short palindromic repeats”</i> ; Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas.
CTP	Citidina trifosfato
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCtd	Desoxicitidina
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
ddNTP	Didesoxinucleósido trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
<i>DGUOK</i>	Gen codificante de la desoxiguanosina quinasa humana
DHF	Dihidrofolato
DHFR	Dihidrofolato reductasa
dNDP	Desoxiribonucleósido difosfato
dNMP	Desoxiribonucleósido monofosfato
dN	Desoxiribonucleósido
dNTP	Desoxiribonucleósido trifosfato
dsADN	ADN de doble cadena
dTDP	Timidina difosfato
dThd	Timidina
dTMP	Timidina monofosfato
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Timidina trifosfato
dUMP	Desoxiuridina monofosfato
dUrd	Desoxiuridina
dUTP	Desoxiuridina trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE-TP	Eritrocitos con timidina fosforilasa recombinante encapsulada
EMA	Agencia Europea del Medicamento
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

Gc/kg	Genomas víricos/kilogramo
GMP	Guanosina monofosfato
GTP	Guanosina trifosfato
HBB2	Subunidad beta-2 de la hemoglobina
HCC	Carcinoma hepatocelular
hENT1	Transportador equilibrativo de nucleósidos 1
HLP	Promotor híbrido específico de hígado
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HSV	Herpesvirus
IMP	Inosina monofosfato
ITR	<i>"Inverted terminal repeat"</i> ; Repetición Terminal Invertida
KO	<i>"Knock-out"</i>
LB	Medio Luria Bertani
LDH	Lactato deshidrogenasa
LV	Lentivirus
MAITE	Tampón de incubación para la extracción de mitocondrias
MDDS	Síndromes de depleción y deleciones del ADN mitocondrial
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIB	Tampón de homogenización para la extracción de mitocondrias
MNGIE	Encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial
mtADN	ADN mitocondrial
nAb	Anticuerpo neutralizante
nADN	ADN nuclear
NDP	Ribonucleósido difosfato
NMP	Ribonucleósido monofosfato
NTP	Ribonucleósido trifosfato
OLT	Trasplante ortotópico de hígado
ON	<i>"Over-night"</i> ; Toda la noche
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGK	Promotor constitutivo de la fosfoglicerato quinasa humana
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PNH	Primates no humanos
<i>POLG</i>	Gen codificante de la polimerasa y mitocondrial humana
PRPP	5-fosforibosil-1-pirofosfato
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
qPCR	PCR cuantitativa
rAAV	Virus adeno-asociado recombinante
RNR	Ribonucleótido reductasa
<i>RRM2B</i>	Gen codificante de la subunidad p53R2 de la ribonucleótido reductasa humana
scAAV	<i>"Self-complementary AAV"</i> ; AAV autocomplementario
dsAAV	<i>"Double-stranded AAV"</i> ; AAV de doble cadena
SDS	Sodio dodecil sulfato
Señal pA	Señal de poliadenilación
SEVAG	Alcohol isoamílico:cloroformo (1:24)

ssADN	ADN de cadena sencilla
TA	Temperatura ambiente
TBE	Tampón tris borato con ácido etilendiaminotetraacético
TBG	Promotor hepático de la globulina de unión a tiroxina humana
TBS	Tampón tris salino
TCA	Ácido tricloroacético
TE	Tampón tris con ácido etilendiaminotetraacético
THF	Tetrahidrofolato
Thy	Timina
TK2	Timidina quinasa 2
TLR9	<i>"Toll-like receptor 9"</i>
TP	Timidina fosforilasa
TS	Timidilato sintasa
TTBS	Tampón tris salino suplementado con Tween 20
<i>TYMP</i>	Gen codificante de la timidina fosforilasa humana
<i>Tymp</i>	Gen codificante de la timidina fosforilasa murina
UDP	Uridina difosfato
UMP	Uridina monofosfato
UNG	Uracilo ADN glicosilasa
UP	Uridina fosforilasa
<i>Upp1</i>	Gen codificante de la isoforma 1 de la uridina fosforilasa murina
UTP	Uridina trifosfato
WB	Western-blot
WPRE	Elemento de regulación post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota
WT	<i>"Wild-Type"; Salvaje</i>
ZFN	<i>"Zinc-finger nucleases";</i> Nucleasas con dedos de zinc



## **2. INTRODUCCIÓN**



## 2.2. Encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial: MNGIE.

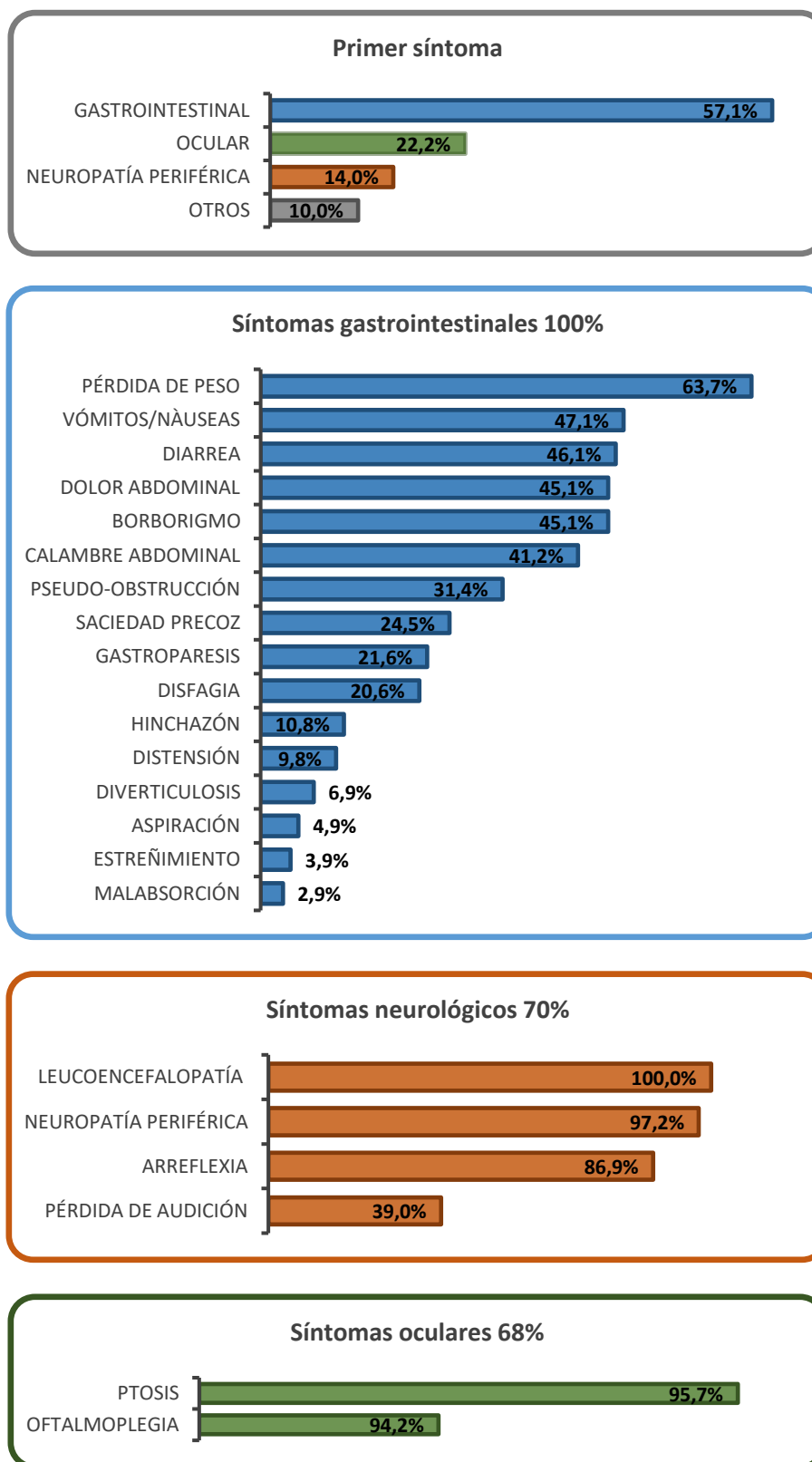
### 2.2.1. Historia y cuadro clínico.

El MNGIE (encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial, OMIM #603041) es una enfermedad rara de herencia autosómica recesiva asociada a defectos en la replicación del ADN mitocondrial (mtADN) y caracterizada principalmente por la presencia de síntomas y/o signos neurológicos y gastrointestinales entre los que destacan dismotilidad gastrointestinal (causante de vómitos, diarreas, pseudo-obstrucción intestinal, disfagia y gastroparesis), caquexia, ptosis, oftalmoplegia externa progresiva, neuropatía periférica y leucoencefalopatía (*Figura 2.1*)<sup>1</sup>. Existen también otros rasgos que manifiestan evidencias claras de disfunción mitocondrial tanto a nivel bioquímico como morfológico, como son la acidosis láctica o la disfunción de la cadena respiratoria en músculo esquelético (presencia de fibras rojo-rasgadas, fibras deficientes en citocromo c oxidasa, disminución de la actividad de uno o múltiples complejos de la cadena respiratoria y mitocondrias de estructura anómala)<sup>2-5</sup>. Los primeros síntomas suelen aparecer durante la segunda o la tercera década de vida.

El MNGIE es una enfermedad crónica y progresiva de carácter devastador que provoca caquexia grave y deja a los pacientes en un estado nutricional crítico. Esto, sumado a las complicaciones derivadas de la disfunción gastrointestinal, acaba provocando la muerte de los pacientes entre los 35 y 40 años de edad en el 80% de los casos (siendo 37 años la esperanza de vida media)<sup>1</sup>. No obstante, cabe destacar que se trata de una enfermedad con un cierto grado de heterogeneidad en la que no existe una correlación directa entre la mutación y el fenotipo. De hecho, se ha observado variabilidad en las manifestaciones clínicas presentadas por hermanos que presentan la misma mutación y que conviven en un mismo núcleo familiar, e incluso se han descrito casos de enfermos de edad más avanzada (*“late-onset”*) en los que algunos de los rasgos clínicos característicos son muy leves o inexistentes<sup>6-9</sup>. Por esta razón se cree que el fenotipo podría depender en mayor o menor medida de otros factores genéticos o ambientales desconocidos.

El primer caso de MNGIE fue descrito en el año 1976 por Okamura y colaboradores como “Miopatía oculoesquelética congénita con mitocondrias anómalas en hígado y músculo”<sup>10</sup> y, aunque desde entonces se han publicado alrededor de 250 casos en todo el mundo utilizando diferentes acrónimos (polineuropatía, oftalmoplegia, leucoencefalopatía y pseudo-obstrucción intestinal (POLIP)<sup>11</sup>, distrofia muscular ologastrointestinal (OGIMD)<sup>12</sup> y miopatía mitocondrial con polineuropatía, oftalmoplegia y pseudo-obstrucción (MEPOP)<sup>13</sup>) se cree que muchos otros han quedado sin diagnosticar y que ésta sigue siendo una enfermedad desconocida para muchos clínicos. De hecho, muchos pacientes de MNGIE son frecuentemente diagnosticados de forma errónea con anorexia nerviosa, inflamación intestinal, síndrome de la arteria superior mesentérica, enfermedad de Whipple, pseudo-obstrucción intestinal crónica, polineuropatía crónica inflamatoria desmielinizante o enfermedad de Charcot Marie Tooth, entre otros<sup>1,14,15</sup>. Por este motivo, a pesar de que se los datos publicados en Orphanet estiman que el MNGIE afecta a 1 por cada millón de habitantes en Europa, se desconoce cuál es su prevalencia real.





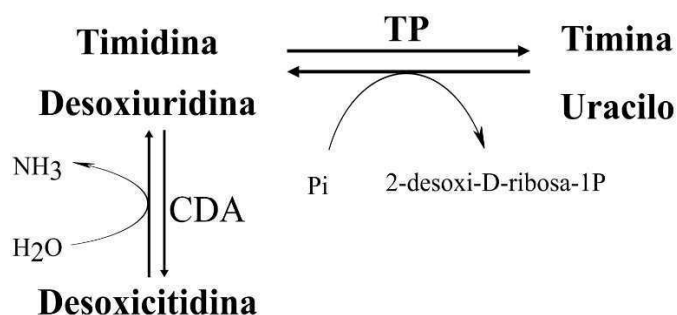
**Figura 2.1. Síntomas de MNGIE.** Los datos se basan en una cohorte formada por 102 pacientes (52 hombres y 50 mujeres) de entre 11 y 59 años de edad (edad media 32,4 años). Gráfico elaborado a partir de los datos de (1).

### 2.2.2. Causa genética del MNGIE.

El MNGIE está causado por mutaciones en el gen nuclear *TYMP* (anteriormente conocido como *ECGF1*)<sup>3,16</sup>. Este gen de 4333 pb se localiza en el brazo largo del cromosoma 22 humano (22q13.33) y está formado por 10 exones, de los cuales el primero no es codificante. Su expresión da lugar a la enzima timidina fosforilasa (TP, EC 2.4.2.4), también conocida como gliostatina o factor 1 de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF)<sup>17</sup>.

La TP es un homodímero citoplasmático formado por dos subunidades de 50 kDa obtenidas a partir de un péptido precursor de 482 aminoácidos. Aunque su expresión en humanos es bastante ubicua, el nivel de expresión varía entre los diferentes tejidos. Concretamente, encontramos un alto nivel de expresión en el tracto digestivo (esófago y recto), cerebro, hígado, páncreas, bazo, vejiga, plaquetas y nódulos linfáticos. Por el contrario, el nivel de expresión es indetectable en órganos como el riñón o el músculo esquelético, entre otros<sup>18-20</sup>.

La TP interviene en el metabolismo de nucleótidos, ya que cataliza el primer paso del catabolismo de los nucleósidos timidina (dThd) y desoxiuridina (dUrd). Concretamente, la reacción consiste en una fosforólisis reversible que da lugar a las bases nitrogenadas correspondientes, timina y uracilo, y 2-desoxi-D-ribosa-1-fosfato<sup>21</sup>. Además de esto, contribuye también a la degradación de la desoxicitidina (dCtd), que se transforma en dUrd vía desaminación por la enzima citidina deaminasa (CDA) (Figura 2.2). De forma paralela, la TP juega también un papel importante en el proceso de angiogénesis ya que la 2-desoxi-D-ribosa-1-fosfato resultante de la reacción actúa como agente quimioatrayente de las células endoteliales<sup>22,23</sup>. No obstante, no se ha encontrado ninguna evidencia en cuanto a reducción o disfunción de angiogénesis en los pacientes de MNGIE.



**Figura 2.2.** Reacción enzimática catalizada por la enzima timidina fosforilasa (TP). CDA, citidina deaminasa; Pi, fosfato inorgánico.

Hasta el momento se han descrito 90 mutaciones diferentes en el gen *TYMP* como causa directa de la enfermedad. Entre ellas encontramos 55 mutaciones puntuales que provocan un cambio de sentido o la aparición de un codón de terminación prematuro, 13 mutaciones de *splicing*, 13 deleciones y 9 inserciones (según datos de Human Gene Mutation Database a 12 de mayo de 2017)<sup>24</sup>. Debido al tipo de herencia, estas mutaciones se dan siempre en homocigosis o heterocigosis compuesta<sup>25-40</sup>.

En ocasiones, mutaciones en otros genes pueden dar lugar al desarrollo de un fenotipo similar al que presentan los pacientes de MNGIE (a excepción de la leucoencefalopatía). Estos pacientes se designan como "MNGIE-like" y presentan mutaciones en los genes nucleares *POLG* y *RRM2B* o en el gen mitocondrial *MTTV*, que codifica el ARN<sup>t</sup>Val. También se han asociado deleciones del mtADN a este tipo de síndromes<sup>41-47</sup>.

### 2.2.3. Metabolismo de nucleótidos.

Los nucleótidos, formados a partir de la fosforilación de nucleósidos en el carbono 5' de la pentosa, son las unidades monoméricas que forman los ácidos nucleicos. Según si derivan de ribonucleósidos (compuestos de una ribosa y una base nitrogenada) o de desoxiribonucleósidos (resultantes de la unión de la base nitrogenada a 2-desoxiribosa) forman parte del ARN o del ADN. Pueden presentarse en forma de mono-, di- o trifosfato y, dependiendo de la base nitrogenada, se clasifican en purínicos (adenina o guanina) o pirimidínicos (citosina, timina o uracilo) (Figura 2.3).

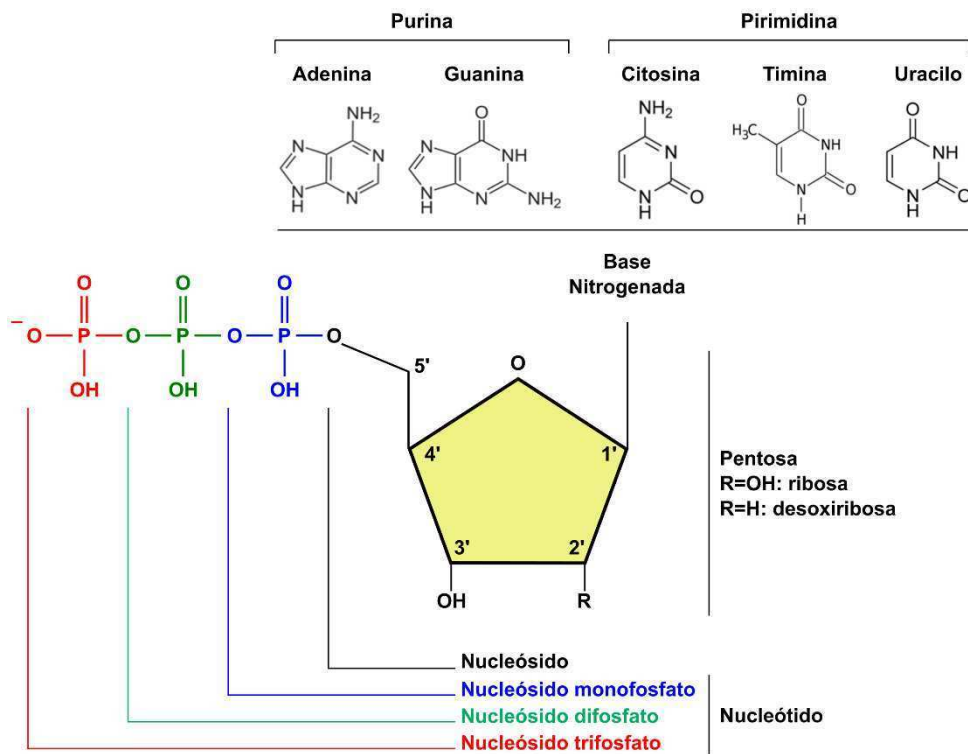


Figura 2.3. Estructura bioquímica de los diferentes elementos que componen un nucleótido.

La síntesis de nucleótidos puede producirse a través de dos vías: la **vía de síntesis de novo** o la **vía de salvamento**.

La **vía de novo** es dependiente de ciclo celular y, puesto que requiere del consumo de gran cantidad de energía, se da principalmente durante fases de división celular<sup>48</sup>. En función del tipo de base nitrogenada se necesitan unos u otros precursores<sup>49</sup>.

- Síntesis de purinas:

Requiere ATP, PRPP, glicina, glutamina, aspartato, dióxido de carbono y N<sup>10</sup>-formiltetrahidrofolato y produce IMP (inosina monofosfato) que posteriormente se transforma en AMP o GMP.

- Síntesis de pirimidinas:

Utiliza ATP, PRPP, glutamina, aspartato y dióxido de carbono y produce UMP, que se fosforila dando lugar a UDP y UTP. Finalmente, el UTP se convierte en CTP por adición de un grupo amino mediante la enzima CTP sintasa.

El producto resultante de la síntesis *de novo* es siempre un ribonucleósido monofosfato (NMP) que se fosforila por la acción de quinasas y da lugar a un ribonucleósido difosfato (NDP). Es en estos NDP



A diferencia del resto, los nucleótidos de timina existen únicamente en la forma desoxi- y se producen a partir de la metilación de dUMP mediante la enzima timidilato sintasa (TS). De esta forma se obtiene dTMP, que se convierte en dTDP y dTTP por la acción de quinasas. Para llevar a cabo la reacción de metilación, la TS consume tetrahidrofolato (THF) y genera dihidrofolato (DHF), que vuelve a convertirse en THF por acción de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR). En aquellas células en las que no existe una regeneración de THF se produce una síntesis defectiva de ADN que acaba provocando la muerte celular. Este hecho, sumado a la presencia exclusiva de dTTP en la molécula de ADN, hacen de la TS una diana terapéutica relevante para el tratamiento del cáncer, ya que permite el uso de inhibidores enzimáticos que provocan la muerte de células con elevada tasa de proliferación. De forma alternativa pueden usarse inhibidores de DHFR<sup>54</sup>.

La **vía de salvamento** recicla nucleósidos incorporados a través de la dieta o nucleósidos obtenidos a partir de la degradación intracelular de moléculas de ADN o ARN. Estos nucleósidos pueden ser fosforilados por quinasas específicas dando lugar a los correspondientes nucleósidos mono-, di- y trifosfato<sup>50</sup> (Figura 2.4). A diferencia de la *vía de novo*, la vía de salvamento es independiente de ciclo celular y resulta indispensable para la replicación del mtADN.

Los precursores necesarios para la producción de dNTPs mitocondriales pueden incorporarse a la mitocondria mediante diferentes mecanismos (difusión pasiva, difusión facilitada o transportadores específicos) y en diferentes formas (desoxiribonucleósidos, NDPs, dNMPs, dNDPs o dNTPs)<sup>48</sup>.

Los nucleósidos no reciclados culminan la vía catabólica y se degradan mediante la acción de fosforilasas que producen pentosas-1-fosfato y bases nitrogenadas que acaban generando ácido úrico, en el caso de las purinas, o  $\beta$ -alanina/ $\beta$ -isobutirato, amoníaco y dióxido de carbono, en el caso de las pirimidinas.

#### **2.2.4. MNGIE: enfermedad mitocondrial causada por acumulación de nucleósidos.**

En pacientes de MNGIE, la actividad TP representa menos del 10% de la actividad promedio en controles sanos. En consecuencia, las concentraciones de dThd y dUrd en plasma aumentan y se sitúan en torno a 2-25  $\mu\text{M}$ <sup>55,56</sup> (1-2  $\mu\text{M}$  en el caso de *late-onset* MNGIE<sup>7,8</sup>). Uno de los factores que contribuyen a la acumulación de nucleósidos en sangre es su reabsorción en los túbulos renales<sup>56</sup>. Por el contrario, la concentración de nucleósidos en plasma es indetectable ( $<0.05 \mu\text{M}$ ) en controles sanos o portadores heterocigotos que presentan una actividad que oscila entre el 30% y el 50%<sup>55</sup>. Estas características han permitido desarrollar un método diagnóstico sencillo, rápido y eficaz basado en la determinación de la concentración de nucleósidos en plasma mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y en la actividad enzimática de la fracción leucoplaquetar<sup>55</sup>.

Los nucleósidos son moléculas pequeñas y solubles que pasan del torrente circulatorio al interior de las células mediante transportadores concentrativos o equilibrativos<sup>57</sup>. En este aspecto es de especial importancia el transportador equilibrativo humano hENT1, presente en hígado, bazo, tejido adiposo, cerebro, colon y membrana mitocondrial interna<sup>58,59</sup>. En condiciones normales no patológicas, la acumulación de nucleósidos en tejidos con baja expresión de TP puede prevenirse gracias a la acción catabólica de otros tipos celulares con elevada actividad enzimática. Uno de los ejemplos más evidentes de este hecho es la afectación muscular típica de los pacientes de MNGIE. Tal y como se ha mencionado anteriormente, el músculo esquelético, cuya actividad TP es muy reducida en individuos sanos, es uno de los tejidos más afectados en MNGIE. Por este motivo se acepta que la manifestación

clínica asociada a mutaciones en *TYMP* no se debe a la falta de actividad sino a la toxicidad ocasionada por la acumulación de dThd y dUrd<sup>20</sup>.

El MNGIE forma parte de un grupo de enfermedades complejas y heterogéneas (tanto a nivel genético como fenotípico) denominados síndromes de depleción y delecciones del mtADN (MDDS). La mitocondria, cuya función principal es la de producción de energía, es el único orgánulo de células animales que presenta ADN propio, aparte del núcleo. En humanos, el mtADN es una molécula circular de doble cadena y 16569 pb que codifica 37 genes: 13 proteínas del sistema OXPHOS, 22 tARN y 2 rARN. No obstante, la mayoría de componentes mitocondriales, incluyendo proteínas del sistema OXPHOS y proteínas relacionadas con la replicación y el mantenimiento del mtADN, están codificados en el nADN. Por este motivo, la disfunción mitocondrial puede deberse tanto a defectos en el mtADN como a defectos en el nADN<sup>60</sup>.

Muchos de los MDDS están asociados a mutaciones en genes nucleares que codifican enzimas que intervienen en el metabolismo de dNTPs (*TYMP*, *TK2*, *DGUOK*, *RRM2B*)<sup>16,61-64</sup>. La correcta replicación del mtADN, así como la del nADN, requiere del mantenimiento del pool de dNTPs, el cual está regulado por las diferentes rutas anabólicas, por la tasa de incorporación de los dNTPs en el ADN y por los diferentes procesos catabólicos (mediados por 5' desoxiribonucleotidasas, dNTP trifosfohidrolasa (*SAMHD1*) y fosforilasas)<sup>65</sup>. La alteración de este pool afecta principalmente a la replicación del mtADN en tejidos postmitóticos en los que el pool citosólico está disminuido.

En el caso concreto del MNGIE, el exceso de dThd a nivel intracelular supone una expansión de los niveles de dTTP mitocondrial. De forma paralela, dado que la enzima TK2, encargada de la fosforilación de dThd para la obtención de dTMP, cataliza también la fosforilación de dCtd, se establece una inhibición competitiva que acaba provocando una disminución de la concentración de dCTP<sup>66-70</sup>. Así pues, se origina un desequilibrio del pool de dNTPs mitocondriales que interfiere con la correcta replicación del mtADN provocando depleción (disminución del número de moléculas de mtADN), delecciones múltiples y mutaciones puntuales somáticas. El tipo de mutación producida depende en gran parte del tejido o tipo celular afectado<sup>71-74</sup>.

Uno de los principales mecanismos que dan lugar a la generación de mutaciones puntuales es lo que se conoce como "*next-nucleotide effect*". Durante la replicación del mtADN es frecuente la incorporación errónea de dGTP en sustitución de dATP. No obstante, la polimerasa mitocondrial presenta actividad exonucleasa que permite detectar y reparar este tipo de errores. En el caso del MNGIE, la presencia de T precedidas de varias A en posición 5' (5'-AT, 5'-AAT, 5'-AAAT) hace que la polimerasa se acelere (debido a la elevada disponibilidad de dTTP) comprometiendo su actividad exonucleasa (que se inhibe también a elevadas concentraciones de dTMP) y permitiendo la fijación de transiciones T-C. Al margen de esto, pueden producirse también mutaciones puntuales debido a la incorporación errónea de dUTP. La fijación y acumulación de estas mutaciones se debe principalmente a la ausencia de un mecanismo efectivo de reparación mediante escisión de bases en la mitocondria<sup>74</sup>.

Los mecanismos propuestos para la generación de delecciones múltiples están relacionados con el proceso de replicación del mtADN y se basan en el apareamiento incorrecto de repeticiones con secuencia homóloga<sup>75</sup>. Al margen de esto, se cree que la estructura secundaria de la molécula de mtADN también contribuye a la producción de delecciones y se ha identificado la secuencia del gen *ND5* como punto altamente susceptible para la generación de estas aberraciones<sup>73</sup>.

Por último, por lo que refiere a la depleción, se cree que la deficiencia de dCTP podría impedir la replicación del mtADN<sup>73</sup>, tal y como ocurre en MDDS asociados a mutaciones en *TK2* o *DGUOK* en los que la ausencia de función de las quinasas mitocondriales provoca falta de algunos de los dNTPs mitocondriales e impide la replicación del mtADN<sup>76,77</sup>. También podría producirse como consecuencia de la generación de mutaciones puntuales, deleciones o ambas. La incorporación errónea de dUTP en la molécula de mtADN podría inducir a la degradación del mismo y provocar una disminución en el número de copias. Alternativamente, la acumulación de moléculas de mtADN con múltiples mutaciones puntuales o deleciones en la región *D-loop*, que contiene el origen de replicación del mtADN, provocaría la acumulación de moléculas sin capacidad replicativa y comportaría depleción del mtADN<sup>73</sup>.

La acumulación de cambios en el mtADN acaba provocando disfunción mitocondrial que afecta, principalmente, a aquellos órganos con mayor demanda energética y/o con alteraciones más importantes en el mtADN.

### 2.2.5. Modelo animal de MNGIE.

La generación de modelos animales resulta indispensable para el estudio y comprensión de los mecanismos fisiopatológicos de las diferentes enfermedades, así como también para el desarrollo de potenciales estrategias terapéuticas. Con este fin, Haraguchi y colaboradores, por un lado, y López y colaboradores por otro, generaron ratones “*knock-out*” (KO) para el gen murino *Tymp*, localizado en el cromosoma 15.

El ratón generado por Haraguchi y colaboradores presentó un aumento de la concentración de nucleósidos en plasma que fue de dos veces la de los animales “*wild-type*” (WT) y, a pesar de que la actividad TP fue prácticamente nula en hígado se vio que otros tejidos, como el intestino delgado, mantenían niveles altos de actividad<sup>78</sup>. De la misma forma, López y colaboradores observaron que en el ratón generado en su grupo se producía un aumento de la concentración de nucleósidos únicamente en pulmón y bazo<sup>68</sup>. Los ratones KO no presentaron rasgos fenotípicos clínicos característicos de los pacientes de MNGIE en ninguno de los dos casos.

A diferencia de lo que ocurre en humanos, el catabolismo de dThd y dUrd en ratones se lleva a cabo mediante la acción de dos enzimas: la TP y la uridina fosforilasa (UP)<sup>79</sup>, codificada por el gen *Upp1* y *Upp2*. Por esta razón ambos grupos decidieron cruzar su ratón con un ratón KO para el gen *Upp1* (UP murina mayoritaria) para generar animales doble KO *Tymp*<sup>-/-</sup>*Upp1*<sup>-/-</sup>. El modelo *Tymp*<sup>-/-</sup>*Upp1*<sup>-/-</sup> generado por Haraguchi y colaboradores carecía de actividad TP y los niveles de nucleósidos en plasma eran de hasta 5 veces los de animales WT. Aun así, al margen de la presencia de leucoencefalopatía y alteraciones ultraestructurales en las vainas de mielina en fibras axonales, no se observaron evidencias bioquímicas ni histológicas de disfunción mitocondrial en músculo esquelético, así como tampoco la presencia de ningún otro signo clínico característico de la enfermedad<sup>78</sup>. Por otro lado, el modelo *Tymp*<sup>-/-</sup>*Upp1*<sup>-/-</sup> generado por López y colaboradores carecía de actividad TP en todos los tejidos analizados a excepción del hígado, que mantenía un 17% de la actividad debido, probablemente, a la enzima UPP2. En consecuencia, los niveles de dThd y dUrd estaban aumentados entre 4 y 65 veces en los tejidos estudiados. Además, a diferencia del modelo previamente descrito, estos animales presentaban una afectación más evidente a nivel cerebral. Concretamente, se observó alteración del pool de dNTPs (aumento de dTTP y disminución de dCTP), depleción del mtADN, disminución de los

niveles de proteínas mitocondriales (ND6 y COXI), disfunción de los complejos I y IV de la cadena respiratoria y leucoencefalopatía vacuolar de materia blanca<sup>68</sup>.

Pese a que el último doble KO generado reproduce mejor la alteración bioquímica característica de los pacientes de MNGIE, no se ha observado desarrollo de los principales rasgos clínicos de la enfermedad en el modelo animal. Esto podría explicarse en parte por varios factores. El primero de ellos es que los ratones WT presentan valores de nucleósidos más elevados que los controles sanos humanos, cosa que hace que la diferencia de concentración de dThd y dUrd entre KO y WT sea mucho menor que entre pacientes de MNGIE y personas no afectas. Además, el hecho de que en pacientes de MNGIE los síntomas suelen aparecer durante la segunda década de vida sugiere que es necesario llegar a un umbral de acumulación de daño en el mtADN para que la enfermedad se manifieste clínicamente. En el caso de los ratones, la corta esperanza de vida de la especie (la cual se sitúa alrededor de 2 años) podría no ser suficiente para sobrepasar este umbral y limitaría la aparición de un fenotipo clínico más acusado.

En 2014, García-Díaz y colaboradores publicaron que la administración crónica de nucleósidos en animales doble KO *Tymp<sup>-/-</sup>Upp1<sup>-/-</sup>* logra acentuar algunos de los signos clínicos típicos de los pacientes de MNGIE. Concretamente, describieron que los animales sometidos a sobrecarga presentan una esperanza de vida más corta y disminución del peso y la fuerza muscular. Al margen de esto, los animales tratados también presentan reducción de la musculatura lisa, aumento de fibrosis y depleción del mtADN en el intestino delgado. A nivel cerebral se observa leucoencefalopatía de manera más clara<sup>80</sup>.

A pesar de la exacerbación del fenotipo clínico, se ha de tener en cuenta que el mantenimiento de animales con sobrecarga de nucleósidos supone un aumento importante del coste de mantenimiento de la colonia y que existen limitaciones importantes debido a que la mayor acentuación de los síntomas se da a edades muy avanzadas, lo cual limita el estudio de la fisiopatología de la enfermedad y el desarrollo de ciertas terapias.

#### 2.2.6. Aproximaciones terapéuticas.

Dado que las principales afectaciones producidas en los pacientes de MNGIE aparecen como consecuencia de los efectos tóxicos originados por el exceso constante de dThd y dUrd, las terapias desarrolladas para el tratamiento de la enfermedad tienen como objetivo reducir las concentraciones de nucleósidos hasta niveles normales no patogénicos. Con este fin se han desarrollado dos grupos principales de terapias, las centradas en la eliminación de los metabolitos tóxicos *per se* mediante diálisis y las centradas en el reemplazo de la enzima, ya sea de forma transitoria o permanente (*Tabla 2.1*)<sup>81</sup>.

Después de que se describiera la causa genética y bioquímica del MNGIE, la hemodiálisis fue propuesta como primera aproximación terapéutica para el tratamiento de la enfermedad. No obstante, y aunque la hemodiálisis reducía a la mitad las concentraciones de nucleósidos, el efecto resultó ser transitorio, ya que 3 horas más tarde volvían a recuperarse los valores iniciales<sup>56</sup>. Además, cabe destacar que en personas sanas las concentraciones de dThd y dUrd en plasma son prácticamente indetectables (<0.05 µM) y que esta estrategia únicamente conseguía una reducción parcial. En vista de estos resultados, posteriormente se propuso someter a los pacientes a diálisis intraperitoneal ambulatoria continuada (CAPD). Esta estrategia supuso una mejoría de los síntomas clínicos en dos pacientes tratados



mediante CAPD durante varios meses o años<sup>82,83</sup>. Concretamente, se produjo una atenuación de los síntomas gastrointestinales, recuperación de la menstruación y eliminación del entumecimiento en extremidades. Sin embargo, en ambos casos la reducción de la concentración de nucleósidos resultó ser moderada e incluso despreciable y el tratamiento dejó de ser efectivo después de 15 y 24 meses, respectivamente.

De forma alternativa, en nuestro grupo se propuso la infusión de plaquetas de donantes sanos como posible aproximación terapéutica, ya que éstas constituyen una fuente importante de actividad TP. Aunque se logró alcanzar niveles de actividad circulante lo suficientemente altos como para reducir la concentración de nucleósidos en sangre, los efectos resultaron ser transitorios también en este caso debido a la vida media de las plaquetas (<8 días)<sup>84</sup>. A pesar de no ser efectiva, esta estrategia aportó la prueba de concepto que permitió comprobar que la restitución enzimática de la actividad TP en sangre permitía reducir la concentración de nucleósidos hasta niveles indetectables. En 2008 se propuso una nueva estrategia basada en el uso de TP recombinante encapsulada *ex vivo* en eritrocitos obtenidos del propio paciente (EE-TP)<sup>85</sup>. Hasta el día de hoy tres pacientes han sido tratados con EE-TP<sup>85-87</sup>. En uno de ellos, tratado con infusiones mensuales, se han descrito mejorías a nivel motor y de sistema nervioso periférico y ganancia de peso. Sin embargo, no se logró reducir la concentración de nucleósidos circulantes por debajo de 5  $\mu\text{M}$ <sup>86</sup>. Así pues, aunque ésta podría resultar ser una buena estrategia para mejorar el estado clínico de los pacientes hasta que hubiera la posibilidad de trasplante, existen ciertas limitaciones como son la reducción sub-óptima de nucleósidos y la necesidad de realizar infusiones mensuales, hecho que supone que el coste económico resulte muy elevado.

En vista de los resultados obtenidos tras la infusión de plaquetas, Hirano y colaboradores propusieron el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (AHSCT) como potencial tratamiento para los pacientes de MNGIE. En 2006 se describieron por primera vez los resultados obtenidos en dos pacientes. En el primero de ellos las células no injertaron correctamente y murió 86 días después de la intervención como consecuencia del progreso de la enfermedad. En cambio, en el segundo, se logró restituir parcialmente la actividad TP en sangre y la concentración de nucleósidos disminuyó hasta niveles prácticamente indetectables<sup>88</sup>. Posteriormente, el tratamiento de una mayor cohorte de pacientes ha permitido comprobar que, en aquellos casos en los que el trasplante resulta exitoso, se produce una mejoría de la sintomatología clínica de los pacientes a largo plazo (ganancia de peso y atenuación de la afectación gastrointestinal y la neuropatía periférica)<sup>89</sup>. Aun así, y a pesar de que ésta ha resultado ser la única estrategia efectiva durante muchos años, el AHSCT presenta limitaciones importantes entre las que destacan, principalmente, la dificultad de encontrar donantes compatibles, el riesgo de rechazo del injerto y, en consecuencia, la toxicidad asociada al régimen de inmunosupresión necesario para evitarlo y la enfermedad del injerto contra el huésped. Además de esto, existen otros factores limitantes en el caso particular de los pacientes de MNGIE (como, por ejemplo, la necesidad de administración parenteral de fármacos debido a la disfunción gastrointestinal de los pacientes, el uso de fármacos que afectan a la función mitocondrial y, en general, el estado de salud crítico que presentan en el momento del tratamiento) que agravan los efectos adversos derivados de este tipo de intervenciones. En base a esto y a la elevada tasa de mortalidad observada (70%), resulta necesario realizar una selección cautelosa de los pacientes aptos para ser sometidos al trasplante<sup>90</sup>.

Recientemente se ha propuesto el trasplante ortotópico de hígado (OLT) como alternativa al AHST. Esta aproximación resulta *a priori* más segura que el AHST ya que la tasa de mortalidad asociada es menor (10%)<sup>91</sup> y no requiere régimen de acondicionamiento previo. Además, el hígado es una fuente importante de TP que de forma natural funciona como órgano detoxificador de gran cantidad de metabolitos endógenos y muchos pacientes presentan fallo hepático en estadios avanzados de la enfermedad<sup>92</sup>. Los datos publicados tras el tratamiento de los primeros pacientes sometidos a OLT muestran una reversión temprana y permanente del desbalance bioquímico y pequeñas mejorías a nivel neurológico, lo que convierte al OLT en una estrategia prometedora<sup>93,94</sup>. Aun así, no se debe olvidar que seguimos estando ante una estrategia agresiva, invasiva, con una tasa de mortalidad no despreciable y que está totalmente limitada por la disponibilidad de donantes compatibles.

A día de hoy se han propuesto también otras alternativas terapéuticas que se encuentran en fase de desarrollo a nivel preclínico y que no han sido testadas aún en la práctica clínica. Estas engloban la inhibición farmacológica de la reabsorción renal de dThd y dUrd<sup>56</sup>, la administración de dCtd y/o tetrahidrouridina (inhibidor del catabolismo de dCtd) con el fin de prevenir la depleción de dCTP<sup>95</sup>, el uso de nano-reactores poliméricos con TP de *E. Coli* encapsulada<sup>96,97</sup> y la terapia génica basada en el uso de vectores lentivirales<sup>98,99</sup> y vectores adeno-asociados<sup>100</sup>.

**Tabla 2.1. Terapias propuestas para el tratamiento del MNGIE.**

Tipo de terapia	Terapia	Pacientes publicados	Referencias
Aclaramiento de dNs	Hemodiálisis	2	56
	CAPD	2	82,83
	Inhibición de reabsorción renal de dNs	-	56
Reemplazo enzimático	Infusión de plaquetas	3	84
	EE-TP	3	85-87
	AHST	24	88-90,101
	OLT	2	92-94
	Nanoreactores con TP	-	96,97
	Terapia génica	-	98-100
Refuerzo de sustrato	Administración dCtd	-	67,95

*dNs, desoriboxinucleósidos; CAPD, diálisis intraperitoneal ambulatoria continuada; EE-TP, eritrocitos con timidina fosforilasa recombinante encapsulada; AHST, trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas; OLT, trasplante ortotópico de hígado; TP, timidina fosforilasa; dCtd, desoxicitidina.*

## 2.3. Terapia génica.

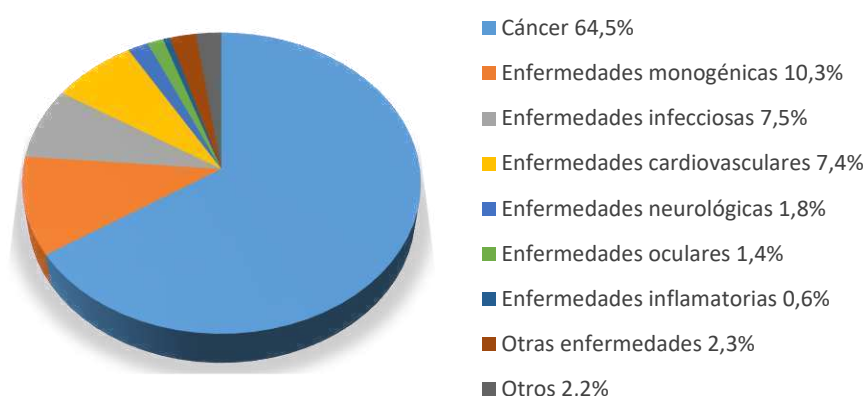
### 2.3.1. Introducción a la terapia génica.

La terapia génica se define como la introducción de material genético en células del paciente con el fin de tratar enfermedades heredadas o adquiridas mediante una ganancia o pérdida de función génica.

El primer ensayo basado en la transferencia génica en humanos fue realizado en 1990 por Rosenberg y colaboradores, quienes demostraron que el aislamiento y marcaje de linfocitos T infiltrantes de tumores no impedía la supervivencia de éstos tras ser reinfundidos nuevamente en pacientes metastásicos<sup>102</sup>. Ese mismo año Michael R. Blaese lideró el primer ensayo clínico de terapia génica, que permitió el tratamiento de dos niños afectados de inmunodeficiencia combinada severa debida a

déficit en adenosina deaminasa (ADA-SCID) mediante reinfusión de linfocitos T modificados *ex vivo*<sup>103</sup>. Cinco años más tarde, se aprobó un nuevo ensayo clínico en Europa que incluía una mayor cohorte de pacientes con ADA-SCID y, a partir de ahí, se iniciaron un gran número de ensayos de terapia génica para el tratamiento de otras enfermedades en todo el mundo<sup>104</sup>.

Aunque los primeros usos de terapia génica se hicieron en pacientes con enfermedades hereditarias monogénicas, los ensayos clínicos en cáncer son los más abundantes actualmente (*Figura 2.5*). De hecho, en 2003 se aprobó en China el primer fármaco fruto de la terapia génica para el tratamiento de pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Gendicine™). Desde ese momento se han desarrollado otros productos (Oncorine™, Cerepro®) y finalmente, en el año 2012, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) aprobó el primer producto de terapia génica en el mundo Occidental (Glybera)<sup>105</sup>.



*Figura 2.5. Resumen de las indicaciones de ensayos clínicos en terapia génica. Datos actualizados en agosto de 2016<sup>104</sup>.*

A pesar de que existen varios ejemplos en los que el uso de la terapia génica ha permitido obtener un efecto terapéutico a largo plazo, la eficiencia clínica puede verse limitada por uno o varios de los siguientes factores: silenciamiento génico debido a metilaciones en la secuencia promotora, genotoxicidad asociada a mutagénesis insercional, citotoxicidad debida a la sobreexpresión ectópica del transgén o inmunotoxicidad causada por el vector utilizado o por el producto del gen terapéutico<sup>106</sup>.

### 2.3.2. Métodos de transferencia génica.

Los métodos de transferencia génica dependen del tipo de vector empleado con el fin de introducir el material genético de interés en una determinada célula, tejido u órgano diana. No existe un vector óptimo, ya que el uso de un tipo de vector concreto viene determinado, en cada caso, por varios factores entre los que destacan las características de las células que se desean modificar, la duración de la expresión génica y el tamaño del material genético que ha de incorporarse en el vector<sup>107</sup>. En base a esto, se distinguen dos tipos principales de métodos de transferencia: transfección, cuando se utilizan vectores no virales, y transducción, cuando se emplean vectores virales para llevar a cabo la infección de la célula huésped.

### 2.3.2.1. Vectores no virales.

Los vectores no virales se basan en el uso de plásmidos u oligonucleótidos (tanto de ADN como de ARN) que se administran mediante diferentes métodos físicos (inyección local, balística, electroporación, sonoporación, etc.), químicos (partículas inorgánicas o vectores lipídicos, peptídicos o poliméricos) o biológicos (bacterias, bacteriófagos, partículas derivadas de virus, eritrocitos fantasma o exosomas)<sup>107,108</sup>.

Por lo general, son menos eficientes desde el punto de vista de transferencia génica que los vectores virales ya que, además de ser más susceptibles a las diferentes barreras celulares (acción de endonucleasas y macrófagos, degradación lisosomal y establecimiento de interacciones inespecíficas), dan lugar a una expresión transitoria del transgén. No obstante, también presentan características ventajosas entre las que se incluyen la baja inmunogenicidad y citotoxicidad, la facilidad y el bajo coste del proceso de producción y la capacidad para transferir material genético de gran tamaño<sup>109</sup>.

Aunque su uso está aún muy por debajo al de los vectores virales, los avances realizados en el desarrollo de nuevos métodos de transferencia han permitido un aumento en el número de ensayos clínicos basados en el uso de este tipo de vectores<sup>110</sup>.

### 2.3.2.2. Vectores virales.

Se basan en el uso de virus modificados que carecen de los genes involucrados en patogenicidad, pero mantienen la capacidad de transferir material genético a un determinado tipo celular. Aunque pueden dar lugar a problemas inmunes y citotóxicos, son mucho más eficientes que los vectores no virales.

El uso de este tipo de vectores ha resultado ser muy exitoso en numerosos ensayos clínicos, tanto a nivel de seguridad como de eficiencia de transferencia génica, gracias al constante avance en el campo de la ingeniería de vectores, que ha permitido el desarrollo de vectores de última generación capaces de evadir la inmunidad preexistente, de asegurar una mayor eficiencia de transducción de las células diana y un tropismo específico dirigido y de mantener la expresión del transgén introducido a largo plazo<sup>111</sup>.

#### 2.3.2.2.1. Adenovirus.

Los adenovirus (Ad) son virus de ADN de doble cadena, capaces de infectar tanto células en división como células quiescentes, que carecen de capacidad integrativa y se mantienen como episomas en el interior de la célula huésped. Presentan un genoma de entre 34 y 43 kb que contiene 8 unidades transcripcionales que se expresan en diferentes momentos del ciclo viral (se dividen en expresión temprana (E1, E2, E3, E4 y E5), expresión intermedia (IX y IVa2) y expresión tardía (L1, L2, L3, L4 y L5)). Hasta el momento, se han hallado un gran número de serotipos patogénicos capaces de infectar la especie humana de forma natural, por lo que es frecuente encontrar anticuerpos preexistentes en gran parte de la población<sup>112</sup>.

Los Ad han sido los vectores más utilizados en ensayos clínicos de terapia génica (21.4%, n=532)<sup>113</sup> debido a su elevada tasa de transducción, a su facilidad de producción y a su gran capacidad de empaquetamiento. No obstante, pese a que se han desarrollado vectores que eliminan la totalidad de los genes víricos, conocidos como “gutless”, las partículas víricas *per se* provocan reacciones inflamatorias importantes que pueden llegar a provocar la muerte del paciente<sup>114-116</sup>.

#### 2.3.2.2.2. Retrovirus y lentivirus.

Los retrovirus son pequeños virus con envuelta que, a diferencia del resto de vectores, pueden integrarse en el genoma de la célula huésped dando lugar a la expresión del transgén terapéutico a largo plazo. Su genoma está compuesto por dos cadenas sencillas de ARN de entre 8 y 12 kb que pueden codificar únicamente proteínas imprescindibles (retrovirus simples) o también proteínas reguladoras (retrovirus complejos)<sup>111</sup>.

De entre ellos, los más utilizados en estudios de terapia génica son los lentivirus (LV), un subgrupo de retrovirus complejos que, a diferencia del resto, son capaces de infectar células en estado de quiescencia. Esto, sumado a las múltiples opciones de pseudotipado, permite aumentar ampliamente el tropismo de estos vectores. Dado que derivan de patógenos humanos (comúnmente del VIH) resulta necesario asegurar la eliminación de los genes víricos. Debido a la capacidad de integración en el genoma celular, el uso de este tipo de vectores se ha relacionado con el desarrollo de procesos oncogénicos<sup>117</sup>. Con el fin de reducir al máximo la genotoxicidad, se han diseñado vectores de tercera generación, conocidos como “SIN” (del inglés “*self-inactivating*”) pero, aun así, la preferencia de integración de estos vectores en regiones promotoras o en genes relacionados con cáncer y factores de crecimiento, puede aumentar la probabilidad de activación oncogénica. No obstante, el uso de vectores lentivirales tanto *ex vivo* como *in vivo* representa hoy en día el 5.8% del total de ensayos clínicos en terapia génica (n=144)<sup>113</sup>.

#### 2.3.2.2.3. Herpesvirus.

Los herpesvirus (HSV) son virus con envuelta cuyo genoma consiste en una molécula de ADN de doble cadena de 150 kb que codifica para unos 90 genes, de los cuales la mitad son prescindibles y pueden eliminarse en vectores recombinantes. En función de los genes eliminados, encontramos tres tipos diferentes de HSV con aplicación terapéutica. Aunque presentan una elevada tasa de transducción, la expresión del transgén es transitoria y de corta duración. Esto limita su uso en el tratamiento de enfermedades monogénicas y los hacen especialmente aptos como herramientas para el desarrollo de terapias oncolíticas o vacunas<sup>118</sup>.

#### 2.3.2.2.4. Vacciniavirus.

Pertenecen a la familia de los *Poxvirus* y contienen un genoma de ADN de doble cadena de unas 200 kb. Los vectores basados en este tipo de virus presentan una capacidad de clonación de hasta 25 kb y, debido a su capacidad de replicación selectiva en células con elevada tasa de proliferación, son especialmente aptos para el tratamiento de tumores<sup>111</sup>. De hecho, se han realizado numerosos ensayos clínicos basados en el uso de vacciniavirus codificantes para el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) que han permitido el tratamiento simultáneo de ambos, tumor primario y metástasis, mediante administración intravenosa<sup>119</sup>.

#### 2.3.2.2.5. Virus adeno-asociados.

Los virus adeno-asociados (AAV) son pequeños virus pertenecientes a la familia *Parvoviridae*, concretamente al género *Dependovirus*, ya que dependen de la coinfección de otro virus, denominado virus “*helper*”, para su replicación. En un primer momento, los AAV fueron descubiertos en el laboratorio como partículas contaminantes en preparaciones de Ad pero poco después fueron también identificados en gran variedad de tejidos humanos<sup>120</sup>. De hecho, estudios epidemiológicos revelan que

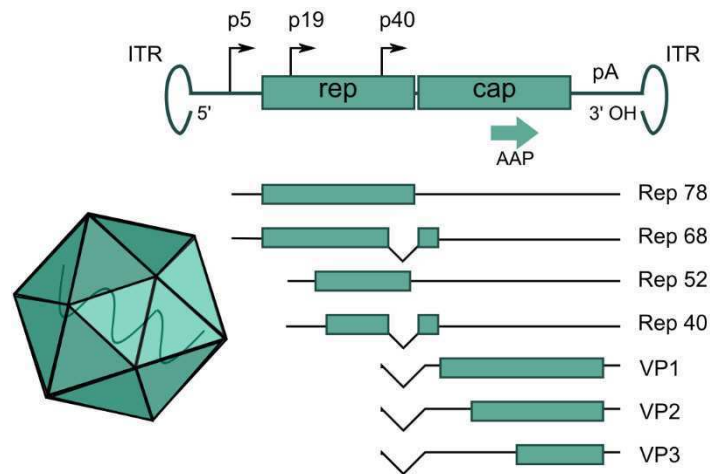
entre el 30% y el 80% de la población adulta presenta anticuerpos anti AAV en suero (siendo las infecciones con el serotipo 2 la más frecuentes con una seroprevalencia del 72%)<sup>121</sup>. No obstante, el hecho de que las infecciones por AAV no se hayan asociado al desarrollo de patologías humanas han convertido a estos virus en herramientas prometedoras para la transferencia génica en humanos.

### I. Características moleculares de los AAV.

Las partículas víricas de AAV se componen de dos elementos principales: **el genoma**, formado por una única molécula de ADN de cadena sencilla (ssADN) de 4.7 kb, y **la cápside**, estructura proteica e icosaédrica de 20-25 nm de diámetro que determina el tropismo del virus.

#### - Estructura genómica de los AAV.

El genoma de los AAV consta de 4679 pb que codifican tres elementos principales: los **ITRs** (del inglés “*inverted terminal repeats*”) y los genes **rep** y **cap**<sup>122</sup> (Figura 2.6).



**Figura 2.6. Estructura genómica del AAV2.** ITR, *inverted terminal repeat*; AAP, *proteína activadora del ensamblaje*; pA, *señal de poliadenilación*.

Los **ITR** son repeticiones terminales invertidas de 145 pb que actúan como origen de replicación y señal de encapsidación para el genoma vírico. Además de esto, intervienen también en procesos de integración del virus en el genoma de la célula hospedadora y se cree que podrían jugar un papel importante en la prevención del silenciamiento y eliminación del ADN vírico<sup>123</sup>.

El gen **rep** codifica 4 proteínas no estructurales (Rep 78, Rep 68, Rep 52 y Rep 40) que se transcriben a partir de dos promotores, p5 y p19. Concretamente, p5 da lugar a Rep 78 y Rep 68, variantes de *splicing* que juegan un papel importante en los procesos de replicación, transcripción e integración del genoma vírico. Las proteínas Rep 52 y Rep 40, transcritas a partir de p19, intervienen en el proceso de empaquetamiento del ADN en la cápside vírica<sup>124</sup>.

Por otro lado, el gen **cap** se transcribe a partir del promotor p40 dando lugar a una única molécula de ARN mensajero de 2.3 kb que, mediante un mecanismo de *splicing* alternativo, resulta en la producción de tres proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3, que conforman la cápside vírica<sup>120</sup>.

Al margen de los tres elementos principales, se ha descrito también la presencia de un segundo ORF dentro del gen **cap** que da lugar a una proteína activadora del proceso de ensamblaje (AAP) que

interviene en el transporte de las proteínas VP dentro del núcleo celular y en el ensamblaje de las mismas durante el proceso de formación de la cápside<sup>125,126</sup>. No obstante, ciertos serotipos (4,5 y 11) pueden prescindir de la acción de esta proteína<sup>127</sup>.

#### - Características de la cápside vírica.

La cápside vírica típica de un AAV consta de 60 unidades de las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 en una relación 1:1:10. No obstante, se ha descrito la existencia de viriones que presentan variaciones en cuanto a la proporción de cada proteína. De hecho, se han encontrado cápsides formadas íntegramente por VP3, o por la combinación VP3-VP1 o VP3-VP2. La variación en el número de subunidades que conforman la cápside repercute en la capacidad infectiva del virus, especialmente en aquellos casos en los que la presencia de VP1 se ve disminuida. Concretamente, mientras que mutaciones en VP2 o VP3 evitan el ensamblaje de la cápside y previenen la acumulación de ssADN, defectos en VP1 provocan la acumulación de ambos, cápsides y ADN, generando acumulación de partículas víricas no infectivas<sup>120,122</sup>.

Además de variaciones en la ratio de las diferentes subunidades que conforman la cápside, las proteínas estructurales de los AAV presentan regiones hipervariables que acumulan diferentes modificaciones. Esta heterogeneidad da lugar a la existencia de diferentes serotipos que determinan el tropismo del virus. En relación a esto, el desarrollo de los AAV como vectores de transferencia génica ha permitido la generación de un sinfín de cápsides recombinantes con el fin de mejorar la capacidad de transducción, modificar el tropismo de un determinado serotipo o evitar el bloqueo mediado por la presencia de anticuerpos neutralizantes (nAbs) preexistentes, entre otros.

## II. Ciclo viral de los AAV.

Los AAV son virus deficientes en replicación cuya infección en condiciones salvajes está totalmente limitada por la coinfección de un virus *helper* (generalmente un Ad o un HSV). En ausencia de éste, el AAV queda en estado de latencia. No obstante, antes de llegar al proceso de replicación, el virus ha de conseguir sobrepasar varias barreras que limitan la transducción. A continuación, se describen las diferentes fases que conforman el ciclo viral de los AAV.

#### - Interacción del AAV con la célula huésped.

Los AAV infectan tanto células en división como células quiescentes a través de la unión a diferentes receptores y correceptores de membrana. El tipo de receptor utilizado varía en función de los diferentes serotipos y determina el tropismo preferente de cada AAV (*Tabla 2.2*)<sup>128</sup>. No obstante, recientemente se ha identificado un receptor común involucrado en la infección por AAV, el cual está codificado por el gen *KIAA0319L* y es conocido como AAVR. Aunque se desconoce si la interacción entre el AAVR y el AAV se da a nivel de superficie celular o en procesos más tardíos involucrados en el tráfico intracelular, se ha podido comprobar que la ausencia de este receptor bloquea la infección de los serotipos AAV1, 2, 3B, 5, 6, 8 y 9, tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>129,130</sup>.

Tabla 2.2. Principales receptores y correceptores celulares según serotipo<sup>128</sup>.

Serotipo	Receptores	Correceptores
AAV1	Ácido siálico en enlace N-glucosídico	-
AAV2	HSPG	Integrina $\alpha_v\beta_5$ , FGFR1, HGFR, LamR, Tetraspanina CD9
AAV3	HSPG	HGFR, FGFR1, LamR
AAV4	Ácido siálico en enlace O-glucosídico	-
AAV5	Ácido siálico en enlace N-glucosídico	PDGFR
AAV6	Ácido siálico en enlace N-glucosídico, HSPG	EGFR
AAV8	-	LamR
AAV9	Galactosa terminal en enlace N-glucosídico	LamR

HSPG, Heparan sulfato proteoglicanos; FGFR1, Receptor 1 de factor de crecimiento de fibroblastos; HGFR, Receptor de factor de crecimiento de hepatocitos humanos; LamR, Receptor de laminina; PDGFR, Receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas; EGFR, Receptor de factor de crecimiento epidérmico.

#### - Endocitosis, tráfico intracelular e importación al núcleo.

La internalización de los AAV en la célula hospedadora se produce por endocitosis. Por lo general, este proceso ocurre de forma rápida y eficiente a través de diferentes mecanismos y un mismo serotipo puede ser internalizado por diferentes vías. Concretamente, el AAV puede seguir una vía infectiva que culmina en la liberación del virión al interior del núcleo de la célula hospedadora, o una vía no infectiva que culmina con la degradación del virión en lisosomas o proteosomas<sup>128</sup>.

Una vez formado el endosoma, el tráfico intracelular es lento e ineficiente y se da mediante transporte retrógrado al aparato de Golgi, dónde se produce, principalmente, la liberación del virión al citoplasma. Para que esta liberación sea exitosa, es necesario la producción de un cambio conformacional en las proteínas de la cápside VP1 y VP2. Este cambio conformacional permite, además, la exposición de la señal de localización nuclear situada en la región N-terminal de ambas proteínas<sup>131-133</sup>. Una vez expuesta, la señal nuclear interacciona con proteínas de la familia de las importinas y da lugar a la formación de un poro nuclear que permite la importación del virión al núcleo de la célula hospedadora<sup>128</sup>.

Dentro del núcleo tiene lugar el desensamble de la cápside, que puede ser más o menos rápido en función del serotipo y el tipo celular infectado. Aunque se desconocen exactamente los detalles de este proceso, se cree que no es necesario un desensamble total para la liberación del ADN vírico<sup>128</sup>.

#### - Replicación o latencia.

Tras la liberación del ADN vírico se inicia el proceso de replicación, que puede dividirse en 3 fases. Durante la primera fase, tiene lugar la expresión de los genes del virus *helper* y la formación de moléculas replicativas de AAV, que utilizan las proteínas de replicación del *helper* y el extremo 3'OH de los ITRs como origen de replicación. De esta forma se generan moléculas de ADN de doble cadena



que se extienden a lo largo del ADN molde desplazando el ITR situado en posición 5'. Durante la segunda fase de replicación, tiene lugar la expresión de las proteínas víricas y se produce una gran amplificación del número de moléculas replicativas en forma de monómeros o concatámeros (Figura 2.7). Durante la tercera y última fase, las proteínas Rep 52 y Rep 40 interaccionan con las proteínas de la cápside y permiten el empaquetamiento del ADN, lo cual da lugar a la acumulación de partículas víricas infectivas que se liberan al medio extracelular provocando la lisis de la célula hospedadora<sup>120,134</sup>.

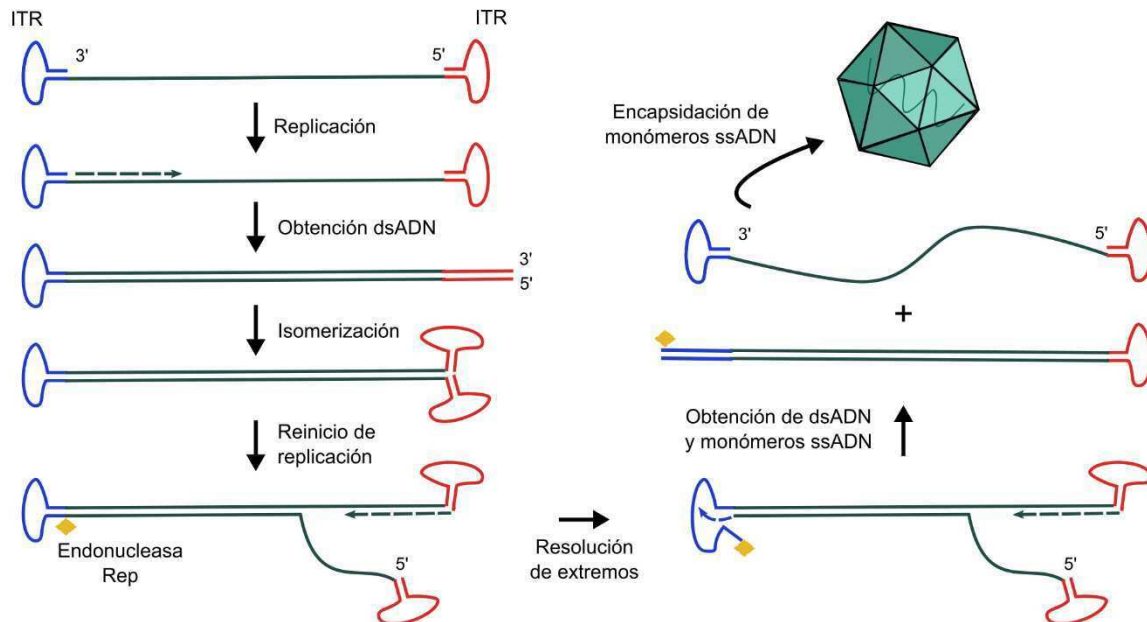


Figura 2.7. Representación esquemática del proceso de replicación de un AAV salvaje.

Cuando la infección se da en células que no han sido coinfectadas por un virus *helper*, los AAV entran en fase de latencia. Durante este período, las moléculas genómicas se unen formando concatámeros en orientación cabeza-cola (ITR3'-ITR5') y se mantienen como episomas en el interior de la célula hospedadora. Aunque en baja proporción, los AAV pueden también integrarse en el genoma celular. Este proceso de integración depende de las proteínas Rep 78 y Rep 68 propias del virus que pueden expresarse, aún en ausencia de *helper*, utilizando la maquinaria de replicación propia de la célula. Los eventos de integración se dan principalmente en la región AAVS1 del cromosoma 19 humano (19q13.4)<sup>135</sup>. De forma muy esporádica puede producirse integración por recombinación homóloga<sup>120</sup>. Estudios recientes han demostrado que la persistencia de los AAVs en humanos se produce principalmente en linfocitos T y que una posterior infección con el virus *helper* puede reactivar la fase de replicación<sup>136</sup>.

A diferencia de lo que ocurre en AAV salvajes, en los vectores recombinantes utilizados como herramientas de transferencia génica, únicamente se mantiene la región del genoma vírico que codifica las regiones ITR<sup>122</sup>. Así pues, dada la ausencia de las secuencias *rep* y *cap*, no es posible culminar la fase de replicación. En estos casos, la expresión de los genes introducidos depende fundamentalmente del estado fisiológico de la célula hospedadora, ya que se precisa de la maquinaria de replicación de ésta para sintetizar la doble cadena de ADN. Alternativamente, dado que los AAV encapsidan con igual eficiencia cadenas positivas y negativas de ssADN, es posible la formación de dsADN mediante reanillamiento de hebras procedentes de diferentes viriones. No obstante, este fenómeno depende en gran parte de la dosis administrada y de la tasa de transducción<sup>134</sup>.

### III. Serotipos y tropismo.

Hasta el momento se han descrito hasta 13 serotipos naturales distintos y más de 100 variantes de AAV obtenidos de diferentes especies que difieren, los unos de los otros, en la secuencia aminoacídica de las regiones hipervariables localizadas en las proteínas de la cápside<sup>137,138</sup>. Estas diferencias determinan el tropismo del virus, que se define como la afinidad que éste presenta para unirse, de forma más o menos específica, a un tejido particular del organismo hospedador<sup>106</sup>. De acuerdo con esto, se han realizado numerosos estudios preclínicos y clínicos con el fin de determinar el tropismo de los diferentes serotipos *in vivo* (Tabla 2.3) el cual depende, principalmente, de la expresión de ciertos receptores y correceptores en las superficies tisulares de los diferentes órganos diana. No obstante, la modificación de la secuencia peptídica en la cápside vírica determina, no sólo la unión al receptor sino también el mecanismo de tráfico intracelular del virus, la habilidad de éste para escapar de la vía endosomal, el desensamble de la cápside y la translocación al interior del núcleo de la célula huésped.

**Tabla 2.3. Serotipos más utilizados en diferentes especies según el tropismo deseado**<sup>106,137-139</sup>.

Tejido	Ratón	Perro	PNH	Humanos
<b>Hígado</b>	AAV2		AAV2	
	AAV5	AAV2	AAV3	AAV2
	AAV7	AAV6	AAV5	AAV5
	AAV8	AAV9	AAV7	AAV8
	AAV9		AAV8	
<b>Cerebro</b>	AAV1	AAV2	AAV2	
	AAV2	AAV8	AAV9	AAV2
	AAV4	AAV9	AAVrh10	AAVrh10
	AAV5	AAVrh10	AAVrh10	
	AAV9			
<b>Músculo</b>	AAV1	AAV1	AAV1	
	AAV2	AAV2	AAV6	AAV1
	AAV6	AAV6	AAV8	AAV2
	AAV8	AAV8	AAV9	AAV9
	AAV9	AAV9		
<b>Ojo</b>	AAV2	AAV2	AAV2	
	AAV4	AAV8	AAV8	AAV2
	AAV5			
<b>Pulmón</b>	AAV2			
	AAV4	AAV6	AAV2	AAV2
	AAV6		AAV6	
	AAV9			
<b>Corazón</b>	AAV6	AAV8	AAV8	AAV1
	AAV8	AAV9	AAV9	AAV6
	AAV9			

PNH, *Primates no humanos*.

Existen otros factores importantes que influyen en la capacidad del virus para transducir preferentemente un tipo celular concreto entre los que destacan, principalmente, la vía de administración y la dosis utilizada. La especie, el sexo, la presencia de nAbs e, incluso, el método de producción empleado para la obtención de preparaciones víricas<sup>140</sup>, son también variables de gran

influencia a la hora de determinar la tasa de transducción. Así pues, debido al gran número de factores implicados, resulta realmente difícil definir cuál es el mejor serotipo en cada caso y extrapolar las condiciones establecidas en estudios preclínicos a posteriores ensayos clínicos en humanos.

- Elección de serotipo AAV8 e hígado como tejido diana.

El hígado es un órgano fundamental en el metabolismo humano dado su importante función en la síntesis y degradación de proteínas y en la detoxificación de metabolitos. Además, presenta características que lo hacen especialmente apto para el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en AAVs.

Una de las propiedades a destacar es la elevada tasa de transducción que presentan los hepatocitos en comparación con otros tipos celulares. Este hecho se debe principalmente a dos factores: la proporción de volumen sanguíneo total contenido en el hígado (entre el 10% y el 15%) y la presencia de un epitelio fenestrado localizado a lo largo de los sinusoides hepáticos. Estas dos características favorecen, por un lado, la acumulación de gran cantidad de partículas víricas en este órgano tras una inyección intravenosa de las mismas y, por otro, el paso directo de los AAVs desde el torrente circulatorio hasta el interior de los hepatocitos<sup>141</sup>.

Otra de las características destacables del hígado es la baja tasa de regeneración de los hepatocitos maduros en condiciones normales que, por lo general, presentan una vida media de entre 200-300 días<sup>141</sup>. Gracias a esto, el efecto de dilución de las células transducidas con AAVs es mínimo en este órgano.

El hígado es también una diana favorable desde el punto de vista inmunológico, ya que juega un papel fundamental en la inducción de tolerancia mediada por células T reguladoras frente a determinados antígenos. Además de éstas, las células de Kupffer y las células endoteliales de los sinusoides hepáticos también contribuyen a inducción de tolerancia mediante la secreción de factores inmunomoduladores como son, por ejemplo, el óxido nítrico o la IL-10<sup>142,143</sup>.

Al margen de las ventajas que hacen del hígado una buena diana terapéutica, existe también cierta discusión en torno al uso de estrategias basadas en AAVs dirigidas a este órgano que se centran, principalmente, en dos aspectos fundamentales: los problemas inmunitarios resultantes de la necesidad de readministración del vector a largo plazo debido a la dilución del efecto del transgén introducido y el riesgo de desarrollo de carcinoma hepatocelular (HCC), el cual se ha convertido recientemente en uno de los principales temas de debate entre los miembros que conforman la comunidad científica de terapia génica.

La primera relación entre HCC y AAVs fue descrita en 2001 por Donsante y colaboradores<sup>144</sup>. En el estudio realizado se observó un aumento de la incidencia de HCC en ratones tratados con AAV. Además, 2 de los 4 procesos de integración detectados se dieron en el gen *MIR341*<sup>145</sup> que, a pesar de no presentar ortólogos humanos, está localizado en el locus de *Rian*, un locus asociado a un peor pronóstico en pacientes con HCC<sup>146</sup>. Estas mismas observaciones han sido corroboradas posteriormente en diferentes ensayos preclínicos<sup>147-152</sup>. No obstante, se ha comprobado que el desarrollo de HCC depende de varios factores entre los que destaca la dosis utilizada, la edad del ratón en el momento de realizar la administración y la combinación de ciertas secuencias promotoras<sup>152</sup>.

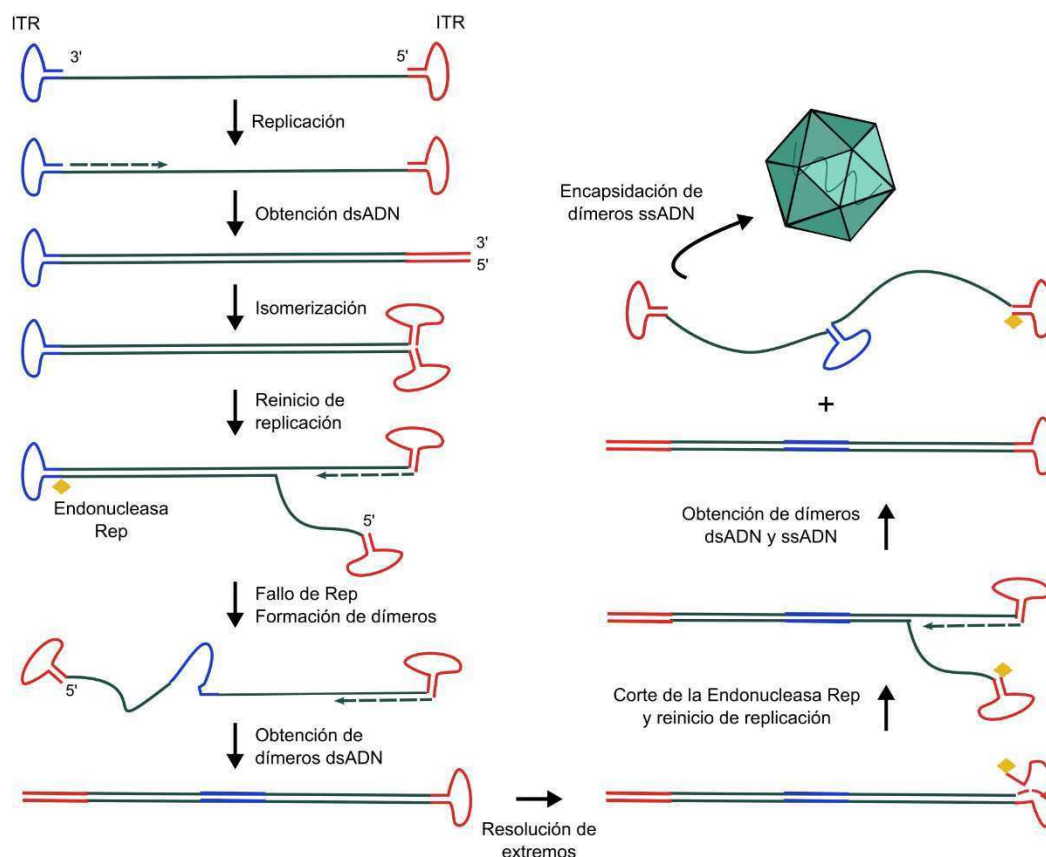
En cuanto al riesgo de HCC en humanos como consecuencia de una infección por AAV, un estudio publicado en el año 2015 relacionó la infección por AAV2 salvaje con un aumento en la incidencia de HCC<sup>153</sup>. A diferencia de lo observado hasta el momento en estudios preclínicos en ratones, no se detectaron integraciones en el locus de *Rian*. De hecho, se asoció el aumento en la tasa de HCC a procesos de mutagénesis insercional causantes de la desregulación de genes relacionados con procesos oncogénicos. No obstante, sólo el 5.7% de los casos de HCC estudiados mostraron la presencia del genoma del virus y, de entre estos, sólo el 18.2% carecía de ninguna otra evidencia clara causante de mutagénesis. A pesar de estos resultados y del desconocimiento real del riesgo de HCC asociado a la infección por AAVs, no se han detectado efectos genotóxicos en los más de 170 ensayos clínicos realizados basados en el uso de AAVs recombinantes. Es importante destacar que los vectores de transferencia génica utilizados con fin terapéutico no cuentan con la secuencia correspondiente al gen *rep* y que, por lo tanto, el riesgo de integración es menor que en el caso de los virus salvajes.

En cuanto a la elección del serotipo para el desarrollo de aproximaciones terapéuticas basadas en el uso de la terapia génica dirigida al tejido hepático, el AAV8, descubierto en el año 2002 en el mono *Rhesus*, ha demostrado ser una buena opción. Algunas de las características que hacen al AAV8 especialmente recomendable para este uso son: la elevada tasa de transducción de los hepatocitos mediante administración intravenosa periférica, la presencia de una baja proporción de anticuerpos anti-AAV8 en la especie humana (38%)<sup>121</sup> y las características de su proceso de producción, que da lugar a preparaciones de elevada concentración vírica<sup>141</sup>. Al margen de esto, su uso en ensayos clínicos recientes realizados en pacientes con hemofilia B ha resultado ser muy exitoso, ya que además de ser efectivo desde el punto de vista terapéutico, los efectos adversos observados han sido mínimos y fácilmente controlables<sup>154</sup>.

#### IV. AAV con genoma autocomplementario.

Los AAV autocomplementarios, conocidos generalmente como scAAV (del inglés “*self-complementary AAV*”) o dsAAV (del inglés “*double-stranded AAV*”), presentan un genoma que consiste en una única molécula de ADN de cadena sencilla formada por dímeros repetidos invertidos separados por una región ITR. Esta característica permite al virus prescindir de la maquinaria de replicación de la célula infectada para la formación de dsADN ya que, una vez liberado el ADN vírico en el interior del núcleo celular, el ITR central inicia un proceso de anillamiento que permite la unión de ambas partes del genoma por complementariedad de bases<sup>134</sup>.

La generación de este tipo de virus se produce de forma espontánea durante la fase de replicación debido a mutaciones en las regiones ITR. Cuando una de éstas es defectiva, las endonucleasas Rep 78 y Rep 68 son incapaces de producir el corte en el punto de resolución terminal y, en consecuencia, se forma un dímero invertido separado por una secuencia ITR mutada que contiene, en cada uno de los extremos, dos regiones ITR funcionales que permiten el inicio de nuevos ciclos de replicación (*Figura 2.8*). Éste fenómeno ocurre de manera natural en cualquier preparación vírica en una proporción que varía del 5% al 50%. No obstante, la proporción de genomas diméricos puede aumentarse drásticamente delecionando la secuencia correspondiente al punto de resolución terminal en uno de los ITR cuando se quieren generar vectores recombinantes de tipo scAAV<sup>134</sup>.



**Figura 2.8. Representación esquemática del proceso de replicación de scAAV.**

Tal y como se ha comentado anteriormente, la formación de la doble hebra de ADN es uno de los principales pasos que limitan la eficiencia de la expresión génica ya que depende, en gran medida, del estado fisiológico en el que se encuentra la célula hospedadora y de la concentración de partículas víricas infectivas. Por este motivo, el uso de vectores de tipo scAAV es por lo general más eficaz desde el punto de vista terapéutico. No obstante, el beneficio obtenido en cuanto a eficacia debido al uso de scAAV depende de varios factores entre los que se encuentran la dosis administrada, la vía de administración y el tipo de célula o tejido diana. En este sentido, el hígado es uno de los mejores candidatos para ser transducido con scAAV ya que la administración de dosis altas por vía intravenosa con serotipos capaces de infectar los hepatocitos de forma eficiente, suele resultar en una distribución amplia y homogénea del vector<sup>155</sup>.

La principal limitación que presentan este tipo de vectores es la reducción de la capacidad de clonación, que disminuye de 4,7 kb a 2,5 kb<sup>156</sup>. Por este motivo, la optimización de los diferentes elementos de regulación de la transcripción génica, así como la optimización de codones de la secuencia del gen terapéutico son de especial relevancia en estos casos. Otro de los factores negativos de los scAAV en comparación con los AAV es la respuesta inmune desencadenada en el organismo hospedador, que se ve aumentada debida a una mayor activación de la inmunidad innata vía TLR9<sup>157</sup>.

#### V. AAV recombinantes (rAAV).

Los rAAV utilizados en estudios de terapia génica se obtienen mediante técnicas de clonaje que permiten introducir la secuencia de interés en un plásmido de dsADN. Durante este procedimiento, el genoma del AAV se sustituye por un *cassette* de expresión que puede contener diferentes elementos

de entre los cuales tres son básicos e indispensables: el promotor, el transgén y la señal de poliadenilación. Estas secuencias han de clonarse siempre flanqueadas por las secuencias codificantes de los ITR, que son los únicos componentes del genoma de los AAV que han de mantenerse siempre en *cis*<sup>158</sup>. El tamaño máximo del *cassette* de expresión ha de ser similar al tamaño del genoma vírico y no debe exceder las 5 kb (2,5 kb en el caso de scAAV). No obstante, se han propuesto un par de estrategias para aumentar la capacidad de empaquetamiento. La primera de ellas consiste en la interrupción de la secuencia codificante del gen mediante la adición de un intrón<sup>159</sup>. De esta forma, se generan dos vectores: un primer vector que contiene el promotor y el inicio del gen seguido de una región donadora de *splicing* y un segundo vector que contiene una región aceptora seguida del resto de la secuencia génica y la señal de poliadenilación. La segunda aproximación propuesta se basa en la incorporación de inteínas, segmentos proteicos capaces de separarse y volverse a unir al resto de la cadena proteica por medio de un enlace peptídico<sup>160</sup>.

#### - Diseño de rAAV e ingeniería de vectores.

Existen varios factores que influyen en la eficiencia terapéutica de los rAAV. No obstante, gracias a los avances en el campo de la ingeniería de vectores, se han identificado y desarrollado varias estrategias que permiten incrementar la tasa de transducción y la expresión del gen terapéutico.

##### a. Modificaciones en el *cassette* de expresión.

El direccionamiento y la eficiencia de la expresión génica del transgén introducido en un determinado *cassette* de expresión depende, en gran parte, de los elementos incorporados.

El elemento más importante es el **promotor**, que puede ser constitutivo o específico de tejido y de mayor o menor potencia. Por lo general, el uso de promotores específicos resulta mucho más efectivo ya que, además de ser más eficientes en el tejido diana en cuestión, permiten dirigir la expresión y reducir la respuesta inmunitaria. No obstante, en ciertas aproximaciones, como por ejemplo en aquellas en las que resulta indispensable la secreción de la enzima, puede ser necesario el uso de promotores constitutivos. En el caso de los rAAV existen limitaciones en el uso de ciertas secuencias promotoras debido a la capacidad de empaquetamiento y, en muchas ocasiones, la única alternativa es utilizar promotores codificados por secuencias cortas aún sabiendo que supondrán una disminución en los niveles de expresión. Para solventar estos problemas la secuencia del promotor puede ir precedida de secuencias potenciadoras, conocidas como **enhancers**, que promueven la unión de ciertos factores de transcripción<sup>161</sup>. Otra de las alternativas es la adición de **intrones** entre el promotor y el gen terapéutico<sup>162</sup>. La incorporación de secuencias no codificantes puede tener una doble función ya que, por un lado, son importantes para el procesamiento del mRNA y, por otro, permiten aumentar el tamaño del genoma vírico y la eficiencia de empaquetamiento cuando el tamaño de la construcción utilizada dista mucho del tamaño de los AAV salvajes. En estos casos reciben el nombre de ADN “*stuffer*” o ADN de relleno.

A nivel post-transcripcional, uno de los requisitos indispensables para asegurar el efecto terapéutico es la incorporación de secuencias codificantes de **señales de poliadenilación (pA)**. La incorporación de una cola de adeninas en el extremo 3' del mRNA es crítica para la exportación de éste al citosol y lo protege de la degradación aumentando su vida media y favoreciendo el proceso de traducción. Al margen de señales pA, pueden incorporarse otros **elementos de regulación post-transcripcional** tipo HPRE o WPRE. Aunque este tipo de secuencias permiten aumentar los niveles de expresión

considerablemente, pueden no resultar muy efectivas cuando el *cassette* de expresión incluye también una secuencia intrónica<sup>163</sup>.

La secuencia del transgén puede modificarse mediante técnicas de **optimización de codón**, que permiten cambiar la secuencia genómica sin alterar la secuencia final de la proteína codificada gracias a la degeneración del código genético. De esta forma, el proceso de traducción resulta más eficiente y se produce mayor cantidad de la proteína de interés a partir de una misma cantidad de mRNA.

Por último, la coadministración de **microARNs** (miARN) específicos que actúan silenciando el mRNA puede ser de utilidad para restringir la expresión génica a un determinado tipo celular<sup>164</sup>.

#### b. Modificaciones en la cápside vírica.

La modificación de los residuos aminoacídicos de las proteínas de la cápside realizada mediante técnicas de diseño racional o evolución dirigida permite aumentar la tasa de transducción y el tráfico intracelular de los rAAV<sup>165</sup>.

El **diseño racional** de cápsides víricas ha resultado ser de gran utilidad en numerosas ocasiones. No obstante, a diferencia de las estrategias de evolución dirigida, requiere del previo conocimiento de las estructuras de los receptores celulares y de las regiones de la cápside que interactúan con dichos receptores. Una de las modificaciones más representativas del diseño racional consiste en realizar mutagénesis dirigida sobre las tirosinas expuestas de la cápside vírica<sup>166</sup>. Concretamente, el cambio de tirosina por fenilalanina se ha utilizado en varios casos para evitar la degradación proteosómica. Este cambio permite, no sólo aumentar la eficiencia de transducción, sino reducir la presentación de antígenos y la respuesta celular mediada por células T<sup>167</sup>. Al margen de ésta, otras de las estrategias derivadas del diseño racional que aumentan la eficiencia de transducción son: la mutación de las zonas de unión a nAbs<sup>168</sup>, la mutación de la zona de unión al receptor para generar cápsides vacías que permiten bloquear nAbs preexistentes sin establecer competencia con los rAAVs que contienen el gen terapéutico de interés (*capsid decoy*)<sup>169</sup>, o la unión de ligandos de elevada afinidad por receptores concretos que restringen y redireccionan el tropismo natural de un determinado serotipo<sup>170</sup>.

De forma alternativa, la obtención de nuevas variantes puede realizarse por **evolución dirigida** mediante la repetición de varios procesos de diversificación y selección. Existen tres mecanismos principales que permiten la generación de mutaciones aleatorias: la inserción de oligonucleótidos de secuencia aleatoria, el barajado de ADN o "*DNA shuffling*", y la amplificación por PCR mediante el uso de polimerasas deficientes en actividad correctora, conocido como "*Error prone PCR*"<sup>171</sup>.

#### - Producción de partículas víricas.

El coste de producción, la escalabilidad del proceso, la productividad de la línea celular utilizada y la calidad del stock final son algunos de los factores que influyen y limitan la producción de rAAV. Por este motivo, existen varios métodos de producción que se diferencian tanto en los sistemas de expresión como en los métodos de purificación empleados.

Las producciones a gran escala suelen realizarse en sistemas de expresión basados en el uso de baculovirus y células de insecto, ya que éstos resultan fácilmente escalables, evitan la presencia de agentes contaminantes de origen mamífero y son capaces de producir grandes cantidades de proteína. Sin embargo, los baculovirus necesarios para la infección de las células productoras son bastante

inestables y su proceso de generación y caracterización es largo. Por estas razones se están realizando continuos esfuerzos para escalar la producción en células de mamífero. El crecimiento en suspensión y medios libres de suero es la principal limitación. Entre las diferentes líneas celulares, HeLa, A549, BHK, Vero y, principalmente, HEK293 son las más utilizadas<sup>172</sup>.

De forma mayoritaria, la producción en HEK293 se realiza mediante triple transfección transitoria con fosfato cálcico, lípidos catiónicos o polietilenimina<sup>172</sup>. Los ITR son la única parte del genoma vírico que se mantiene en *cis*, por lo que resulta necesario suplementar el resto de las funciones virales en *trans*. De entre los posibles *helpers*, los más comunes son los Ad (aunque también pueden utilizarse HSV). Por lo general, se utiliza una línea celular que expresa de manera estable los genes E1A y E1B del Ad y se lleva a cabo una triple transfección con los siguientes plásmidos: pAAV-GOI, que contiene los ITRs y el *cassette* de expresión de interés, pRepCap, que contiene los genes *rep* y *cap* propios de los AAV salvajes y pHelper, que contiene los genes E4, E2A y VA RNA típicos de los Ad<sup>173</sup>. Alternativamente, los plásmidos pRepCap y pHelper pueden combinarse en un único plásmido (doble transfección)<sup>174</sup>.

A pesar de que la transfección transitoria permite la producción de diferentes serotipos de manera fácil y rápida mediante el cambio en la secuencia codificante del gen *cap* y reduce la contaminación residual de virus *helper* en la preparación final, el requerimiento de grandes cantidades de plásmido hace que el coste de producción resulte elevado. Para solventar este inconveniente pueden crearse células productoras y empaquetadoras que expresan los genes *rep* y *cap* de forma estable<sup>175-177</sup>.

Existen también otras estrategias que permiten aumentar la productividad y reducir el riesgo de generación de rAAV con capacidad replicativa. Entre ellas destacan la separación de los genes *rep* y *cap* en dos plásmidos independientes, la reducción del tamaño del *helper*, la delección de promotores y codones de inicio innecesarios o el uso de ITRs, *rep* y *cap* de un mismo serotipo<sup>178,179</sup>. Por último, el uso alternativo de minicírculos<sup>180</sup> o megavectores<sup>181</sup> reduce la contaminación de la preparación final con secuencias procariotas y aumenta la eficiencia de empaquetamiento y transducción.

Una vez realizada la producción de rAAV es necesario purificar la preparación vírica. El proceso de purificación suele iniciarse con un primer paso de lisis celular durante el cual se añaden nucleasas, que reducen el contenido de ácidos nucleicos, y sales, que evitan la formación de agregados<sup>182</sup>. A partir de aquí, existen diferencias en función de si la producción se ha realizado a pequeña o gran escala<sup>172</sup>.

Las purificaciones a pequeña escala suelen realizarse mediante centrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio o gradiente discontinuo de iodixanol. Aunque ambas estrategias permiten la separación de cápsidas vacías y *helpers* residuales, el gradiente discontinuo de iodixanol permite obtener preparaciones de mayor pureza y, a diferencia del CsCl, no resulta tóxico para las células<sup>183</sup>. El rendimiento de la purificación puede aumentarse en ambos casos añadiendo un paso previo de precipitación<sup>184</sup>. Por el contrario, los métodos cromatográficos de intercambio iónico, de interacción hidrofóbica o de afinidad son los más utilizados para la purificación a gran escala. Tanto a pequeña como a gran escala, suele incluirse un último paso de filtración tangencial para concentrar y diafiltrar<sup>172</sup>.

La caracterización de la producción final puede realizarse mediante diferentes métodos. Por ejemplo, la presencia de secuencias contaminantes puede detectarse por PCR cuantitativa (qPCR) o técnicas de secuenciación masiva. Sin embargo, para la detección de cápsidas vacías suelen utilizarse técnicas de microscopía electrónica de transmisión, la combinación de métodos de cuantificación de cápsidas



totales (ELISA) con qPCR, la combinación de ultra centrifugación y densidad óptica a 260 nm, la ratio de absorbancia 260/280 nm o la espectrometría de masas. Los geles SDS-PAGE seguidos de diferentes tinciones se utilizan para determinar la pureza<sup>172</sup>.

- **Titulación de partículas víricas.**

La titulación de las preparaciones víricas representa el último paso del proceso de producción y uno de los más importantes, ya que la dosis administrada en los diferentes estudios depende del título final establecido. Éste puede determinarse utilizando diferentes métodos:

- **Espectrofotometría con luz ultravioleta:** permite cuantificar la cantidad de ADN vírico y de proteínas de la cápside de forma rápida y sencilla, pero puede estar interferida por la presencia de impurezas (principalmente restos de ADN y proteínas celulares)<sup>185</sup>.
- **ELISA:** permite determinar el título físico de la preparación a partir de la cuantificación de cápsides víricas<sup>186</sup>.
- **“Southern-blot”:** permite cuantificar la cantidad de ADN e informa de la integridad del genoma vírico. Se trata de una técnica sensible y específica pero laboriosa.
- **“Dot blot”:** cuantifica el número de genomas víricos de manera precisa. Sin embargo, no permite obtener información del peso y la integridad del genoma vírico ni de la cantidad de ADN no encapsidado<sup>172</sup>.
- **qPCR:** permite cuantificar el número de moléculas de ADN de forma robusta y sencilla. No obstante, además de que tampoco nos informa de la cantidad de ADN libre de la preparación, puede resultar inefectiva para la titulación de scAAV, ya que el genoma de éstos puede reanillar impidiendo la unión de los cebadores utilizados para llevar a cabo la reacción de amplificación e inhibiendo la síntesis de amplicones. En consecuencia, puede dar lugar a una subestimación de hasta 10 veces el título real<sup>187</sup>. Existen métodos optimizados que incorporan un paso previo de linealización del genoma<sup>187,188</sup> o de eliminación de los ITRs<sup>189</sup> mediante digestión enzimática. Aunque es la técnica más utilizada, existe mucha variabilidad dentro de un mismo ensayo y entre diferentes ensayos.
- **ddPCR (del inglés “droplet digital PCR”):** cuantifica el número absoluto de genomas víricos de la preparación. A diferencia de la qPCR convencional, el título obtenido no se extrapola a partir de una curva patrón. Además, los resultados no dependen de la cinética de la reacción de amplificación, sino que se determina la cantidad de ADN a punto final. Por este motivo está menos interferida por la presencia de posibles contaminantes que limitan la reacción de PCR. Presenta mayor eficiencia que la qPCR tanto en la cuantificación de ssAAVs como de scAAVs<sup>190</sup>.
- **Electroforesis en gel alcalino o gel nativo:** cuantifica la cantidad total de ADN teñido con marcadores fluorescentes separado previamente por electroforesis. La cuantificación se realiza utilizando estándares de concentración conocida que presentan la misma migración que la muestra problema. El resultado final puede variar en función de la intensidad de la tinción, la cual puede depender de la secuencia de ADN<sup>187</sup>.

- Métodos fluororimétricos: permiten cuantificar dsADN por fluorometría mediante el uso de agentes intercalantes del ADN de forma rápida, robusta y sencilla. A diferencia de la qPCR no están influenciados por la naturaleza de los extremos ITRs. Además, permiten cuantificar también la cantidad de ADN no encapsidado y presentan menor variabilidad<sup>191</sup>.

## VI. AAV y respuesta inmune.

El uso de rAAV en humanos puede desencadenar una respuesta inmunológica contra el producto del transgén introducido, contra el vector utilizado o contra ambos. Los estudios preclínicos pueden ayudar a predecir respuestas inmunes desarrolladas contra el producto del transgén, sin embargo, raramente son efectivos en cuanto a la determinación de la respuesta inmune frente a la cápside vírica ya que, en humanos, la infección con formas salvajes del virus de forma natural genera células T de memoria y anticuerpos neutralizantes que influyen negativamente en la capacidad de transducción de los rAAV<sup>192</sup>. La respuesta producida involucra tanto al sistema inmune innato como al sistema inmune adaptativo y varía en función de la dosis, la vía de administración o el tejido diana.

### - Respuesta inmune innata.

El genoma de los rAAV puede activar la inmunidad innata de forma transitoria a través de diferentes vías. La más común se basa en la activación de la cascada de producción de interferón tipo I (IFN-I) y citoquinas proinflamatorias vía NF-KB, que se activa por unión del ADN vírico al receptor TLR9<sup>193</sup>. El receptor TLR9 se localiza en los endosomas y reconoce motivos CpG no metilados, típicos de ADN vírico o bacteriano<sup>194</sup>. Según estudios realizados por Martino y colaboradores, la transducción de hepatocitos murinos *in vivo* mediante el uso de scAAV aumenta la activación de la inmunidad innata vía TLR9 y, en consecuencia, la infiltración de macrófagos, neutrófilos y células NK, la producción de IL-6 e IFN-I y la inmunogenicidad de la cápside vírica debido a una mayor producción de células B y células T efectoras<sup>157</sup>. Sin embargo, a diferencia de lo observado en estudios realizados en músculo<sup>195</sup>, el uso de scAAV no supuso un aumento en la respuesta contra el producto del transgén en este caso, probablemente debido al ambiente antiinflamatorio proporcionado por el hígado.

La cápside vírica también puede aumentar en mayor o menor medida la inmunidad innata en función del serotipo utilizado. Las diferencias radican en la capacidad de transducción de células dendríticas<sup>196</sup>, la capacidad de unión al receptor de superficie TLR2<sup>197</sup> o la capacidad de activación del sistema del complemento mediante unión a iC3b<sup>198</sup>.

Algunas de las posibles estrategias para evadir la respuesta innata son la administración de oligonucleótidos antagonistas que bloquean la unión del genoma vírico al receptor TLR9 o de inhibidores del sistema del complemento<sup>193</sup>. Aunque se ha constatado que la eliminación de motivos CpG ayuda a reducir la respuesta inmune innata en estudios preclínicos en ratón<sup>199</sup>, los resultados obtenidos en el ensayo clínico realizado en pacientes con hemofilia B con el vector scAAV8-coFIX ponen en duda la efectividad de esta estrategia en humanos<sup>154</sup>.

### - Respuesta inmune adaptativa.

La respuesta inmune adaptativa puede dividirse en dos bloques en función de si está mediada por células B o por células T.

#### a. Respuesta mediada por células B.

Las células B son las encargadas de desarrollar una respuesta inmune humoral. La infección natural por AAV salvajes en humanos genera nAbs contra las proteínas de la cápside vírica. Estos nAbs pueden bloquear completamente la transducción del tejido diana en función de la dosis y la vía de administración (títulos superiores a 1:10 bloquean la transducción del hígado por vía intravenosa<sup>200</sup>). Existen también anticuerpos no neutralizantes que opsonizan la cápside vírica y promueven su eliminación mediante la activación de células dendríticas o macrófagos<sup>201</sup>.

La preexistencia de anticuerpos en humanos varía en función del serotipo, siendo el AAV2 el que presenta una seroprevalencia más elevada (72%). No obstante, aunque la seroprevalencia es menor en el caso de otros serotipos comúnmente utilizados en terapia génica (AAV1, 67%; AAV5, 40%; AAV6, 46%; AAV8 38% y AAV9 47%), existe reactividad cruzada entre ellos debido al elevado grado de conservación de las proteínas de la cápside<sup>202</sup>. Este hecho dificulta, no sólo la adecuación de los pacientes para ser incluidos en un determinado ensayo clínico, sino la realización de segundas administraciones en caso necesario, ya sea por dilución del transgén a largo plazo o porque la dosis administrada no resulta suficiente.

Las diferentes estrategias que permiten disminuir la respuesta inmunitaria mediada por células B incluyen la selección de pacientes con títulos bajos o nulos de nAbs preexistentes, el aumento de la dosis administrada para asegurar la transducción del tejido diana, la infusión previa o coadministración de grandes cantidades de cápsides vacías junto con el vector de interés para bloquear temporalmente los nAbs preexistentes (*capsid decoy*), el uso de inmunosupresores, el cambio de serotipo o uso de cápsides recombinantes, la eliminación de nAbs mediante plasmaféresis o la administración directa del virus en el tejido diana tras realizar un lavado previo con solución salina para minimizar el contacto de los rAAV con el torrente sanguíneo<sup>192</sup>. No obstante, estas estrategias pueden limitar la eficacia terapéutica debido a modificaciones en el tropismo del virus o al aumento de la respuesta mediada por células T.

#### b. Respuesta mediada por células T.

En humanos, la infección previa con AAV salvajes provoca la presentación de antígenos de la cápside vírica a través de moléculas MHC de clase I. Esto genera una población de células de memoria TCD8<sup>+</sup> que son capaces de reactivarse rápidamente tras la inyección de rAAV dando lugar a la eliminación de células transducidas por parte de células efectoras del sistema inmune. Este tipo de respuesta es dosis dependiente y puede verse notablemente acentuada en el caso de preparaciones con gran proporción de cápsides vacías<sup>192</sup>.

La respuesta mediada por células T fue descrita por primera vez en el primer ensayo clínico realizado en pacientes con hemofilia B<sup>203</sup>. Como consecuencia de la respuesta producida, la expresión del factor IX disminuyó al cabo de varias semanas provocando un aumento en los niveles de transaminasas hepáticas. Ensayos clínicos posteriores basados en el uso del vector scAAV8-coFIX para esta misma enfermedad, mostraron resultados similares en dos de los sujetos tratados. No obstante, en este segundo caso, el problema se solventó administrando temporalmente dosis elevadas de esteroides. A pesar de que el desarrollo de esta respuesta inmunitaria comportó una pérdida de eficacia terapéutica, no se detectaron otras secuelas<sup>154</sup>.

**VII. Ensayos clínicos basados en el uso de AAV.**

El primer ensayo clínico basado en el uso de AAV fue realizado en 1996 por Flotte y colaboradores. El estudio en cuestión, consistió en el tratamiento de pacientes de fibrosis quística mediante el uso de vectores de serotipo 2 codificantes del gen *CFTR*<sup>204</sup>. A partir de ese momento el uso de los AAV se ha ido extendiendo hasta llegar a un total de 173 ensayos clínicos realizados, lo que representa un 7% del total de los ensayos clínicos basados en el uso de la terapia génica<sup>113</sup>. Aunque el logro de resultados clínicos exitosos fue lento al principio, actualmente existen varios ejemplos que muestran la efectividad de los rAAV a largo plazo en el tratamiento de enfermedades como la hemofilia o la amaurosis congénita de Leber. La siguiente tabla muestra un resumen de los ensayos clínicos realizados hasta la fecha.

*Tabla 2.4. Resumen de los ensayos clínicos basados en el uso de rAAV<sup>106,111,205</sup>.*

Enfermedad <sup>1</sup>	Transgén <sup>2</sup>	Serotipo	Administración	Identificador <sup>3</sup>
Deficiencia AAT	AAT	AAV2	Intramuscular	NCT00377416
		AAV1		NCT00430768
Batten	CLN2	AAV2	Intracraneal	NCT00151216
		AAVrh10		NCT01161576
Canavan	CLN6	scAAV9	Intracraneal	NCT02725580
		ASPA		AAV2
Fibrosis Quística	CFTR	AAV2	Aerosol	NCT00004533
			AAV2	Intramuscular
Hemofilia B	Factor IX		Hepática	NCT00515710
		AAV8	Intravenoso	NCT00979238
		AAV5		NCT02396342
Hemofilia A	Factor III	AAVrh10	Intravenoso	NCT02618915
		AAV8		NCT03001830
Amaurosis congénita de Leber	RPE65	AAV2	Subretinal	NCT00643747
				NCT00516477
				NCT00481546
Coroideremia	OPTIRPE65	AAV5	Subretinal	NCT00999609
				NCT02781480
Deficiencia LPL	REP1	AAV2	Subretinal	NCT01461213
				LPL
LGMD	α-sarcoglicano	AAV1	Intramuscular	NCT01109498
				γ-sarcoglicano
Pompe	GAA	AAV1	Intradiafragma	NCT00976352
		AAV9		NCT02240407
DMD	Microfistrofina	AAV1-2	Intramuscular	NCT00428935
		huFollistin344		AAV1
Porfiria	PBGD	AAV5	Intravenoso	NCT02082860
				TNFR-Fc
Artritis reumatoide				NCT00126724
Fallo cardíaco	SERCA2a	AAV1	Intracoronaria	NCT00534703
				NCT01643330
				NCT01966887

Enfermedad <sup>1</sup>	Transgén <sup>2</sup>	Serotipo	Administración	Identificador <sup>3</sup>
Fallo cardíaco	SERCA2a	AAV1	Intracoronaria	NCT02346422
	AADC			NCT00229736 NCT02418598 NCT00643890
Parkinson	GAD	AAV2	Intracraneal	NCT00195143
	Neurturina			NCT01301573 NCT00252850
	GDNF			NCT00985517 NCT00400634 NCT01621581
DMAE	Anti-VEGF	AAV2	Subretinal	NCT01494805
			Intravitreal	NCT01024998
Acromatopsia	CNGB3	AAV8	Subretinal	NCT03001310
	CNGA3	AAV2		NCT02599922
		AAV2		NCT02935517
HF Ho	hLDLR	AAV8	Intravenoso	NCT02651675
Déficit OTC	OTC	scAAV8	Intravenoso	NCT02991144
AME	SMN	scAAV9	Intravenoso	NCT02122952
OAR	1Ra	scAAV2	Intra-articular	NCT02790723
MPS tipo IIIA	SGSH	AAVrh10	Intracraneal	NCT02053064
XLRS	hRS1	AAV2	Intravitreal	NCT02416622

Abreviaturas: **1)** AAT, alfa-1-antitripsina; LPL, lipoproteína lipasa; LGMD, distrofia muscular de cinturas; DMD, distrofia muscular de Duchenne; DMAE, degeneración macular asociada a la edad; HF Ho, hipercolesterolemia familiar homocigota; OTC, ornitina transcarbamilasa; AME, atrofia medular espinal; OAR, osteoartritis de rodilla; MPS, mucopolisacaridosis; XLRS, retinosquiasis ligada al X. **2)** CLN2, tripeptidil peptidasa 1; CLN6, lipofuscinosis neuronal ceroidea tipo 6; ASPA, aspartoacilasa; CFTR, regulador transmembranal de fibrosis quística; RPE65, isomerohidrolasa retinoide; REP1, Rab escolta 1; GAA, alfa-(1,4)-glucosidasa; PBGD, porfobilinógeno deaminasa; TNFR-Fc, fusión proteica del receptor del factor de necrosis tumoral con el fragmento Fc de inmunoglobulinas; SERCA2a, calcio-ATPasa del retículo endoplasmático; AADC, triptófano descarboxilasa; GAD, ácido glutámico descarboxilasa; GDNF, factor neurotrófico derivado de la glía; VEGF, factor vascular de crecimiento endotelial; CNG, canales regulados por nucleótidos cíclicos; hLDLR, receptor humano de lipoproteínas de baja densidad; SMN, factor neurotrófico de supervivencia de neuronas motoras; 1Ra, interleucina 1-Ra; SGSH, N-sulfoglucosamina sulfhidrolasa; hRS1, retinosquiasina humana. **3)** NA, no aplica.

### 2.3.3. Técnicas de edición génica.

Durante los últimos 15 años se ha producido un gran avance en el desarrollo de técnicas de edición génica que se basan en la fusión de dominios que reconocen secuencias específicas de ADN con dominios con actividad nucleasa que generan cortes de doble cadena. Estos cortes permiten editar la información genética de un determinado locus mediante el direccionamiento de los sistemas de reparación propios de la célula o mediante la adición de sondas que se introducen en la región de interés por recombinación homóloga. También permiten la eliminación de fragmentos de ADN y, por lo tanto, la interrupción o silenciamiento de genes<sup>206</sup>.

El primer sistema descrito fue el basado en nucleasas con dedos de zinc (ZFN, del inglés “Zinc Finger Nucleases”), que actualmente ya han sido evaluadas en ensayos clínicos en pacientes de VIH para generar mutaciones en el gen *CCR5* e impedir la entrada del virus en linfocitos T<sup>207</sup>. Al margen de éste, existen otros ensayos clínicos en marcha basados en el uso de ZFN para el tratamiento de pacientes

con mucopolisacaridosis tipo I y II, hemofilia B o afectación de cérvix como consecuencia de infección por el virus del papiloma humano<sup>205</sup>. Posterior a las ZFN fueron las TALEN (del inglés, “*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*”), que resultan más efectivas y disminuyen los efectos tóxicos<sup>208</sup>. Por último, en los últimos años ha sido especialmente relevante el desarrollo de la tecnología CRISPR (del inglés, “*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*”) que, además de permitir la generación de grandes baterías de ARN guías mediante técnicas simples de clonaje molecular, resulta más eficiente y específica y permite la edición simultánea de múltiples genes<sup>209,210</sup>. Esta tecnología se está utilizando actualmente de forma rutinaria para la generación de modelos celulares y animales, ya que resulta rápida, eficiente y de bajo coste. Además, en vista del éxito de los resultados obtenidos, ya se han puesto en marcha varios ensayos clínicos que pretenden hacer uso de este sistema para el tratamiento de pacientes infectados por Epstein-Barr o de pacientes con cáncer metastásico avanzado de pulmón, riñón o próstata<sup>205</sup>.

La principal limitación que presentan estas tecnologías es la generación de cortes inespecíficos en zonas no deseadas del genoma debido a la homología de estas regiones, denominadas “*off-target*”, con las secuencias diana de interés. Por este motivo es muy importante realizar un estudio exhaustivo de los posibles *off-targets* en cada caso particular y desarrollar estrategias dirigidas a la minimización de cortes no deseados, como es, por ejemplo, el uso de un par de “*nickasas*” dirigidas por dos ARN guía en el caso de estrategias basadas en el uso de CRISPR<sup>211</sup>.

#### 2.3.4. Pros y contras de la terapia génica.

La terapia génica puede suponer la cura definitiva de muchas enfermedades heredadas o adquiridas de origen genético ya que, a diferencia de otras aproximaciones centradas en el uso de fármacos que enmascaran o alivian los síntomas asociados a una determinada patología, permite la corrección del defecto genético causante de la enfermedad. No obstante, aunque puede ser una alternativa muy conveniente para muchas enfermedades que todavía no tienen tratamiento, también presenta algunos peligros potenciales que han de tenerse en cuenta a la hora de desarrollar estrategias terapéuticas.

Los pros más destacables del uso de la terapia génica son:

- Permite producir efecto terapéutico permanente o a largo plazo. El uso de vectores virales integrativos comporta la modificación genética de las células transducidas y de las células hijas resultantes de posteriores ciclos de división celular. No obstante, para reducir los riesgos asociados a estos vectores pueden utilizarse vectores no integrativos dirigidos a órganos con baja tasa de regeneración.
- Permite restringir el tratamiento a un determinado órgano o tejido diana. Puede realizarse un direccionamiento físico (dependiendo la vía de administración utilizada), biológico (en función del pseudotipado (LV) o serotipo (AAV) utilizado) o transcripcional (según si se utilizan promotores constitutivos o promotores específicos de tejido).
- Permite regular la expresión génica gracias al uso de sistemas de expresión inducibles o al uso de promotores de mayor o menor potencia. Esto supone una ventaja en enfermedades que presentan una ventana terapéutica muy estrecha y requieren de un control estricto de la expresión génica.

- Aunque los tratamientos son caros, pueden resultar mucho más baratos a largo plazo en comparación con otras estrategias basadas, por ejemplo, en el reemplazo enzimático.

Por el contrario, los contras más evidentes son:

- La capacidad de empaquetamiento de los vectores disponibles es limitada. Existen ciertas enfermedades, como por ejemplo la distrofia muscular de Duchenne, en las que resulta difícil diseñar estrategias basadas, sobre todo, en rAAVs. No obstante, pueden valorarse estrategias alternativas basadas en LV o Ad, que permiten incorporar genes de mayor tamaño.
- Los eventos de integración pueden desencadenar procesos de oncogénesis insercional (asociado principalmente al uso de retrovirus y LV).
- Pueden producirse reacciones inmunológicas importantes que limitan la eficacia terapéutica y que pueden tener consecuencias graves para el paciente (sobre todo en el caso de Ad).
- Puede ocasionar citotoxicidad en las células transducidas debido a una sobreexpresión ectópica del transgén.

## 2.4. Terapia génica y MNGIE.

Existen diferentes razones por las cuales la terapia génica resulta una herramienta atractiva para el tratamiento del MNGIE:

- El MNGIE es una enfermedad monogénica debida a mutaciones en el gen *TYMP*.
- Los nucleósidos son moléculas solubles que difunden a través de las membranas plasmáticas de las células mediante diferentes transportadores y, por lo tanto, no es necesaria la secreción de la enzima TP al medio extracelular.
- No existe un órgano diana concreto, ya que el transporte de nucleósidos a través de la circulación facilita el aclaramiento sistémico de los mismos gracias a la actividad TP aportada por diferentes tejidos.
- El umbral terapéutico es bajo y no es necesaria la corrección del conjunto de células del organismo para conseguir reducir la concentración de dThd y dUrd a nivel sistémico (de hecho, portadores heterocigotos de mutaciones en el gen *TYMP* que presentan un 25-35% de la actividad normal no presentan sintomatología).

En base a esto, en nuestro grupo se han desarrollado dos estrategias diferentes de terapia génica que han sido evaluadas a nivel preclínico *in vitro*, en células linfoblastoides de pacientes de MNGIE e *in vivo*, utilizando el ratón doble KO *Tymp<sup>-/-</sup>Upp1<sup>-/-</sup>*, modelo de la enfermedad.

### 2.4.1. Terapia génica ex vivo mediante el uso de LV dirigidos al tejido hematopoyético.

En primer lugar, y para demostrar la prueba de concepto del uso de la terapia génica como aproximación terapéutica para el MNGIE, se generó un vector lentiviral de tercera generación que expresaba el ADN codificante (cADN) del gen *TYMP* bajo la acción del promotor constitutivo de la fosfoglicerato quinasa humana (PGK). Dicho vector se utilizó *in vitro* para transducir células linfoblastoides inmortalizadas de pacientes de MNGIE. Los resultados obtenidos mostraron que el uso

del vector terapéutico permitía restituir la actividad enzimática en las células y que éstas eran capaces de normalizar la concentración de dThd y dUrd en un medio de cultivo suplementado con nucleósidos<sup>98</sup>.

Posteriormente, y con el fin de testar la efectividad del tratamiento *in vivo*, se utilizó el LV generado para tratar ratones doble KO. Para ello, se transdujeron células madre hematopoyéticas de ratones singénicos que fueron trasplantadas en receptores doble KO previamente sometidos a mieloablación parcial. Los animales trasplantados mostraron niveles elevados de actividad TP en sangre periférica y reducción sistémica de nucleósidos a pesar del bajo quimerismo molecular conseguido (8-10%)<sup>98</sup>. Con el fin de evaluar la toxicidad y estabilidad del tratamiento a largo plazo, se trató un nuevo grupo de ratones que permitió comprobar que el tratamiento es estable durante al menos 18 meses y que no presenta efectos tóxicos destacables más allá de los derivados del propio procedimiento ya que, a pesar de que se observó una disminución de la tasa de supervivencia en los ratones tratados en comparación con los animales WT o doble KO sin tratar, ésta se debía a la toxicidad de la irradiación requerida para llevar a cabo el trasplante y no al uso de LV<sup>99</sup>.

Pese a la efectividad del tratamiento, el uso de esta estrategia presenta también ciertas limitaciones. La primera de ellas es que, al igual que en el caso del AHSCT, requiere mieloablación de los pacientes antes de la realización del trasplante. La segunda y más importante es que los LV son vectores integrativos que pueden desencadenar procesos oncogénicos. En relación a este último punto, resulta de gran relevancia el hecho de que en el caso de los pacientes de MNGIE el gen *TYMP* puede tener una doble función y puede actuar simultáneamente como gen terapéutico y como gen suicida en aquellas células que lo expresan. La TP es la encargada de convertir el profármaco capecitabina (comúnmente utilizado como agente quimioterapéutico) en 5-fluorouracilo, antagonista de pirimidinas que actúa como antimetabolito inhibiendo la timidilato sintasa y, consecuentemente, la división celular<sup>212</sup>. Esto supone un mecanismo de seguridad adicional ya que en caso de desarrollo de un proceso de oncogénesis insercional debido al uso de LV, las células que expresen TP derivarán forzosamente de células transducidas y serán las únicas susceptibles de ser eliminadas con el uso del profármaco.

#### **2.4.2. Terapia génica *in vivo* mediante el uso de AAV con tropismo hepático.**

Una vez demostrada la viabilidad de la terapia génica como potencial herramienta para el tratamiento del MNGIE, se decidió desarrollar una nueva estrategia basada en el uso de AAV dirigidos principalmente al tejido hepático con el objetivo de minimizar el riesgo de oncogénesis insercional asociado al uso de LV. Para llevar a cabo el tratamiento, se diseñó un AAV8 que expresa el cADN del gen *TYMP* bajo la acción del promotor hepático de la globulina de unión a tiroxina (TBG). Las razones que llevaron a la elección del hígado como principal diana terapéutica incluyen el hecho de que se trata de un órgano tolerogénico desde el punto de vista inmunológico, que es la diana natural de muchos vectores virales y que es, *per se*, una de las principales fuentes de TP en humanos. Los resultados obtenidos tras una única inyección intravenosa de este vector en ratones MNGIE mostraron que era posible alcanzar niveles elevados de actividad TP, normalizar la concentración sistémica de nucleósidos y corregir la depleción de dCTP mitocondrial. Además, cabe destacar que no se observaron signos de toxicidad hepática asociados al uso del AAV<sup>100</sup>.

No obstante, pese a los prometedores resultados obtenidos con el AAV descrito, siguen existiendo limitaciones que deben ser consideradas cuando se pretenden desarrollar ensayos clínicos en humanos. Una de las más importantes es la posible reacción inmunológica que puede desencadenarse



tras la administración de dosis elevadas de AAVs. Al margen de esto, es importante tener en cuenta que los niveles de transducción asociados al uso de AAV8 son mayores en ratones que en humanos y que el efecto del transgén utilizado puede verse diluído si el tejido diana presenta una tasa de replicación elevada. Estas limitaciones son precisamente las que han dado lugar al desarrollo de esta tesis doctoral, que se ha planteado con el objetivo de obtener una batería de diferentes vectores para poder elegir aquél que resulte más eficaz a dosis más bajas. De esta forma se pretende optimizar la estrategia terapéutica propuesta y disminuir los posibles efectos adversos que pudieran derivar de su uso en humanos.

### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



### 3.1. Hipótesis.

Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación demostraron que la administración de un rAAV8 transcripcionalmente dirigido al hígado permite corregir el déficit de TP en el modelo murino de MNGIE (doble KO *Tymp<sup>-/-</sup>Upp1<sup>-/-</sup>*)<sup>100</sup>. En base a esto, nuestra hipótesis de trabajo propone que el cambio del promotor y de la configuración génica del *cassete* de expresión utilizado permitirá obtener una versión optimizada del vector previamente descrito.

Concretamente, pensamos que el uso de un promotor constitutivo o de promotores alternativos de expresión hepática de mayor potencia dará lugar a un mayor efecto terapéutico. Adicionalmente, esperamos que el uso de un vector con conformación scAAV suponga una mejora en términos de efectividad y eficacia respecto al uso de vectores equivalentes de cadena sencilla.

El interés de este planteamiento reside en el hecho de que, si se confirma nuestra hipótesis, podremos obtener herramientas terapéuticas alternativas que nos permitan reducir al máximo la mínima dosis con eficacia terapéutica requerida para el tratamiento de pacientes en ensayos clínicos futuros. De esta forma aumentaría la seguridad de la estrategia propuesta, ya que el uso de menores cantidades de vector supone una disminución de los posibles efectos adversos que pudieran derivar de la aplicación de la terapia génica basada en el uso de rAAV en humanos, sobre todo a nivel de desarrollo de respuesta inmunitaria. Además, la administración de menos cantidad de vector supondría también una ventaja a nivel económico debido a la reducción del precio final del tratamiento.

### 3.2. Objetivos.

Los objetivos establecidos para la comprobación de la hipótesis planteada son:

- 1- Construir y producir vectores adeno-asociados recombinantes alternativos de serotipo 8 que nos permitan optimizar el previamente descrito. Más concretamente, nos centraremos en la obtención de los siguientes vectores:
  - Un vector ssAAV que exprese el cADN del gen terapéutico *TYMP* bajo la acción del promotor constitutivo PGK.
  - Dos vectores cuya expresión esté regulada por la acción de promotores específicos de hepatocitos derivados del promotor de la  $\alpha$ -1-antitripsina humana. En este caso se diseñarán y construirán:
    - Un vector con ITRs de tipo ssAAV que exprese el cADN de *TYMP* bajo la acción de la secuencia reguladora ApoE/AAT (compuesta de la secuencia potenciadora de la apolipoproteína E humana y la secuencia promotora de la  $\alpha$ -1-antitripsina humana).
    - Un vector con ITRs de conformación dsAAV que exprese el cADN de *TYMP* bajo la acción del promotor híbrido específico de hígado HLP, el cual consiste en una versión reducida de la construcción ApoE/AAT.
- 2- Caracterizar los efectos producidos en el modelo murino de MNGIE tras una única inyección intravenosa de las diferentes construcciones a diferentes dosis. Para ello se realizará un seguimiento periódico (desde antes de la administración hasta 28 semanas post-inyección) de las siguientes variables:

- Parámetros indicativos de bienestar animal: control de peso, desarrollo de cifosis o aparición de signos evidentes de estrés (tales como estereotipias o conductas anómalas).
- Concentración plasmática de dThd y dUrd.
- Actividad alanina aminotransferasa en plasma como indicador de daño hepático.

Después de 34 semanas de tratamiento, se estudiarán también los siguientes parámetros:

- Alteración histológica del hígado.
  - Eficiencia de transducción y biodistribución de los diferentes vectores.
  - Actividad TP y cuantificación de los niveles de proteína TP en hígado, cerebro, músculo esquelético e intestino delgado.
  - Concentración de dThd y dUrd en hígado, cerebro, músculo esquelético e intestino delgado.
  - Metabolismo de dNTPs mitocondriales en hígado.
  - Número de copias de mtADN en hígado.
- 3- Establecer cuál de las diferentes construcciones propuestas debería ser considerada preferentemente para su posterior uso en ensayos clínicos en pacientes de MNGIE.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 4.1. Metodología general

### 4.1.1. Extracción de ADN.

La extracción de ADN se lleva a cabo siguiendo diferentes protocolos en función del tipo de muestra y de su posterior aplicación.

#### 4.1.1.1. Miniprep de ADN plasmídico.

Este método permite obtener ADN plasmídico a pequeña escala a partir de un cultivo bacteriano. Se realiza siguiendo el protocolo descrito por el fabricante del kit comercial *Illustra™ plasmidPrep MiniSpin Kit (28-9042-70, GE Healthcare)*. El protocolo de purificación incluye un proceso de lisis celular alcalina seguido de una cromatografía en membrana de sílice. Una vez el ADN está unido a la membrana se realizan una serie de lavados y, finalmente, se eluye utilizando un tampón de baja fuerza iónica.

#### 4.1.1.2. Maxiprep de ADN plasmídico.

Permite obtener ADN plasmídico a gran escala a partir de un cultivo bacteriano. Se utiliza este método cuando es necesario obtener grandes cantidades de ADN. Puesto que en nuestro caso la posterior aplicación del ADN obtenido es la transfección de células eucariotas, la extracción se realiza mediante el kit comercial *E.Z.N.A.® Endo-Free Plasmid DNA Maxi Kit (D6926-04, OMEGA bio-tek)*, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Igual que en la miniprep, el protocolo de purificación se basa en la realización de una lisis celular en condiciones alcalinas seguida de cromatografía de intercambio aniónico en una resina de sílice. Se obtienen preparaciones libres de endotoxinas, que en su presencia afectarían disminuyendo la eficiencia de transfección.

#### 4.1.1.3. Extracción de ADN a partir de tejido de ratón.

La extracción de ADN a partir de pequeñas muestras de tejidos murinos se realiza siguiendo diferentes protocolos en función del grado de purificación requerido para la posterior aplicación del ADN obtenido.

##### 4.1.1.3.1. Extracción de ADN genómico para el genotipado de animales.

Se utiliza este método para obtener ADN genómico de forma rápida y sencilla a partir de pequeñas muestras de oreja de ratón obtenidas tras el marcaje de identificación. Aunque esta metodología no permite obtener grandes cantidades de ADN y el nivel de pureza no es demasiado elevado, resulta suficiente y útil para el posterior genotipado de animales por PCR. El protocolo consiste en:

- Digerir el tejido mediante la adición de 400 µl de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 0.5% (p/v) SDS) y 8 µl de proteinasa K (20 mg/ml).
- Mezclar bien mediante vórtex e incubar un mínimo de 5 horas en un baño a 55 °C (puede dejarse toda la noche (ON)).
- Añadir 75 µl de acetato potásico 8 M y mezclar.
- Añadir 500 µl de cloroformo y mezclar.
- Centrifugar 5 minutos a 13000 xg (las centrifugaciones pueden hacerse a 4 °C o a temperatura ambiente (TA)).



- Transferir la fase acuosa superior (~ 450 µl) a un tubo nuevo, añadir dos volúmenes (~ 900 µl) de etanol 100% y mezclar.
- Centrifugar 20 minutos a 13000 xg.
- Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 1 ml de etanol 75%.
- Centrifugar 10 minutos a 13000 xg.
- Eliminar el sobrenadante completamente y dejar secar el precipitado durante al menos 2 minutos (puede incubarse el tubo abierto a 55-65 °C para favorecer la evaporación).
- Resuspender el precipitado en 50 µl de ddH<sub>2</sub>O (o Tris 10 mM pH 8).
- Incubar el tubo cerrado 10 minutos a 55-65 °C para favorecer la completa disolución del ADN.
- Congelar a -20 °C hasta su posterior uso.

#### **4.1.1.3.2. Extracción de ADN total mediante kit comercial.**

Se utiliza el kit comercial *QIAmp® DNA Mini Kit (51306, QIAGEN)*. Este método permite la purificación de ADN total (genómico, mitocondrial y viral) de hasta 50 kb a partir de pequeñas muestras de tejidos murinos de forma rápida y eficiente. En este caso se realiza una lisis celular con proteinasa K seguida de una cromatografía en gel de sílice y se favorece sobre todo la purificación de fragmentos de entre 20-30 kb.

#### **4.1.1.3.3. Extracción por Fenol-Cloroformo.**

Se utiliza el método basado en el descrito por Sambrook y colaboradores<sup>213</sup>. El protocolo es el siguiente:

- Añadir a la muestra (~ 20 mg tejido) 50 µl de proteinasa K (concentración inicial 20 mg/ml) y 200 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7.8, EDTA 5 mM, 0.5% (p/v) SDS).
- Mezclar bien mediante vórtex e incubar a 50 °C 2 horas o ON a 37 °C.
- Añadir 25 µl de NaCl 5 M y mezclar por inversión.
- Añadir un volumen (275 µl) de fenol y mezclar fuertemente por inversión.
- Centrifugar 10 minutos a 20000 xg y 4 °C.
- Recuperar la fase acuosa y transferirla a un nuevo tubo.
- Añadir 250 µl de alcohol isoamílico:cloroformo (1:24, SEVAG) y 250 µl de fenol.
- Mezclar por inversión y centrifugar durante 10 minutos a 20000 xg y 4 °C.
- Recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo y añadir 500 µl de SEVAG.
- Mezclar por inversión y centrifugar 10 minutos a 20000 xg y 4 °C.
- Recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo y precipitar el ADN añadiendo 1 ml de isopropanol frío (guardado a -20 °C).
- Mezclar suavemente por inversión e incubar en hielo 10 minutos.
- Centrifugar 20 minutos a 20000 xg a 4 °C.
- Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 1 ml de etanol al 70%.
- Centrifugar 10 minutos a 20000 xg a 4 °C.
- Eliminar completamente el sobrenadante y dejar secar el precipitado a TA.
- Resuspender el ADN en 30-50 µl de agua estéril o Tris 10 mM pH 8 e incubar a TA durante 4-6 horas (puede dejarse ON).
- Almacenar a -20 °C hasta su posterior uso.

#### 4.1.1.3.4. Extracción por Hirt.

Este método, adaptado del método clásico de Hirt<sup>214</sup>, favorece la purificación de moléculas de ADN de bajo peso molecular. El protocolo de extracción consiste en:

- Añadir 10 µl tampón de digestión (Tris-HCl 20 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8, 0.6% (p/v) SDS) y proteinasa K (concentración final 0.2 mg/ml) por cada mg de tejido (~ 20 mg).
- Incubar ON a 50 °C en agitación (aproximadamente 120 rpm).
- Una vez digerida la muestra, ajustar la concentración de NaCl a 1 M (a partir de una dilución 5X) e incubar la muestra en hielo durante 3 horas o ON a 4 °C.
- Centrifugar durante 30 minutos a >14000 xg y 4 °C.
- Recuperar el sobrenadante y transferir a un nuevo tubo.
- Añadir un volumen de agua desionizada para reducir la concentración de sales.
- Añadir un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1).
- Mezclar por inversión y centrifugar 10 minutos a 300 xg y TA.
- Recuperar la fase acuosa superior en un nuevo tubo y precipitar el ADN añadiendo dos volúmenes de etanol 100%.
- Centrifugar 10 minutos a >14000 xg y TA.
- Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 1 ml de etanol 70%.
- Centrifugar 10 minutos a >14000 xg y TA.
- Decantar el sobrenadante y dejar secar el precipitado 5 minutos a TA.
- Resuspender el ADN en 30-50 µl de agua desionizada y RNAsa A (concentración final 100 µg/ml).
- Almacenar a -20 °C hasta su uso.

#### 4.1.2. Cuantificación de ADN.

Independientemente del método de extracción utilizado, se determina la concentración del ADN obtenido en el espectrofotómetro *NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies)*. Para ello, se cargan 2 µl de muestra en el pedestal inferior del aparato, se baja el brazo de muestreo y se lee la absorbancia a 260 nm. A esta longitud de onda se calcula la concentración de ADN a partir de la ley de Lambert-Beer:

$$c = (A \cdot e) / b$$

Donde **c** equivale a la concentración de ADN en ng/µl, **A** a la absorbancia a 260 nm en AU, **e** al inverso del coeficiente de extinción a 260 nm en ng·cm/µl (50 ng·cm/µl para ADN de doble cadena) y **b** a la longitud de la trayectoria de la luz en cm.

Al margen de la concentración, se determina también la pureza de la muestra mediante el cociente  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  que debe tener un valor de aproximadamente 1.8. Ratios inferiores indican presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que absorben a 280 nm. Adicionalmente, se calcula también la pureza del ADN a partir de la ratio  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ , que debe tener valores superiores a la ratio  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  situándose en torno a 1.8-2.2.

#### 4.1.3. Cuantificación de proteína.

La determinación de proteína en los homogenados de las diferentes muestras se realiza mediante una variante del método clásico de Bradford<sup>215</sup>.

Para ello, se parte de una solución de albúmina a una concentración de 2 mg/ml y se prepara una curva patrón realizando un banco de diluciones seriadas en un tampón idéntico al que contienen las muestras. Concretamente, se preparan diluciones a las siguientes concentraciones: 0.3, 0.25, 0.15, 0.1 y 0.05 mg/ml.

Posteriormente, se cargan por triplicado 8 µl de cada muestra y de cada uno de los puntos de la curva patrón en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Seguidamente se añaden 200 µl de *Coomassie Protein Assay Reagent* (Prod# 1856209, Thermo Scientific). Este reactivo contiene un colorante hidrofóbico que presenta diferente coloración en función del medio en el cual se encuentra: color marronoso en medio acuoso y color azul en entrono hidrofóbico (como puede ser el interior de una proteína). Así pues, al incubar el reactivo con las muestras se obtiene una intensidad variable de tonos azules que es directamente proporcional a la cantidad de proteína. Una vez realizada la mezcla se incuba 5 minutos a TA y se determina la absorbancia a una longitud de onda de 590 nm.

Finalmente se calcula la concentración de proteína mediante interpolación de los valores de absorbancia obtenidos en la curva patrón.

#### **4.1.4. Electroforesis en gel de agarosa.**

La electroforesis en gel horizontal de agarosa permite separar fragmentos de ADN en función del tamaño y la estructura de los mismos y se utiliza para comprobar que los productos resultantes de amplificaciones por PCR o digestiones con enzimas de restricción presentan el tamaño esperado, permitiendo también purificar un fragmento en particular.

Para llevar a cabo la electroforesis se cargan las muestras a una dilución adecuada en tampón de carga 1X (*Orange G, 08756 Sigma Aldrich*) en un gel de agarosa cuya concentración depende del tamaño de las bandas esperadas. La electroforesis se realiza en tampón TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8) aplicando un voltaje de unos 100 V y durante un tiempo que depende del tamaño de las bandas que se pretenden separar. Una vez transcurrido el tiempo necesario, se visualizan las bandas exponiendo el gel a una fuente ultravioleta.

## **4.2. Técnicas de clonaje.**

### **4.2.1. Estrategias de clonaje.**

La secuencia del cADN del gen terapéutico *TYMP* clonado en los diferentes vectores se ha obtenido mediante digestión y purificación de plásmidos disponibles en el laboratorio. No obstante, en un primer momento se partió del clon IRAT p970B1069D6 de la librería de cADN *IRAT Mammalian Gene Collection Verifies Full Length Human* (adquirido en RZPD), que contenía el cADN completo del gen humano *TYMP*. Se amplificó el fragmento codificante, excluyendo la cola de poliA, mediante PCR y se clonó en el vector pCR4-TOPO TA usando el kit *TOPO TA Cloning kit for sequencing* (Invitrogen).

#### **4.2.1.1. Construcción del vector AAV2/8-TBG-TYMP.**

La construcción del vector AAV2/8-TBG-TYMP se llevó a cabo en el grupo del Dr. Massimo Zeviani (MRC-Mitochondrial Biology Unit, Cambridge, UK) en colaboración con nuestro grupo de investigación<sup>100</sup>. Por este motivo no se describirán los detalles del clonaje en esta tesis. Brevemente, se amplifica la secuencia de ADN codificante del gen *TYMP* humano mediante PCR y posteriormente

se clona en el vector *Pcr2.1 TOPO* (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se verifica la secuencia del plásmido resultante y se digiere con la enzima *EagI* para obtener el cADN de *TYMP*, que se clona en el plásmido *AAV2/8-TBG* digerido con la misma enzima.

#### 4.2.1.2. Construcción del vector AAV2/8-PGK-TYMP.

Para la obtención del vector AAV2/8-PGK-TYMP fueron necesarios varios subclonajes intermedios que pueden dividirse en tres grandes bloques:

- Obtención del vector *pSMD2-pA*:

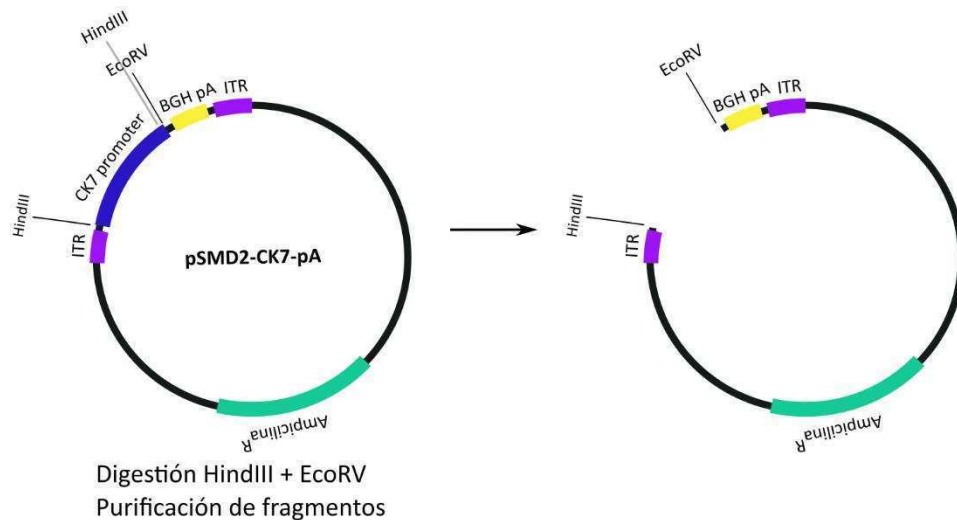


Figura 4.1. Obtención del plásmido *pSMD2-pA*.

Se parte del plásmido *pSMD2-CK7-pA* (4851 pb) disponible en nuestro grupo de investigación. Mediante digestión del plásmido con las enzimas *HindIII* y *EcoRV* se elimina el fragmento correspondiente a la secuencia del promotor del gen *CK7* (567 pb) y se purifica el fragmento correspondiente a la secuencia *pSMD2-pA* (4270 pb). Esta secuencia permite obtener ITRs de AAV de serotipo 2 junto con la secuencia correspondiente a la señal de poliadenilación *BGH* (Figura 4.1).

- Obtención del plásmido *pSMD2-stuffer-pA*.

Para dar al vector adeno-asociado el tamaño mínimo que éste necesita para ser encapsidado es necesario incorporar un fragmento de ADN no codificante. En este caso se incorpora la secuencia correspondiente al *intrón 3 del gen TK1* (1870 pb). En primer lugar, se amplifica dicha secuencia mediante PCR a partir de una muestra de ADN genómico y posteriormente se clona en el vector *TOPO-TA* (Invitrogen), de manera que obtenemos el plásmido *TOPO-TA-stuffer*, que se digiere con las enzimas *HindIII* y *EcoRV* con el fin de obtener la secuencia correspondiente al ADN intrónico flanqueada por extremos compatibles con los del fragmento *pSMD2-pA*. De esta forma se obtiene el plásmido *pSMD2-stuffer-pA* (6219 pb) después de ligar ambos fragmentos (Figura 4.2).

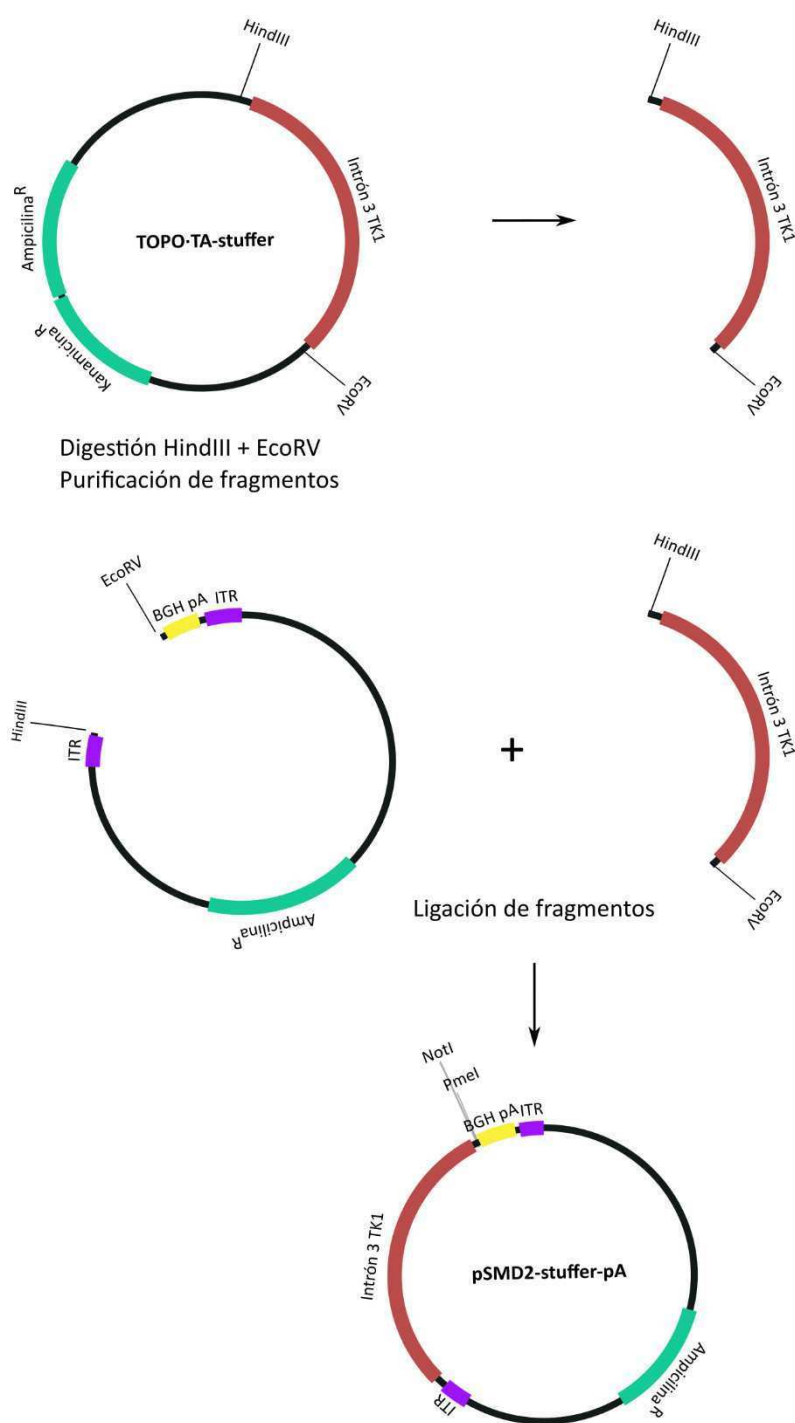
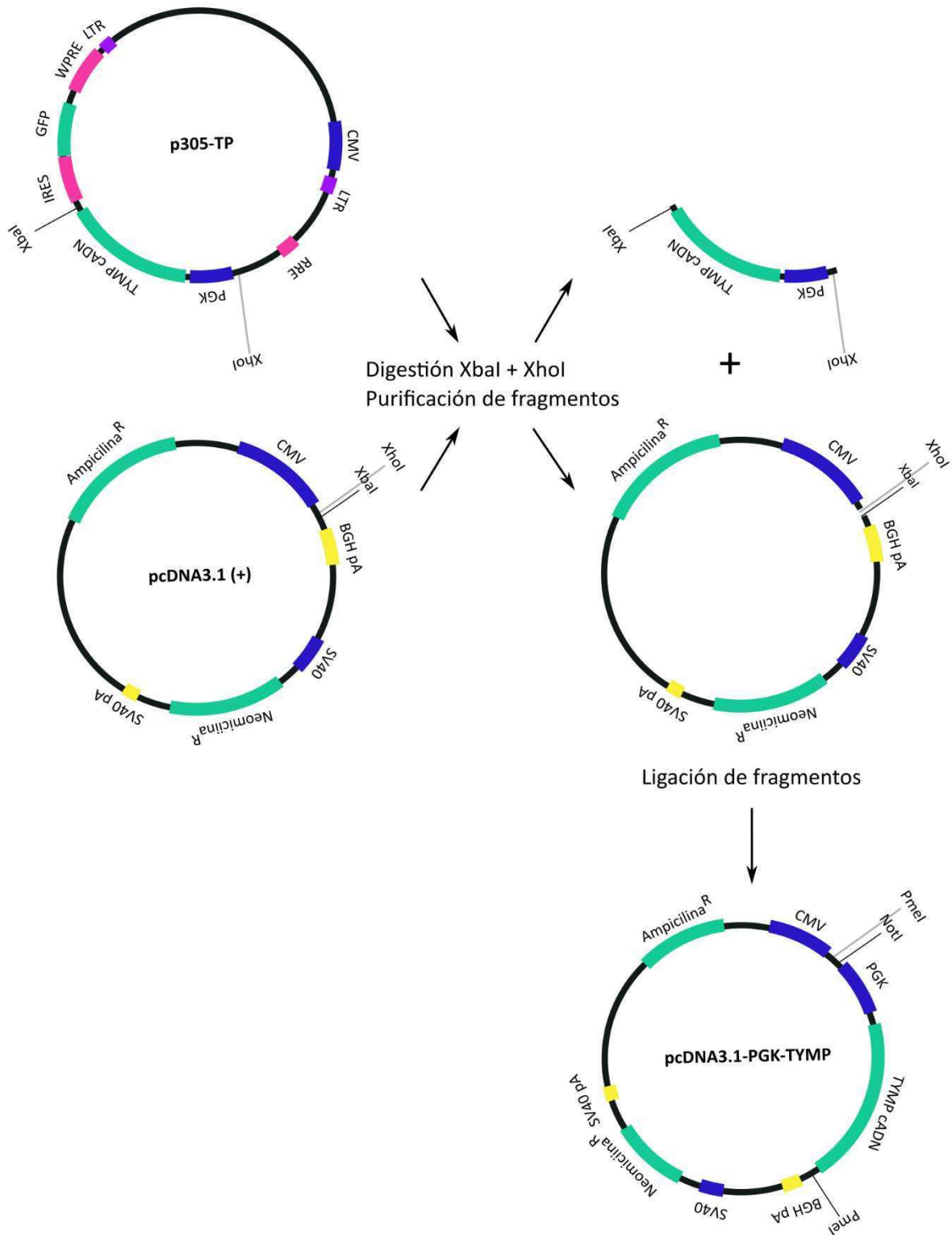


Figura 4.2. Obtención del plásmido pSMD2-stuffer-pA.

- Obtención del plásmido *pSMD2-stuffer-PGK-TYMP-pA*:

Se parte del vector p305-TP (10.1 kb) disponible en nuestro laboratorio<sup>98</sup>. Mediante digestión del plásmido con las enzimas XhoI y XbaI se obtiene el fragmento de secuencia que contiene el promotor humano *PGK* y el cADN del gen terapéutico *TYMP* (2996 pb), y se clona en el plásmido *pcDNA3.1(+)* (5428 pb) previamente digerido con las mismas enzimas de restricción para generar extremos compatibles. De esta forma se obtiene el plásmido *pcDNA3.1-PGK-TYMP* (7624 pb), que posteriormente se digiere con las enzimas NotI y PmeI para poder obtener la secuencia *PGK-TYMP* (2223 pb) con extremos que nos permitan su clonaje en el plásmido *pSMD2-stuffer-pA*, digerido con

las mismas enzimas. Finalmente se obtiene el plásmido *pSMD2-stuffer-PGK-TYMP-pA* (8428 pb), a partir del cual se produce el vector AAV2/8-PGK-TYMP (4453 pb) (Figura 4.3).



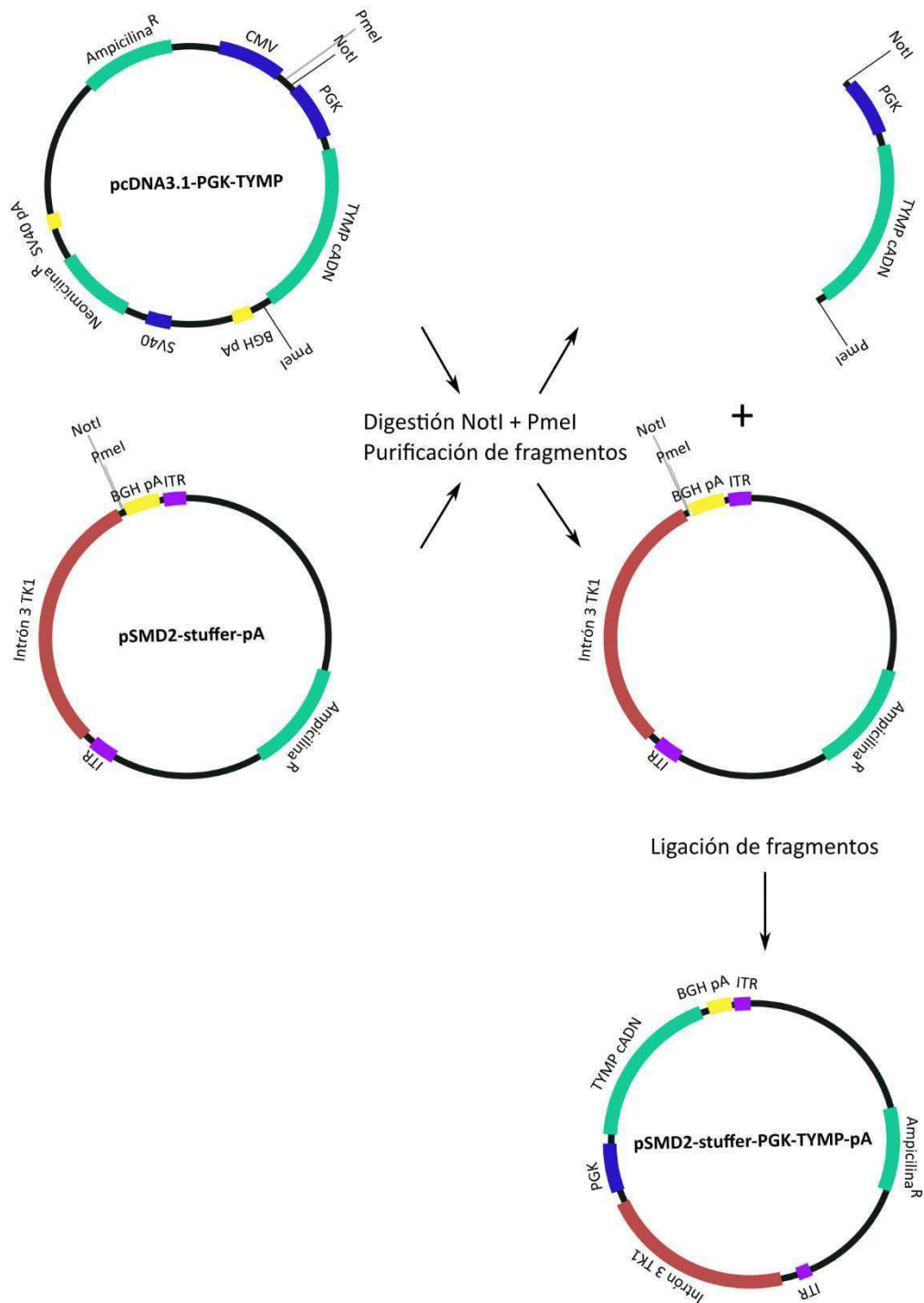


Figura 4.3. Obtención del plásmido pSMD2-stuffer-PGK-TYMP-pA.

#### 4.2.1.3. Construcción del vector scAAV2/8-HLP-TYMP.

Para la obtención del vector scAAV2/8-HLP-TYMP fueron necesarios varios subclonajes intermedios que pueden dividirse en tres grandes bloques:

- Obtención del plásmido *pcDNA3.1(+)-TYMP*:

Se parte del plásmido *pBSK-TYMP* (4577 pb) disponible en nuestro grupo de investigación y se digiere con las enzimas NotI y XhoI para obtener el cADN de *TYMP*. El resultado de la digestión se separa en

un gel preparativo y se purifica la banda de 1689 pb que posteriormente se clona en el vector *pcDNA3.1 (+)* (5428 pb) previamente digerido con las mismas enzimas (Figura 4.4).

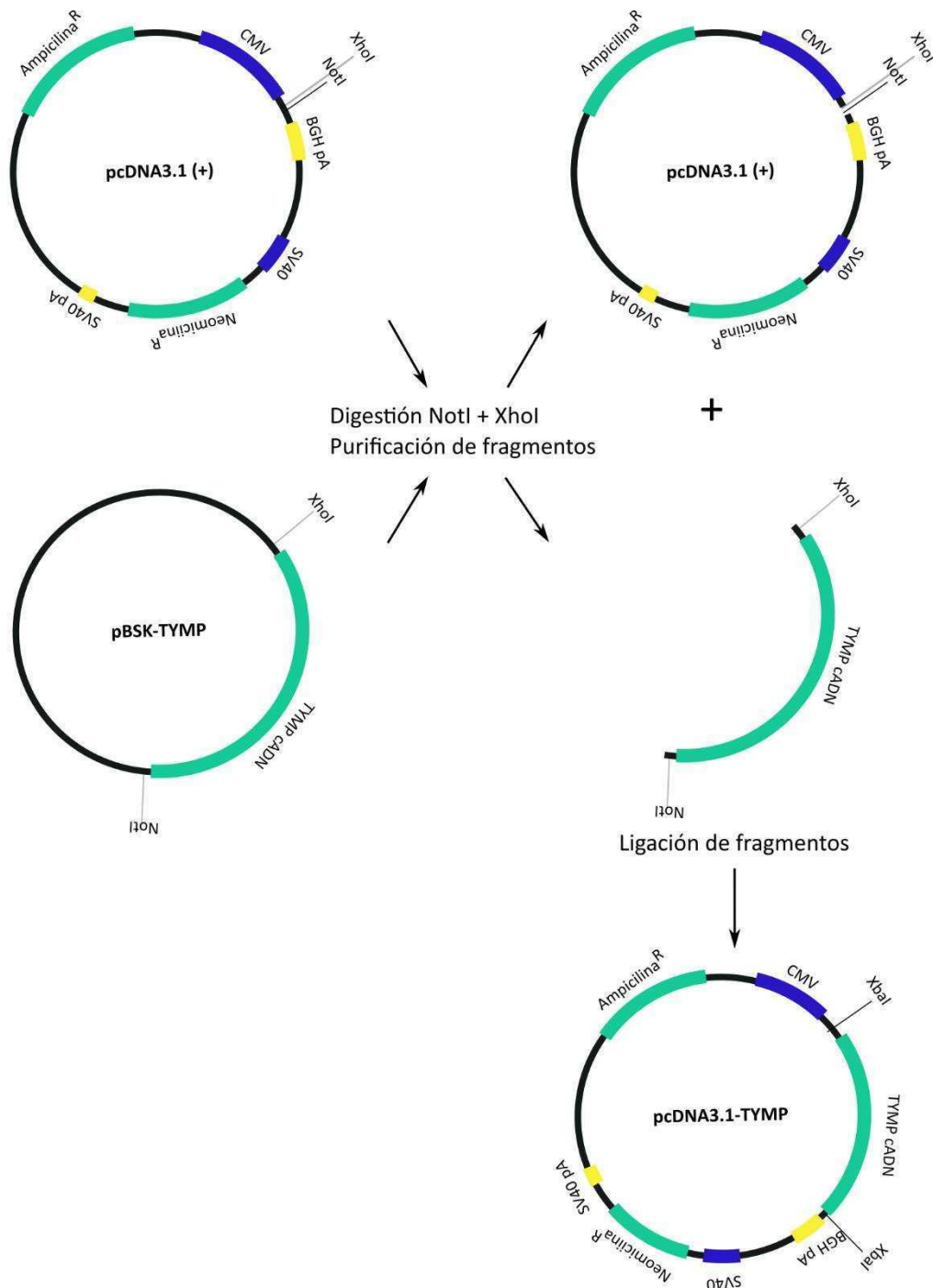


Figura 4.4. Obtención del plásmido *pcDNA3.1 (+)* -TYMP.

- Obtención del plásmido *pAV-HLP-TYMP*:

Se parte del plásmido *pAV-HLP-Luc* (6762 pb) proporcionado por el grupo del Dr. C Nathwani (University College London Cancer Institute, Londres) con el fin de obtener la secuencia del promotor híbrido de expresión hepática *HLP* (251 pb) que contiene una versión reducida del promotor *AAT*



precedido por la región potenciadora de la apolipoproteína E humana<sup>216</sup>. Se realiza una digestión del mismo con la enzima XbaI y se purifica el fragmento correspondiente a la secuencia *pAV-HLP* (4265 pb). Al mismo tiempo, se digiere el plásmido *pcDNA3.1-TYMP* (7111 pb) con la misma enzima XbaI y se purifica el fragmento correspondiente al cADN del gen *TYMP* (1688 pb). Por último, se obtiene el plásmido *pAV-HLP-TYMP* (5953 pb) mediante ligación de ambos fragmentos (Figura 4.5).

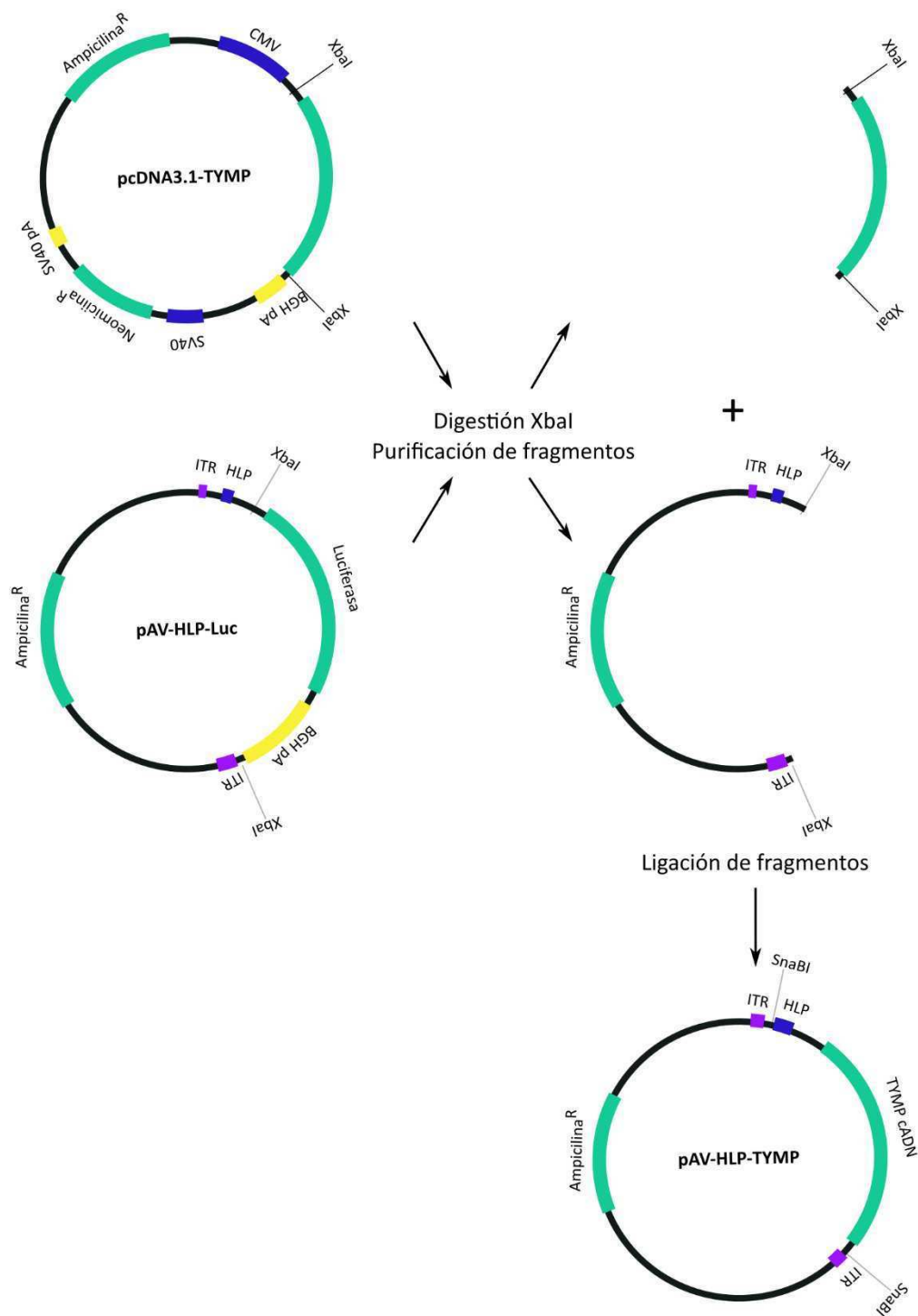


Figura 4.5. Obtención del plásmido *pAV-HLP-TYMP*.

- Obtención del plásmido *scAAV-HLP-TYMP-pA*:

Se obtiene el plásmido *scAAV-ITR-pA* (3019 pb) mediante síntesis química prediseñada (plataforma *GeneArt, Lifetechnologies*). Concretamente, se sintetizan los siguientes elementos: ITR 3' y 5' correspondientes a serotipo 2 de conformación *self-complementary*, zona de clonación múltiple que nos permita tener las dianas necesarias para la introducción del fragmento *HLP-TYMP* y secuencia codificante para la señal de poliadenilación *BGH*. Los plásmidos *scAAV-ITR-pA* y *pAV-HLP-TYMP* se digieren con la enzima *SnaBI* y se purifican las bandas de 3019 y 2027 pb, respectivamente. Finalmente, se ligan ambos fragmentos y se obtiene el plásmido *scAAV-HLP-TYMP-pA* (5046 pb), a partir del cual se produce el vector *scAAV2/8-HLP-TYMP* (Figura 4.6).

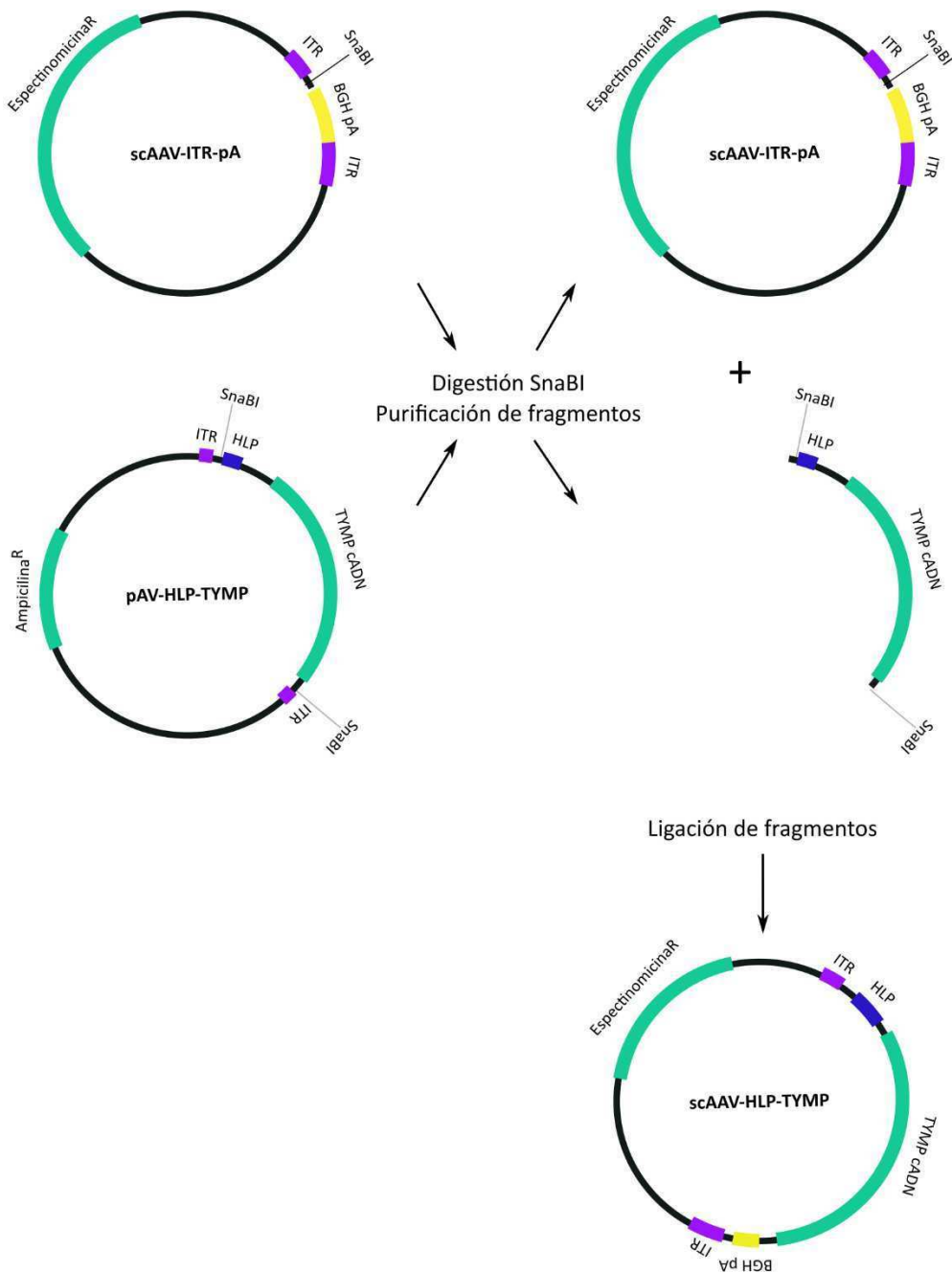
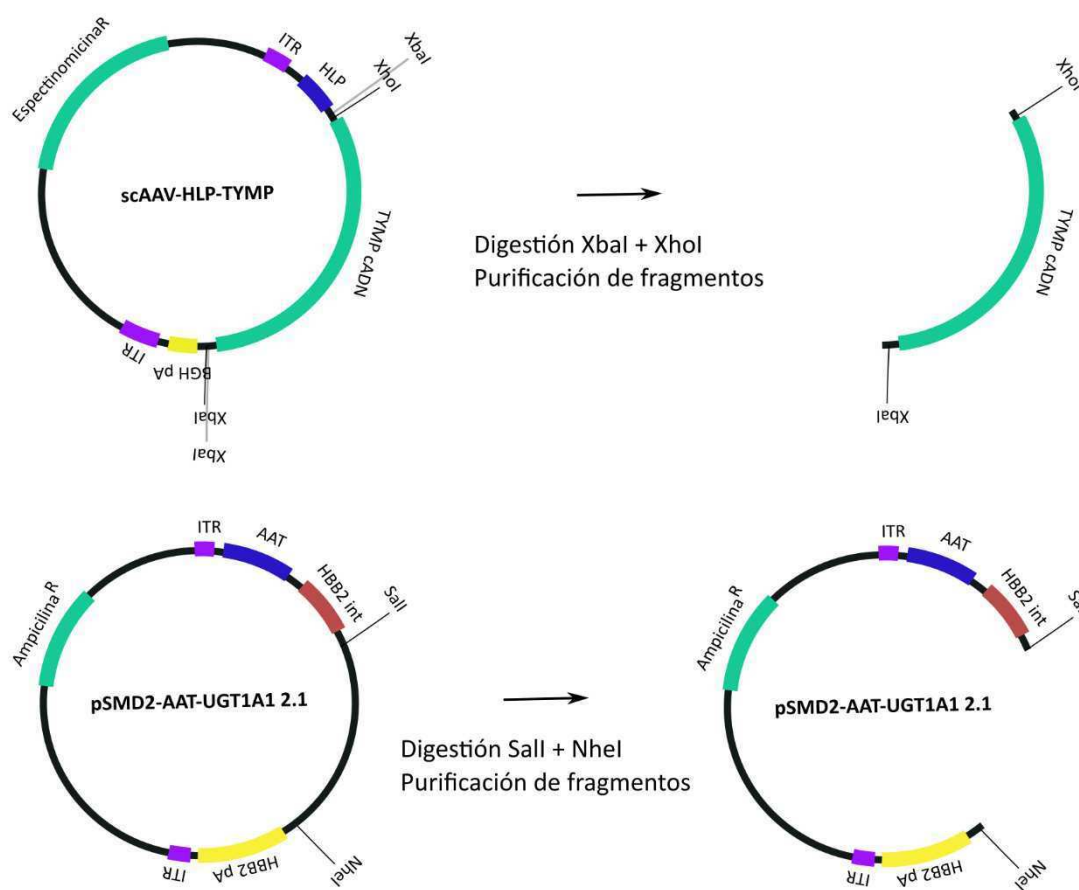


Figura 4.6. Obtención del plásmido *scAAV-HLP-TYMP*.

#### 4.2.1.4. Construcción del vector AAV2/8-AAT-TYMP.

Para la obtención del vector AAV2/8-AAT-TYMP, se parte del plásmido *pSMD2-AAT-UGT1A1 2.1* (7703 pb), proporcionado por el Dr. Federico Mingozzi (Genethon, Francia). Este plásmido contiene la secuencia correspondiente al promotor de la AAT humana y la región de regulación hepática *ApoE*, una región intrónica del gen *HBB2* y la señal de poliadenilación de dicho gen. Además, presenta la secuencia correspondiente a ITRs de AAV de serotipo 2.



**Figura 4.7. Obtención de fragmentos para la construcción del plásmido *pSMD2-AAT-TYMP*.**

Para la obtención del vector terapéutico, se digiere el plásmido *scAAV-HLP-TYMP-pA* (5046 pb) (*apartado 4.2.1.3*) con las enzimas *XbaI* i *XhoI* y se purifica la banda correspondiente al gen *TYMP* (1681 pb). Paralelamente, se digiere el plásmido *pSMD2-AAT-UGT1A1 2.1* con las enzimas *Sall* y *NheI* para generar extremos compatibles que nos permitan la clonación del gen terapéutico y se purifica el fragmento de 6096 pb (*Figura 4.7*). Finalmente se ligan ambos fragmentos y se obtiene el plásmido *pSMD2-AAT-TYMP* (7771 pb), a partir del cual se produce el vector AAV2/8-AAT-TYMP (4128 pb) (*Figura 4.8*).

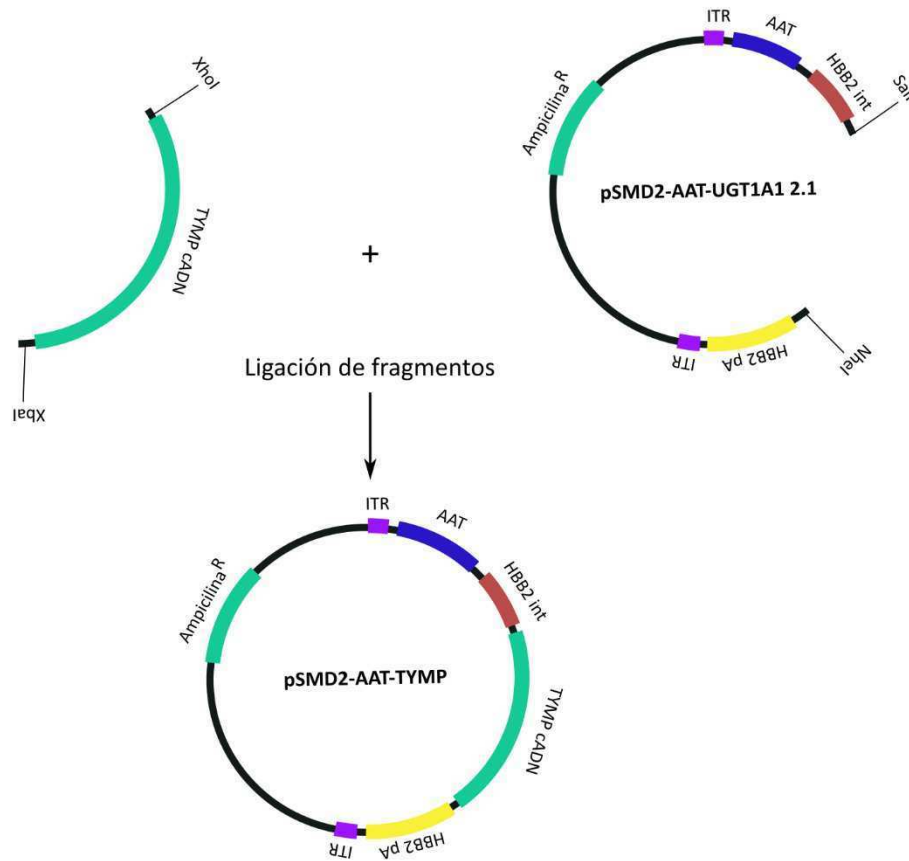


Figura 4.8. Construcción del plásmido pSMD2-AAT-TYMP.

#### 4.2.2. Cultivo de bacterias.

Las expansiones coloniales se cultivan en medio Luria-Bertani (LB) líquido (*Luria Broth Base, 12795-027 Invitrogen*) suplementado con el antibiótico de selección pertinente a una concentración final de 100 µg/ml. El crecimiento se lleva a cabo a 37 °C y 180 rpm en recipientes estériles de volumen suficiente como para asegurar la correcta oxigenación del cultivo. La selección de clones se realiza en placas de LB-agar (*Bacto™ Agar, 214010 Becton Dickinson*) a una concentración del 2% (p/v) suplementado también con el mismo antibiótico a una concentración de 100 µg/ml y a 37 °C. Los clones seleccionados se congelan en 1 ml de glicerol al 75% en LB (v/v) y se almacenan a -80 °C.

#### 4.2.3. Digestión con enzimas de restricción.

Para llevar a cabo la construcción de los diferentes vectores se realizan digestiones con enzimas de restricción de los siguientes plásmidos:

- **pSMD2-CK7-pA.** Se realiza una digestión doble con las enzimas HindIII y EcoRV para eliminar el fragmento del promotor CK7. Se espera obtener 3 fragmentos de 4270, 567 y 14 pb. La composición de la reacción de restricción es la siguiente:

*Tabla 4.1. Composición de la reacción de digestión.*

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
<b>Tampón NEB2<sup>1</sup> 10X</b>	1.5	1X
<b>BSA 10 μg/μl</b>	1.5	1 μg/μl
<b>HindIII<sup>2</sup></b>	2	2.67 unidades/μl
<b>EcoRV<sup>3</sup></b>	2	2.67 unidades/μl
<b>ADN (726.8 ng/μl)</b>	7	340 ng/μl
<b>Agua</b>	1	-
<b>Volumen final</b>	15	-

<sup>1</sup> 500 mM NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 100 mM Tris-HCl, pH 7.9

<sup>2</sup> HindIII 20000 unidades/ml, *New England Biolabs*

<sup>3</sup> EcoRV 20000 unidades/ml, *New England Biolabs*

La digestión se lleva a cabo durante 8 horas a 37 °C y se inactiva durante 20 minutos a 80 °C. El producto de digestión se separa por electroforesis en gel de agarosa (*apartado 4.1.4*) y se purifica el fragmento de 4270 pb (*apartado 4.2.4*).

- **TOPO TA-stuffer.** Se realiza una digestión doble con las enzimas HindIII y EcoRV para aislar el fragmento del intrón. Se esperan dos bandas de 3852 y 1949 pb.

*Tabla 4.2. Composición de la reacción de digestión.*

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
<b>Tampón NEB2<sup>1</sup> 10X</b>	1.5	1X
<b>BSA 10 μg/μl</b>	1.5	1 μg/μl
<b>HindIII<sup>2</sup></b>	2	2.67 unidades/μl
<b>EcoRV<sup>3</sup></b>	2	2.67 unidades/μl
<b>ADN (726.8 ng/μl)</b>	7	340 ng/μl
<b>Agua</b>	1	-
<b>Volumen final</b>	15	-

<sup>1</sup> 500 mM NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 100 mM Tris-HCl, pH 7.9

<sup>2</sup> HindIII 20000 unidades/ml, *New England Biolabs*

<sup>3</sup> EcoRV 20000 unidades/ml, *New England Biolabs*

Igual que en el caso anterior, la digestión se lleva a cabo durante 8 horas a 37 °C y se inactiva durante 20 minutos a 80 °C. El producto de digestión se separa por electroforesis en gel de agarosa y se purifica el fragmento de 1949 pb.

- **pSMD2-stuffer-pA.** En primer lugar, se realizan dos digestiones independientes con XhoI y SnaBI para comprobar la correcta incorporación del intrón en el plásmido pSMD2-pA. Las bandas esperadas son de 5378 y 841 pb para la digestión con XhoI y de 2245 y 3974 para SnaBI. La digestión se lleva a cabo durante 2 horas a 37 °C y el producto de digestión se separa en un gel de agarosa al 1% (p/v).

**Tabla 4.3. Composición de la reacción de digestión.**

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
<b>Tampón NEB4<sup>1</sup> 10X</b>	3	1X
<b>BSA 10 μg/μl</b>	3	1 μg/μl
<b>XhoI<sup>2</sup> /SnaBI<sup>3</sup></b>	0.5	0.33/0.08 unidades/μl
<b>ADN (49.6 ng/μl)</b>	10	16.5 ng/μl
<b>Agua</b>	13.5	-
<b>Volumen final</b>	30	-

<sup>1</sup> 500 mM CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K, 100 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 200 mM Tris-Acetato, pH 7.9

<sup>2</sup> XhoI 20000 unidades/ml, *New England Biolabs*

<sup>3</sup> SnaBI 5000 unidades/ml, *New England Biolabs*

Una vez comprobada la correcta incorporación del intrón, se digiere el plásmido pSMD2-stuffer-pA con las enzimas NotI y PmeI simultáneamente para posteriormente poder clonar el fragmento PGK-TYMP entre la secuencia intrónica y la señal de poliadenilación. Se esperan dos bandas de 6205 y 14 pb.

**Tabla 4.4. Composición de la reacción de digestión.**

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
<b>Tampón NEB2<sup>1</sup> 10X</b>	4	1X
<b>BSA 10 μg/μl</b>	4	1 μg/μl
<b>NotI<sup>2</sup></b>	2	0.5 unidades/μl
<b>PmeI<sup>3</sup></b>	2	0.5 unidades/μl
<b>ADN (147.1 ng/μl)</b>	28	103 ng/μl
<b>Volumen final</b>	40	-

<sup>1</sup> 500 mM NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 100 mM Tris-HCl, pH 7.9

<sup>2</sup> NotI 10000 unidades/ml, *New England Biolabs*

<sup>3</sup> PmeI 10000 unidades/ml, *New England Biolabs*

La reacción se realiza ON a 37 °C y se inactiva durante 20 minutos a 65 °C. El producto de digestión se separa por electroforesis y se purifica la banda de 6205 pb.

- **pcDNA3.1 (+)**. Se realiza una doble digestión con las enzimas XbaI y XhoI para clonar el fragmento PGK-TYMP obtenido del plásmido p305-TP. Se esperan dos fragmentos de 5422 y 6 pb.

**Tabla 4.5. Composición de la reacción de digestión.**

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
<b>Tampón NEB2<sup>1</sup> 10X</b>	3	1X
<b>BSA 10 μg/μl</b>	3	1 μg/μl
<b>XbaI<sup>2</sup></b>	1	0.5 unidades/μl
<b>XhoI<sup>3</sup></b>	1	0.67 unidades/μl
<b>ADN (862 ng/μl)</b>	1.2	34.5 ng/μl
<b>Agua</b>	20.8	-
<b>Volumen final</b>	30	-

<sup>1</sup> 500 mM NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 100 mM Tris-HCl, pH 7.9

<sup>2</sup> XbaI 15000 unidades/ml, *Takara*

<sup>3</sup> XhoI 20000 unidades/ml, *New England Biolabs*

La reacción se lleva a cabo durante 45 minutos a 37 °C. A continuación, se defosforila el producto de digestión para evitar que los fragmentos resultantes vuelvan a reanillar (no se realiza purificación en gel preparativo). Para esto se añade, a la reacción anterior, 1 µl de fosfatasa antártica (10000 unidades/ml, *New England Biolabs*), se incuba durante 30 minutos a 37 °C y se inactiva mediante incubación a 65 °C durante 5 minutos.

- **p305-TP.** Se digiere simultáneamente con las enzimas XbaI y XhoI para purificar el fragmento PGK-TYMP. Se esperan dos bandas de 7.9 y 2.2 kb.

*Tabla 4.6. Composición de la reacción de digestión.*

Reactivo	Volumen (µl)	Concentración final
<b>Tampón NEB2<sup>1</sup> 10X</b>	3	1X
<b>BSA 10 µg/µl</b>	3	1 µg/µl
<b>XbaI<sup>2</sup></b>	1	0.5 unidades/µl
<b>XhoI<sup>3</sup></b>	1	0.67 unidades/µl
<b>ADN (1.1 µg/µl)</b>	5.6	0.21 µg/µl
<b>Agua</b>	16.4	-
<b>Volumen final</b>	30	-

<sup>1</sup> 500 mM NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 100 mM Tris-HCl, pH 7.9

<sup>2</sup> XbaI 15000 unidades/ml, *Takara*

<sup>3</sup> XhoI 20000 unidades/ml, *New England Biolabs*

La reacción se lleva a cabo a 37 °C ON. El producto de digestión se separa en un gel preparativo de agarosa al 0.8% (p/v) y se purifica la banda de 2.2 kb.

- **pcDNA 3.1-PGK-TYMP.** En primer lugar, se realiza una digestión con NaeI para comprobar la correcta incorporación del fragmento PGK-TYMP en el plásmido pcDNA3.1 (+). Se esperan 4 bandas de 5170, 1341, 830 y 283 pb.

*Tabla 4.7. Composición de la reacción de digestión.*

Reactivo	Volumen (µl)	Concentración final
<b>Tampón NEB4<sup>1</sup> 10X</b>	3	1X
<b>NaeI<sup>2</sup></b>	0.5	0.17 unidades/µl
<b>ADN (140.8 ng/µl)</b>	3.6	16.9 ng/µl
<b>Agua</b>	23	-
<b>Volumen final</b>	30	-

<sup>1</sup> 500 mM CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K, 100 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 200 mM Tris-Acetato, pH 7.9

<sup>2</sup> NaeI 10000 unidades/ml, *New England Biolabs*.

La reacción se lleva a cabo durante dos horas a 37 °C. El producto de digestión se separa por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% (p/v).

Una vez comprobado que el plásmido pcDNA3.1-PGK-TYMP es correcto, se realiza una doble digestión del mismo con las enzimas NotI y PmeI para aislar el fragmento PGK-TYMP, que posteriormente se clona en el plásmido pSMD2-stuffer-pA digerido con las mismas enzimas. Se esperan 3 bandas de 5327, 2223 y 75 pb.

**Tabla 4.8. Composición de la reacción de digestión.**

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
<b>Tampón NEB2<sup>1</sup> 10X</b>	1.2	1X
<b>BSA 10 μg/μl</b>	1.2	1 μg/μl
<b>NotI<sup>2</sup></b>	2	1.67 unidades/μl
<b>PmeI<sup>3</sup></b>	2	1.67 unidades/μl
<b>ADN (789 ng/μl)</b>	5	329 ng/μl
<b>Agua</b>	0.6	-
<b>Volumen final</b>	12	-

<sup>1</sup> 500 mM NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 100 mM Tris-HCl, pH 7.9

<sup>2</sup> NotI 10000 unidades/ml, *New England Biolabs*

<sup>3</sup> PmeI 10000 unidades/ml, *New England Biolabs*

La reacción se realiza ON a 37 °C y se inactiva durante 20 minutos a 65 °C. El producto de digestión se separa por electroforesis y se purifica el fragmento de 2223 pb.

- **pSMD2-stuffer-PGK-TYMP-pA.** Se realizan dos digestiones independientes para comprobar la correcta incorporación del fragmento PGK-TYMP en el plásmido pSMD2-stuffer-pA. Concretamente, se realiza una digestión simultánea con las enzimas HindIII y AflII que debe dar lugar a tres bandas de 4864, 1966 y 1598 pb y paralelamente se realiza una digestión simple con la enzima NaeI, en la que se espera obtener dos fragmentos de 4501 y 3927 pb.

**Tabla 4.9. Composición de la reacción de digestión con HindIII y AflII.**

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
<b>Tampón NEB2<sup>1</sup> 10X</b>	3	1X
<b>BSA 10 μg/μl</b>	3	1 μg/μl
<b>HindIII<sup>2</sup></b>	0.5	0.33 unidades/μl
<b>AflII<sup>3</sup></b>	0.5	0.33 unidades/μl
<b>ADN (233.9 ng/μl)</b>	2.1	16.4 ng/μl
<b>Agua</b>	20.9	-
<b>Volumen final</b>	30	-

<sup>1</sup> 500 mM NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 100 mM Tris-HCl, pH 7.9

<sup>2</sup> HindIII 20000 unidades/ml, *New England Biolabs*

<sup>3</sup> AflII 20000 unidades/ml, *New England Biolabs*

**Tabla 4.10. Composición de la reacción de digestión con NaeI.**

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
<b>Tampón L<sup>1</sup> 10X Takara</b>	3	1X
<b>NaeI<sup>2</sup></b>	0.5	0.17 unidades/μl
<b>ADN (233.9 ng/μl)</b>	2.1	16.4 ng/μl
<b>Agua</b>	24.4	-
<b>Volumen final</b>	30	-

<sup>1</sup> 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5

<sup>2</sup> NaeI 10000 unidades/ml, *Takara*

Las reacciones se llevan a cabo a 37 °C durante 2 horas. Posteriormente, se separan los productos de digestión por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.



Una vez comprobada la correcta inserción del fragmento PGK-TYMP, se realizan dos digestiones adicionales del plásmido con las enzimas SnaBI y XmaI para comprobar la integridad de los ITRs ya que debido a la conformación de la secuencia de ADN resulta muy difícil secuenciarlos. Los tamaños de bandas esperados son de 4454 y 3974 pb en el caso de SnaBI y de 3702, 2829, 725, 410, 359, 240, 141 y 11 pb en el caso de la digestión con XmaI. Ambas digestiones se realizan a 37 °C durante 2 horas. Los productos de digestión se separan por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

**Tabla 4.11. Composición de la reacción de digestión.**

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
Tampón NEB4 <sup>1</sup> 10X	3	1X
BSA 10 μg/μl	3	1 μg/μl
SnaBI <sup>2</sup> /XmaI <sup>3</sup>	1	0.17/0.33 unidades/μl
ADN (233.9 ng/μl)	2.5	19.5 ng/μl
Agua	20.5	-
Volumen final	30	-

<sup>1</sup>500 mM CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K, 100 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 200 mM Tris-Acetato, pH 7.9

<sup>2</sup>SnaBI 5000 unidades/ml, *New England Biolabs*

<sup>3</sup>XmaI 10000 unidades/ml, *New England Biolabs*

- **pBSK-TYMP.** Se realiza una digestión doble con las enzimas NotI y XhoI con el fin de obtener el cADN del gen *TYMP* con extremos compatibles que permitan su clonaje en el plásmido pcDNA3.1 (+). Se esperan dos fragmentos de 2888 y 1689 pb.

**Tabla 4.12. Composición de la reacción de digestión.**

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
Tampón NEB3 <sup>1</sup> 10X	3.4	1X
BSA 10 μg/μl	3.4	1 μg/μl
NotI <sup>2</sup>	1.5	0.44 unidades/μl
XhoI <sup>3</sup>	1.5	0.88 unidades/μl
ADN (128.8 ng/μl)	23	87.1 ng/μl
Agua	1.2	-
Volumen final	34	-

<sup>1</sup>1 M NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM Tris-HCl, pH 7.9

<sup>2</sup>NotI 10000 unidades/ml, *New England Biolabs*

<sup>3</sup>XhoI 20000 unidades/ml, *New England Biolabs*

La reacción de digestión se realiza ON a 37 °C y se inactiva durante 20 minutos a 65 °C. El producto de digestión se separa por electroforesis y se purifica la banda de 1689 pb.

- **pcDNA 3.1 (+).** Se digiere con las enzimas NotI y XhoI con el fin de poder clonar el cADN de *TYMP*, obtenido a partir de la digestión del plásmido pBSK-TYMP. Se espera obtener dos fragmentos de 5422 y 6 pb. Igual que en el caso anterior, la reacción de digestión se realiza ON a 37 °C y se inactiva durante 20 minutos a 65 °C. El producto de digestión se separa por electroforesis y se purifica la banda de 5422 pb.

**Tabla 4.13. Composición de la reacción de digestión.**

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
<b>Tampón NEB3<sup>1</sup> 10X</b>	1	1X
<b>BSA 10 μg/μl</b>	1	1 μg/μl
<b>NotI<sup>2</sup></b>	1	1 unidad/μl
<b>XhoI<sup>3</sup></b>	1	2 unidades/μl
<b>ADN (1.48 μg/μl)</b>	5	0.74 μg/μl
<b>Agua</b>	1	-
<b>Volumen final</b>	10	-

<sup>1</sup> 1 M NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM Tris-HCl, pH 7.9

<sup>2</sup>NotI 10000 unidades/ml, *New England Biolabs*

<sup>3</sup>XhoI 20000 unidades/ml, *New England Biolabs*

- **pcDNA 3.1-TYMP.** Se realizan dos digestiones, una simple con XbaI y una doble con las enzimas XhoI y BglII, con el fin de comprobar la correcta inserción del cADN *TYMP* en el plásmido pcDNA3.1 (+) digerido con NotI y XhoI. En ambas digestiones se espera obtener dos fragmentos, de 1688 y 5423 pb en el caso de XbaI, y de 2676 y 4435 pb en la digestión doble XhoI/BglII. Las reacciones de digestión se realizan a 37 °C durante 2 horas y los productos resultantes se separan en un gel de agarosa al 1%.

**Tabla 4.14. Composición de la reacción de digestión con XbaI.**

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
<b>Tampón M<sup>1</sup> 10X Takara</b>	3	1X
<b>BSA 10 μg/μl</b>	3	1 μg/μl
<b>XbaI<sup>2</sup></b>	0.5	0.25 unidades/μl
<b>ADN (342.8 ng/μl)</b>	1.5	17.1 ng/μl
<b>Agua</b>	22	-
<b>Volumen final</b>	30	-

<sup>1</sup> 500 mM NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5

<sup>2</sup> XbaI 15000 unidades/ml, *Takara*

**Tabla 4.15. Composición de la reacción de digestión con XhoI y BglII.**

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
<b>Tampón NEB3<sup>1</sup> 10X</b>	3	1X
<b>BSA 10 μg/μl</b>	3	1 μg/μl
<b>BglII<sup>2</sup></b>	0.5	0.17 unidades/μl
<b>XhoI<sup>3</sup></b>	0.5	0.33 unidades/μl
<b>ADN (342.8 ng/μl)</b>	1.5	17.1 ng/μl
<b>Agua</b>	21.5	-
<b>Volumen final</b>	30	-

<sup>1</sup> 1 M NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM Tris-HCl, pH 7.9

<sup>2</sup>BglII 10000 unidades/ml, *New England Biolabs*

<sup>3</sup>XhoI 20000 unidades/ml, *New England Biolabs*

Una vez comprobada la correcta ligación del cADN del gen terapéutico en el vector de expresión pcDNA3.1, se digiere el plásmido resultante con la enzima XbaI para obtener el cADN de *TYMP* con extremos compatibles que permitan su posterior subclonaje en el plásmido pAV-HLP. Se esperan dos bandas de 5423 y 1688 pb.

**Tabla 4.16. Composición de la reacción de digestión.**

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
Tampón M <sup>1</sup> 10X Takara	6	1X
BSA 10 μg/μl	6	1 μg/μl
XbaI <sup>2</sup>	5	1.3 unidades/μl
ADN (106.7 ng/μl)	40	71.1 ng/μl
Agua	3	-
Volumen final	60	-

<sup>1</sup> 500 mM NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5

<sup>2</sup> XbaI 15000 unidades/ml, Takara

La mezcla de reacción se incuba 7 horas a 37 °C y se inactiva 15 minutos a 60 °C. Posteriormente, se separa el producto de digestión por electroforesis y se purifica la banda de 1688 pb.

- **pAV-HLP-Luc.** Se realiza una digestión del vector con la enzima XbaI con el fin de eliminar la secuencia codificante para el gen marcador luciferasa. Se esperan dos bandas de 4265 y 2497 pb.

**Tabla 4.17. Composición de la reacción de digestión.**

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
Tampón M <sup>1</sup> 10X Takara	6	1X
BSA 10 μg/μl	6	1 μg/μl
XbaI <sup>2</sup>	3	0.75 unidades/μl
ADN (61.3 ng/μl)	40	40.9 ng/μl
Agua	5	-
Volumen final	60	-

<sup>1</sup> 500 mM NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5

<sup>2</sup> XbaI 15000 unidades/ml, Takara

La mezcla de reacción se incuba durante 7 horas a 37 °C y se inactiva durante 15 minutos a 60 °C. Posteriormente, se separa el producto de digestión por electroforesis y se purifica la banda de 4265 pb.

- **pAV-HLP-TYMP.** Se realizan dos digestiones del vector para comprobar la correcta inserción del cADN *TYMP* en el vector pAV-HLP. Concretamente, se realiza una digestión con NaeI de la que se espera obtener dos bandas de 4876 y 1077 pb, y otra con SnaBI que ha de resultar en dos fragmentos de 3926 y 2027 pb. Ambas digestiones se realizan a 37 °C durante 3 horas y posteriormente se corren los productos de digestión en un gel de agarosa.

**Tabla 4.18. Composición de la reacción de digestión con NaeI.**

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
Tampón L <sup>1</sup> 10X Takara	3	1X
BSA 10 μg/μl	3	1 μg/μl
NaeI <sup>2</sup>	0.5	0.17 unidades/μl
ADN (77 ng/μl)	6.5	16.7 ng/μl
Agua	17	-
Volumen final	30	-

<sup>1</sup> 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5

<sup>2</sup> Nael 10000 unidades/ml, Takara

**Tabla 4.19. Composición de la reacción de digestión con SnaBI.**

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
Tampón NEB4 <sup>1</sup> 10X	3	1X
BSA 10 μg/μl	3	1 μg/μl
SnaBI <sup>2</sup>	0.5	83.3 unidades/ml
ADN (77 ng/μl)	6.5	16.7 ng/μl
Agua	17	-
Volumen final	30	-

<sup>1</sup> 500 mM CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K, 100 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 200 mM Tris-Acetato, pH 7.9

<sup>2</sup> SnaBI 5000 unidades/ml, New England Biolabs

Después de comprobar la correcta clonación del cADN *TYMP*, se digiere nuevamente el vector con SnaBI con el fin de obtener el fragmento HLP-TYMP para su posterior ligación en el plásmido scAAV-ITR-pA. En este caso, la digestión se realiza ON a 37 °C y se inactiva mediante incubación a 60 °C durante 15 minutos. El producto de digestión se separa por electroforesis y se purifica la banda de 2027 pb.

**Tabla 4.20. Composición de la reacción de digestión.**

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
Tampón NEB4 <sup>1</sup> 10X	4	1X
BSA 10 μg/μl	4	1 μg/μl
SnaBI <sup>2</sup>	2	0.25 unidades/μl
ADN (77 ng/μl)	30	57.8 ng/μl
Volumen final	40	-

<sup>1</sup> 500 mM CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K, 100 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 200 mM Tris-Acetato, pH 7.9

<sup>2</sup> SnaBI 5000 unidades/ml, New England Biolabs

- **scAAV-ITR-pA.** Se digiere con SnaBI para generar extremos compatibles que permitan la correcta clonación del fragmento HLP-TYMP. Se espera una única banda de 3019 pb.

**Tabla 4.21. Composición de la reacción de digestión.**

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
Tampón NEB4 <sup>1</sup> 10X	2.5	1X
BSA 10 μg/μl	2.5	1 μg/μl
SnaBI <sup>2</sup>	3	0.6 unidades/μl
ADN (193.7 ng/μl)	15	116.2 ng/μl
Agua	2	-
Volumen final	25	-

<sup>1</sup> 500 mM CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K, 100 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 200 mM Tris-Acetato, pH 7.9

<sup>2</sup> SnaBI 5000 unidades/ml, New England Biolabs

Igual que en el caso anterior, la reacción se lleva a cabo ON a 37 °C y se inactiva a 60 °C durante 15 minutos. El producto de digestión se separa por electroforesis y se purifica la banda de 3019 pb.

- **scAAV-HLP-TYMP.** Se realizan seis digestiones simples con las enzimas ApaLI, XmaI, NotI, SnaBI, BsaHI y MscI con el fin de comprobar que la clonación se ha dado correctamente y que los ITRs se mantienen intactos. El patrón de bandas esperado en cada caso es:

**Tabla 4.22. Patrón de bandas esperados para la digestión con diferentes enzimas.**

Enzima	Fragmentos esperados (pb)
<b>ApaI</b> <sup>1</sup>	3958 + 1088
<b>XmaI</b> <sup>2</sup>	1596 + 980 + 725 + 599 + 384 + 359 + 240 + 141 + 11
<b>NotI</b> <sup>3</sup>	5046
<b>SnaBI</b> <sup>4</sup>	3019 + 2027
<b>BsaHI</b> <sup>5</sup>	2606 + 900 + 717 + 608 + 215
<b>MscI</b> <sup>6</sup>	1963 + 1493 + 1183 + 324 + 83

<sup>1</sup> ApaI 10000 unidades/ml, *New England Biolabs*

<sup>2</sup> XmaI 10000 unidades/ml, *New England Biolabs*

<sup>3</sup> NotI 10000 unidades/ml, *New England Biolabs*

<sup>4</sup> SnaBI 5000 unidades/ml, *New England Biolabs*

<sup>5</sup> BsaHI 10000 unidades/ml, *New England Biolabs*

<sup>6</sup> MscI 5000 unidades/ml, *New England Biolabs*

Todas las enzimas funcionan con el tampón NEB4, excepto NotI que funciona con el tampón NEB3. En todos los casos, las reacciones se llevan a cabo a 37 °C ON y se separa el producto de digestión por electroforesis en gel de agarosa.

**Tabla 4.23. Composición de las diferentes reacciones de digestión.**

Reactivo	Volumen (µl)	Concentración final
<b>Tampón NEB4</b> <sup>1</sup> 10X/ <b>NEB3</b> <sup>2</sup> 10X	2	1X
<b>BSA 10 µg/µl</b>	2	1 µg/µl
<b>Enzima</b>	0.5	0.25/0.13 unidades/µl
<b>ADN (180.5 ng/µl)</b>	3	27.1 ng/µl
<b>Agua</b>	12.5	-
<b>Volumen final</b>	20	-

<sup>1</sup> 500 mM CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K, 100 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 200 mM Tris-Acetato, pH 7.9

<sup>2</sup> 1 M NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM Tris-HCl, pH 7.9

Para realizar la construcción del vector AAV2/8-AAT-TYMP, se parte del plásmido sCAAV-HLP-TYMP con el fin de obtener el fragmento correspondiente al cADN de *TYMP* para su posterior clonaje en el plásmido pSMD2-AAT-UGT1A1 2.1. Se realiza una digestión doble con las enzimas XbaI y XhoI y se esperan dos bandas de 3365 y 1681 pb.

**Tabla 4.24. Composición de la reacción de digestión.**

Reactivo	Volumen (µl)	Concentración final
<b>Tampón NEB4</b> <sup>1</sup> 10X	3	1X
<b>BSA 20 µg/µl</b>	1.5	1 µg/µl
<b>XbaI</b> <sup>2</sup>	1	0.67 unidades/µl
<b>XhoI</b> <sup>3</sup>	1	0.67 unidades/µl
<b>ADN (200 ng/µl)</b>	10	66.7 ng/µl
<b>Agua</b>	13.5	-
<b>Volumen final</b>	30	-

<sup>1</sup> 500 mM CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K, 100 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 200 mM Tris-Acetato, pH 7.9

<sup>2</sup> XbaI 20000 unidades/ml, *Takara*.

<sup>3</sup> XhoI 20000 unidades/ml, *New England Biolabs*.

La reacción se lleva a cabo durante dos horas a 37 °C. A continuación, se separa el producto de digestión en un gel preparativo y se purifica la banda de 1681 pb.

- **pSMD2-AAT-UGT1A1 2.1.** Se digiere con las enzimas Sall y NheI para poder generar extremos compatibles que permitan el clonaje del cADN *TYMP*. Se obtienen dos fragmentos de 6096 y 1613 pb. Dado que los tampones en los cuales funcionan estas dos enzimas no son compatibles, en primer lugar, se realiza una digestión con la enzima NheI (funciona con un tampón más diluído) durante 2 horas a 37 °C y posteriormente se realiza la digestión con Sall ajustando las concentraciones de los diferentes elementos del tampón.

*Tabla 4.25. Composición de la reacción de digestión con NheI.*

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
Tampón NEB2 <sup>1</sup> 10X	2.5	1X
BSA 20 μg/μl	1.5	1.2 μg/μl
NheI <sup>2</sup>	1	0.8 unidades/μl
ADN (44 ng/μl)	20	35.2 ng/μl
Volumen final	25	-

<sup>1</sup> 500 mM NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 100 mM Tris-HCl, pH 7.9

<sup>2</sup> NheI 20000 unidades/ml, New England Biolabs.

*Tabla 4.26. Composición de la reacción de digestión con Sall.*

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
Tampón NEB2 <sup>1</sup> 10X	3	1X
Sall <sup>2</sup>	1	0.67 unidades/μl
Reacción digestión NheI	24	80% v/v
Agua	2	-
Volumen final	30	-

<sup>1</sup> 500 mM NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 100 mM Tris-HCl, pH 7.9

<sup>2</sup> Sall 20000 unidades/ml, New England Biolabs.

Después de dos horas de incubación a 37 °C, se corre un gel preparativo al 0.8% (p/v) y se purifica la banda de 6096 pb.

- **pSMD2-AAT-TYMP.** Se realizan dos digestiones simples con EcoRV y BglII y una digestión doble que combina ambas enzimas para comprobar la correcta clonación del inserto en el plásmido pSMD2-AAT-UGT1A1 2.1. El patrón de bandas esperado es de una banda de 7771 pb en el caso de las digestiones simples y dos bandas de 6107 y 1664 pb para la digestión doble.

*Tabla 4.27. Composición de las diferentes reacciones de digestión.*

Reactivo	EcoRV (μl)	BglII (μl)	EcoRV/BglII (μl)	Concentración final
Tampón NEB3 <sup>1</sup> 10X	2	2	2	1X
BSA 20 μg/μl	1	1	1	1 μg/μl
EcoRV <sup>2</sup>	1	-	1	1 unidad/μl
BglII <sup>3</sup>	-	1	1	0.5 unidades/μl
ADN (100.5 ng/μl)	2	2	2	10 ng/μl
Agua	14	14	13	-
Volumen final	20	20	20	-

<sup>1</sup> 1 M NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM Tris-HCl, pH 7.9

<sup>2</sup> EcoRV 20000 unidades/ml, New England Biolabs

<sup>3</sup> BglIII 10000 unidades/ml, New England Biolabs.

Las reacciones se incuban 2 horas a 37 °C y el producto de digestión se separa por electroforesis.

#### 4.2.4. Purificación de fragmentos de ADN en geles de agarosa.

En primer lugar, se separan los fragmentos de ADN de la muestra mediante electroforesis en gel horizontal de agarosa (*apartado 4.1.4*). A continuación, se expone el gel a una fuente ultravioleta y se recorta la banda correspondiente al fragmento que se desea purificar. Por último, se procede a la purificación del ADN siguiendo la metodología descrita en el protocolo del kit comercial *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (28-9034-70, GE Healthcare)*. El protocolo en cuestión consta de un primer paso en el que se diluye la agarosa contenida en la banda recortada seguido de un proceso de purificación del ADN mediante cromatografía de afinidad en membrana de sílice.

#### 4.2.5. Ligación de fragmentos de ADN.

- **Ligación del intrón 3 del gen *TK1* con el vector TOPO-TA.** El intrón procedente de amplificación por PCR contiene un nucleótido de adenina libre en cada extremo que permite la unión con el nucleótido de timina presente en los extremos del vector lineal TOPO-TA. Se sigue el protocolo del Kit comercial *TOPO TA Cloning Kit for sequencing (Invitrogen)*.

*Tabla 4.28. Composición de la reacción de ligación con el vector TOPO-TA.*

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
Vector TOPO-TA (10 ng/μl)	1	1.7 ng/μl
Intrón 3 <i>TK1</i> (5.5 ng/μl)	4	3.7 ng/μl
Solución salina <sup>1</sup>	1	0.2 M NaCl, 0.01 M MgCl <sub>2</sub>
Volumen final	6	-

<sup>1</sup> 1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl<sub>2</sub>.

La reacción se incubaba 10 minutos a TA y se inactiva en hielo.

- **Ligación del intrón 3 del gen *TK1* con el plásmido pSMD2-pA.** La ligación se realiza a partir de fragmentos de ADN digeridos y purificados de gel de agarosa (*apartados 4.2.3 y 4.2.4*) utilizando el kit comercial *Rapid DNA Ligation Kit (Roche)* y una relación molar 1:2 entre el plásmido y el inserto.

*Tabla 4.29. Composición de la reacción de ligación.*

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
Plásmido pSMD-pA (26 ng/μl)	2.7	3.3 ng/μl
Inserto (16.8 ng/μl)	3.8	3 ng/μl
Agua	1.5	-
Tampón de dilución 5X	2	0.5X
Tampón de ligación T4 DNA Ligasa 2X	10	1X
T4 DNA Ligasa (5U/μl)	1	0.2 U/μl
Volumen final	21	-

Una vez añadidos todos los componentes se mezclan mediante vórtex y se incuba la reacción 15 minutos a TA.

- **Ligación del inserto PGK-TYMP con el plásmido pcDNA 3.1.** La ligación se realiza a partir de fragmentos de ADN digeridos y purificados de gel de agarosa (*apartados 4.2.3 y 4.2.4*) utilizando la enzima *T4 DNA Ligasa (Roche)* y una relación molar 1:3 entre el plásmido y el inserto. Se incuba durante 2 horas a TA.

*Tabla 4.30. Composición de la reacción de ligación.*

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
Plásmido pcDNA 3.1 (32.3 ng/μl)	3.5	5.3 ng/μl
Inserto (8.7 ng/μl)	15	6.1 ng/μl
Tampón de ligación T4 DNA Ligasa 10X <sup>1</sup>	2	0.9X
T4 DNA Ligasa (1U/μl)	1	0.05 U/μl
Volumen final	21.5	-

<sup>1</sup>1.2 M NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT; 10 mM ATP; 660 mM Tris-HCl, pH 7.5.

- **Ligación del inserto PGK-TYMP con el plásmido pSMD2-stuffer-pA.** La ligación se realiza a partir de fragmentos de ADN digeridos y purificados de gel de agarosa (*apartados 4.2.3 y 4.2.4*) utilizando el kit comercial *Rapid DNA Ligation Kit (Roche)* y una relación molar 1:5 entre el plásmido y el inserto.

*Tabla 4.31. Composición de la reacción de ligación.*

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
Plásmido pSMD2-stuffer-pA (32.4 ng/μl)	1.9	3 ng/μl
Inserto (27 ng/μl)	3.8	5.1 ng/μl
Agua	1.5	-
Tampón de dilución 5X	2	0.5X
Tampón de ligación T4 DNA Ligasa 2X	10	1X
T4 DNA Ligasa (5U/μl)	1	0.2 U/μl
Volumen final	20.2	-

Una vez añadidos todos los componentes se mezclan mediante vórtex y se incuba la reacción 25 minutos a TA.

- **Ligación del inserto TYMP con el plásmido pcDNA 3.1.** La ligación se realiza a partir de fragmentos de ADN digeridos y purificados de gel de agarosa (*apartados 4.2.3 y 4.2.4*) utilizando la enzima *T4 DNA Ligasa (Roche)* y una relación molar 1:3 entre el plásmido y el inserto.

*Tabla 4.32. Composición de la reacción de digestión.*

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
Plásmido pcDNA 3.1 (13.3 ng/μl)	4	3.5 ng/μl
Inserto (11.1 ng/μl)	4.4	3.3 ng/μl
Tampón de ligación T4 DNA Ligasa 5X <sup>1</sup>	3	1X
T4 DNA Ligasa (1U/μl)	2	0.1 U/μl
Agua	1.6	-
Volumen final	15	-



<sup>1</sup>1.2 M NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT; 10 mM ATP; 660 mM Tris-HCl, pH 7.5.

La reacción de ligación se incuba ON a TA.

- **Ligación del inserto TYMP con el plásmido pAV-HLP.** La ligación se realiza a partir de fragmentos de ADN digeridos y purificados de gel de agarosa (*apartados 4.2.3 y 4.2.4*) utilizando el kit comercial *Rapid DNA Ligation Kit (Roche)* y una relación molar 1:3 entre el plásmido y el inserto.

*Tabla 4.33. Composición de la reacción de ligación.*

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
Plásmido pAV-HLP (17.9 ng/μl)	4.2	3.6 ng/μl
Inserto (23.2 ng/μl)	3.8	4.2 ng/μl
Tampón de dilución 5X	2	0.5X
Tampón de ligación T4 DNA Ligasa 2X	10	1X
T4 DNA Ligasa (5U/μl)	1	0.2 U/μl
Volumen final	21	-

Una vez añadidos todos los componentes se mezclan mediante vórtex y se incuba la reacción 25 minutos a TA.

- **Ligación del inserto HLP-TYMP con el plásmido scAAV-ITR-pA.** La ligación se realiza a partir de fragmentos de ADN digeridos y purificados de gel de agarosa (*apartados 4.2.3 y 4.2.4*) utilizando el kit comercial *Rapid DNA Ligation Kit (Roche)* y una relación molar 1:3 entre el plásmido y el inserto.

*Tabla 4.34. Composición de la reacción de ligación.*

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
Plásmido scAAV-ITR-pA (30.5 ng/μl)	1	1.5 ng/μl
Inserto (7.6 ng/μl)	7	2.5 ng/μl
Tampón de dilución 5X	2	0.5X
Tampón de ligación T4 DNA Ligasa 2X	10	1X
T4 DNA Ligasa (5U/μl)	1	0.2 U/μl
Volumen final	21	-

Una vez añadidos todos los componentes se mezclan mediante vórtex y se incuba la reacción 30 minutos a TA.

- **Ligación del inserto TYMP con el plásmido pSMD2-AAT-UGT1A1 2.1.** La ligación se realiza a partir de fragmentos de ADN digeridos y purificados de gel de agarosa (*apartados 4.2.3 y 4.2.4*) utilizando el kit comercial *Rapid DNA Ligation Kit (Roche)* y una relación molar 1:3 entre el plásmido y el inserto. La reacción se lleva a cabo incubando dos horas a TA.

Tabla 4.35. Composición de la reacción de ligación.

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
Plásmido pSMD2-AAT (8.9 ng/ $\mu$ l)	5.5	1.2 ng/ $\mu$ l
Inserto (17.6 ng/ $\mu$ l)	8.3	3.6 ng/ $\mu$ l
Agua	2.2	-
Tampón de dilución 5X	4	0.5X
Tampón de ligación T4 DNA Ligasa 2X	20	1X
T4 DNA Ligasa (5U/ $\mu$ l)	1	0.1 U/ $\mu$ l
Volumen final	41	-

#### 4.2.6. Producción y transformación de bacterias quimiocompetentes.

Se preparan bacterias quimiocompetentes a partir de la cepa *E.Coli XL10-Gold Ultracompetent Cells (200314, Agilent)* para tener un stock inagotable en el laboratorio. El protocolo de preparación es el siguiente:

- Crecer 50 ml de la cepa comercial en LB hasta alcanzar una densidad óptica ( $DO_{600}$ )  $<10^8$  células/ml.
- Transferir el cultivo bacteriano a un tubo estéril e incubar en hielo durante 10 minutos.
- Centrifugar a 2700 x g durante 10 minutos a 4 °C.
- Decantar el sobrenadante asegurando que no quedan restos y resuspender el precipitado en 10 ml de  $CaCl_2$  0.1 M estéril frío.
- Centrifugar a 2700 xg durante 10 minutos a 4 °C.
- Eliminar completamente el sobrenadante y resuspender el precipitado en 2 ml de  $CaCl_2$  0.1 M y 10% de glicerol.
- Hacer alícuotas de 250  $\mu$ l y congelar a -80 °C hasta su uso.

Una vez producidas las bacterias quimiocompetentes se lleva a cabo la transformación de las mismas con los diferentes plásmidos de interés. Para ello los pasos a seguir son:

- Descongelar las bacterias quimiocompetentes en hielo y añadir alrededor de 50 ng del ADN que se quiera transformar.
- Agitar suavemente e incubar en hielo durante 30 minutos.
- Someter las células a un choque térmico mediante incubación en un baño a 42 °C durante 90 segundos.
- Incubar nuevamente en hielo 2 minutos.
- Añadir 800  $\mu$ l de LB precalentado a 42 °C, mezclar suavemente e incubar a 37 °C con agitación a 250 rpm durante 45 minutos.
- Sembrar 200  $\mu$ l del cultivo en placas LB-agar suplementadas con el antibiótico pertinente en cada caso (*apartado 4.2.2*).
- Incubar a 37 °C ON.

#### 4.2.7. Selección y amplificación de clones.

Una vez realizada la transformación bacteriana, las colonias de interés serán aquellas que hayan incorporado el ADN transformado y que presenten, por tanto, resistencia al antibiótico utilizado en cada caso. Así pues, con la ayuda de un asa de *Kolle* se recogen las diferentes colonias y se siembran individualmente en LB líquido para expandir el cultivo (*apartado 4.2.2*). Posteriormente se procede a

la extracción de ADN (*apartado 4.1.1.1*) y a su posterior comprobación por restricción enzimática (*apartado 4.2.3*).

#### 4.2.8. Amplificación por PCR.

Para la clonación del intrón 3 del gen *TK1* en el vector TOPO-TA es necesario amplificar el mismo mediante PCR a partir de una muestra de ADN genómico con el objetivo de generar nucleótidos de adenina libres en los extremos, que podrán ligarse con los nucleótidos de timina libres que presenta el vector TOPO-TA. Para ello se utilizan los siguientes cebadores:

- Cebador directo: CTGCCAGTGTTTCAGAACTC
- Cebador reverso: GGCTTTGAGAAGTTAGCACC

La composición de la reacción y las condiciones de amplificación son las siguientes:

*Tabla 4.36. Composición de la reacción de PCR.*

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
Takara Taq polimerasa (5 U/μl)	0.1	0.02 U/μl
Tampón de PCR 10X Takara	2.5	1X
Mezcla de dNTPs 2.5 mM	2	0.2 mM
Cebador directo 2 μM	6.3	0.5 μM
Cebador reverso 2 μM	6.3	0.5 μM
ADN (100 ng/μl)	1	4 ng/μl
Agua	6.8	-
Volumen final	25	-

*Tabla 4.37. Condiciones de la reacción de PCR.*

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	2 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	30 segundos	
Hibridación	56 °C	30 segundos	25
Elongación	72 °C	2 minutos	
Elongación final	72 °C	7 minutos	1

#### 4.2.9. Purificación de productos de PCR.

Los productos de amplificación por PCR que se desean secuenciar se separan por cromatografía de exclusión molecular siguiendo el protocolo descrito por el fabricante del kit comercial *QiAquick PCR Purification Kit (28104, QIAGEN)*.

#### 4.2.10. Secuenciación de fragmentos de ADN.

Una vez obtenidos los plásmidos finales que se utilizarán para la producción de cada uno de los vectores adeno-asociados propuestos y, después de haber comprobado mediante digestión con enzimas de restricción que el clonaje ha funcionado, se procede a secuenciar la región plasmídica que codifica los diferentes elementos del vector AAV. Para ello se realiza secuenciación automática basada en el método de Sanger modificado. Concretamente, se lleva a cabo una reacción de amplificación del ADN molde (reacción de secuencia) en la que se utilizan didesoxinucleósidos trifosfato (ddNTPs)

marcados con un fluoróforo específico para cada uno de los cuatro nucleótidos. La incorporación de un ddNTP durante la reacción de amplificación impide que continúe la síntesis del fragmento de ADN por lo que se acaba generando una batería de fragmentos de diferente tamaño que se separan por electroforesis capilar y se detectan mediante la excitación del fluoróforo con un láser. Esto permite la identificación de cada base en una posición determinada.

La reacción de secuencia se lleva a cabo utilizando el kit comercial *BigDye® Terminator v1.1 (Applied Biosystems™)*, mediante la siguiente mezcla de reacción y bajo las siguientes condiciones:

**Tabla 4.38. Composición de la mezcla de la reacción de secuencia.**

Reactivo	Volumen (µl)
BigDye Terminator v1.1	2
Tampón de secuenciación BidDye v1.1	1
Cebador 5 µM	2
ADN plasmídico	0.5-1 µg
Agua	Hasta 10 µl

**Tabla 4.39. Condiciones bajo las que se realiza la reacción de secuencia.**

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	1 minuto	1
Desnaturalización	96 °C	10 segundos	25
Hibridación	50 °C	5 segundos	
Elongación	60 °C	4 minutos	

Los cebadores utilizados para la secuenciación de los diferentes elementos son los siguientes:

**Tabla 4.40. Secuencia de los cebadores utilizados para la secuenciación de los diferentes vectores.**

Secuencia 5' a 3'	Orientación	Región diana
GCGAATTCTGCAGATATCGC	Cebador directo	Promotor PGK
GCACGTCTCACTAGTACCCT	Cebador directo	Promotor PGK
TTCTGGACGAGGGCCTTTCC	Cebador directo	Promotor PGK
AGCTGCTAACTTCTCAAAGC	Cebador directo	Promotor PGK
GTGTTCCGCATTCTGCAAGCCT	Cebador directo	cADN <i>TYMP</i>
CATGCTGATGGCCATCCGA	Cebador directo	cADN <i>TYMP</i>
CCGCTCTGGTGGTGGACG	Cebador directo	cADN <i>TYMP</i>
AGCAGGAGGAGCTGCTGGCG	Cebador directo	cADN <i>TYMP</i>
TCGAGAGCTCGTTCTGCC	Cebador directo	cADN <i>TYMP</i>
TGAGCCAGGGCCTGGGTCAG	Cebador reverso	cADN <i>TYMP</i>
GGCTCATGTCCAACATTACC	Cebador directo	Promotor HLP
GCAAGCAGCAAACAGCAAACAC	Cebador directo	Promotor AAT
TTTCGGTAAGTGCAGTGAAGC	Cebador directo	Promotor AAT
AATATTCACCAGCAGCCTCCCC	Cebador directo	Promotor AAT
AGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGC	Cebador directo	Intrón HBB2

Una vez terminada la reacción de secuencia, se purifica la muestra siguiendo el protocolo especificado por el kit comercial *illustra™ Autoseq™ G-50Dye Terminator Removal Kit (25-5340-02, GE Healthcare)* y se analiza la muestra con el secuenciador.

### 4.3. Producción y titulación de partículas víricas.

#### 4.3.1. Producción de AAV.

La producción de los vectores adeno-asociados testados en esta tesis se ha llevado a cabo por diferentes empresas del sector ya que, entre otras cosas, este procedimiento requiere infraestructuras especializadas de las que no disponemos en nuestro laboratorio. Por este motivo, no se describirá con detalle el protocolo de producción.

El vector AAV2/8-TBG-TYMP se produjo en la *Unidad de Vectores del Instituto Telethon de Genética y Medicina (TIGEM) (Nápoles, Italia)*. La producción se llevó a cabo en células 293T mediante triple transfección con el plásmido que contiene las secuencias ITRs y el transgén de interés, un segundo plásmido que contiene los genes *rep* y *cap* del AAV y un tercer plásmido que contiene las secuencias de replicación del virus colaborador (generalmente Ad o HSV). La purificación de la producción vírica se realizó mediante ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio<sup>100</sup>.

Los vectores AAV2/8-PGK-TYMP y scAAV2/8-HLP-TYMP se han producido en la *Unidad de Producción de Vectores (UPV) del Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG) (Barcelona, España)*. En este caso, la producción se llevó a cabo también en células HEK-293 mediante triple transfección. Sin embargo, la purificación se realizó mediante gradiente discontinuo de iodixanol tras previa precipitación con polietilenglicol.

Por último, el vector AAV2/8-AAT-TYMP fue producido por la empresa *Genethon BioProd (Évry, Francia)*. En este caso, se usó también un método de producción basado en triple transfección transitoria en células 293T y purificación por ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio.

#### 4.3.2. Titulación de producciones víricas.

Para evitar diferencias en las producciones víricas debidas al método de titulación empleado por cada una de las empresas productoras y poder así normalizar las dosis administradas de los diferentes vectores con el fin de que puedan ser comparables entre sí, se han titulado todos los AAVs empleados mediante un único método basado en cuantificación de ADN de doble cadena (dsADN) descrito por Piedra y colaboradores<sup>191</sup>. Para ello se utiliza el kit comercial *Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit picogreen (P7589 ThermoFisher Scientific)*.

Para poder cuantificar el ADN, en primer lugar, se realiza la lisis de la cápside vírica añadiendo a 2 µl de preparación vírica, 8 µl de agua y 10 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 200 mM, SDS 0.2% (p/v)) e incubando la mezcla durante 1 hora a 70 °C. A continuación, se incuba durante 30 minutos a TA para obtener ADN de doble cadena. De forma simultánea se incuban 2 µl de preparación con 8 µl de agua y 10 µl de tampón TE 1X durante hora y media a TA con el fin de poder determinar también qué proporción del ADN total cuantificado se corresponde con ADN no encapsidado. El protocolo se realiza por duplicado para cada muestra.

A continuación, se prepara una curva patrón de ADN Lambda (proporcionado por el kit) realizando un banco de diluciones seriadas 1:3 en tampón TE 1X a partir de una solución inicial que se encuentra a una concentración 100 ng/µl. Concretamente, se preparan diluciones que presentan las siguientes concentraciones: 2000, 667, 222, 74, 25 y 8 pg/µl.

Posteriormente, se cargan 20 µl de cada muestra y de cada uno de los puntos de la curva patrón en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Se cargan también 20 µl de tampón TE para determinar el blanco de reacción. Seguidamente se añaden 180 µl del reactivo *picogreen* (diluído 1:200 en TE 1X tal y como indica el fabricante) y se incuba 5 minutos a TA protegido de la luz. Finalmente se excita la placa con una longitud de onda de 435 nm y se determina la fluorescencia emitida a 528 nm en el lector de placas *FLx800* (*BioTek*).

La concentración de ADN (ng/ml) de cada muestra se obtiene mediante interpolación en la curva patrón a partir de los valores de fluorescencia obtenidos (previamente se sustrae el valor del blanco de reacción). Para convertir la concentración de ADN obtenida en genomas víricos/ml (gv/ml) se utiliza la siguiente fórmula:

$$Gv/ml = (C * 1.82^{12})/L$$

Dónde **C** equivale a la concentración de ADN en ng/ml, **1.82<sup>12</sup>** son los pares de bases presentes en un ng de ADN en pb/ng y **L** equivale a la longitud del genoma vírico en pb/gv.

Finalmente se calcula el título de cada producción, que corresponde a la diferencia entre los gv/ml de la muestra incubada con tampón de lisis y los gv/ml de la muestra no lisada (ADN no encapsidado).

#### 4.4. Técnicas de experimentación animal.

##### 4.4.1. Condiciones de estabulación.

Las colonias de ratones dKO y WT provienen de los mismos fundadores heterocigotos y presentan fondo genético C57BL/6J. La crianza y mantenimiento de los animales se realiza en el estabulario convencional del *Institut de Recerca Vall d'Hebron* en salas de humedad y temperatura controlada (20-22 °C), ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y bebida y comida ad libitum (se sigue la dieta *Teklad Global 18% Protein Rodent Diet 2018, Harlan*). En todo momento los animales se manipulan siguiendo la normativa europea y los procedimientos realizados se llevan a cabo bajo la aprobación del *Comitè Ètic d'Experimentació Animal del Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Herbon*. Se realiza un control del peso de los animales durante todo el tratamiento.

##### 4.4.2. Genotipado de animales dKO.

Se realiza a partir de ADN obtenido de una pequeña muestra de tejido (*apartado 4.1.1.3.1*) mediante una combinación de 3 PCRs distintas: una para la determinación del gen *Tymp* y dos que permiten diferenciar entre el alelo WT y el alelo KO del gen murino *Upp1*.

##### 4.4.2.1. Amplificación del gen murino *Tymp*.

El gen *Tymp* murino está situado en el cromosoma 15, tiene un tamaño de 5105 pb y está formado por 11 exones. En los ratones KO la secuencia presenta una inserción de 34 pb en el exón 4, provenientes de la secuencia *loxP*, que rompe la pauta de lectura. Así pues, la medida de las bandas esperadas para cada genotipo es:

- Ratón WT: 196 pb.
- Ratón KO: 230 pb.
- Ratón heterocigoto: dos productos de amplificación de 196 y 230 pb.

La secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación es:

- Cebador directo TPF1: AAA TGA GGT TAA GGG CCT G
- Cebador reverso I4R2: CCA TTG ATC ATC CTG TGA TT

Para llevar a cabo la reacción de amplificación se utiliza el kit *PCR Core Kit<sup>PLUS</sup>* (11585541001, Roche). Este kit incorpora la enzima uracilo-ADN glicosilasa (UNG), la cual impide la amplificación de moléculas de ADN que presentan bases de uracilo mal apareadas. El uso de UNG reduce el riesgo de falsos positivos gracias a la eliminación de productos preexistentes de PCR. La temperatura óptima a la cual se produce la acción de la UNG es de entre 15 y 25 °C (por esta razón la reacción se inicia con un ciclo de 10 minutos a 20 °C). La UNG no tiene efecto sobre el dUTP libre y se inactiva a altas temperaturas. La composición de la mezcla de reacción es la siguiente:

**Tabla 4.41. Mezcla de reacción para la amplificación del gen *Tymp* murino.**

Reactivo	Volumen (µl)	Concentración final
Taq polimerasa (5 U/µl)	0.125	0.025 U/µl
UNG (1 U/µl)	0.5	0.02 U/µl
Tampón 10x (25 mM MgCl <sub>2</sub> )	2.5	1X
Mezcla dNTPs (10 mM dATP, dCTP, dGTP; 30mM dUTP)	0.5	0.2 mM dATP, dCTP, dGTP; 0.6 mM dUTP
Cebador directo (2 µM)	6.25	0.5 µM
Cebador reverso (2 µM)	6.25	0.5 µM
ADN (150 ng/µl)	1	3 ng/µl
Agua	Hasta 25	-

Las condiciones bajo las cuales se realiza la reacción de amplificación son:

**Tabla 4.42. Condiciones de reacción para la amplificación del gen *Tymp* murino.**

Temperatura	Tiempo	Ciclos
20 °C	10 minutos	1
95 °C	2 minutos	
95 °C	30 segundos	10
55 °C	30 segundos	
72 °C	30 segundos	
95 °C	30 segundos	20
55 °C	30 segundos	
72 °C	30 segundos + 20 segundos/ciclo	
72 °C	7 minutos	1

Los productos de amplificación se corren en un gel de agarosa al 2% (p/v) (apartado 4.1.4).

#### 4.4.2.2. Amplificación del gen murino *Upp1*.

El gen *Upp1* murino se sitúa en el cromosoma 11, tiene un tamaño de 18067 pb y está formado por 9 exones. En ratones KO, el exón 5 de este gen se ha substituido por un gen de resistencia a neomicina<sup>217</sup>. Para discernir entre alelo WT y alelo KO, se hacen dos PCRs distintas. En el caso del alelo WT el cebador directo está situado en el intrón 4 del gen. Sin embargo, en el alelo KO está situado en el gen de resistencia introducido. Ambas reacciones se realizan utilizando el mismo cebador reverso.

#### 4.4.2.2.1. Amplificación del alelo KO.

En este caso, el tamaño de banda esperado para cada genotipo es:

- Ratón WT: no amplifica.
- Ratón KO: 420 pb.
- Ratón heterocigoto: 420 pb.

La secuencia de los cebadores utilizados para llevar a cabo la amplificación es:

- Cebador directo pNeo-ko: CAG AAA GCG AAG GAA CAA AGC TGC TAT TGG C
- Cebador reverso p500a-ko: GTT CAG CTG TTC CCA TAT GCA AAA GTG TGG

La composición de la mezcla de reacción, así como las condiciones de amplificación son las mismas que se han especificado para la amplificación del gen *Tymp* (apartado 4.4.2.1).

#### 4.4.2.2.2. Amplificación del alelo WT.

En este caso las bandas esperadas para cada genotipo son:

- Ratón WT: 296 pb.
- Ratón KO: no amplifica.
- Ratón heterocigoto: 296 pb.

Las secuencias de los cebadores utilizados en este caso son:

- Cebador directo p500-wt: CAG ACC CCC GAT GAC ACA GTA TAC TAA TGG
- Cebador reverso p500a-ko: GTT CAG CTG TTC CCA TAT GCA AAA GTG TGG

Igual que ocurre con el alelo KO, la composición de la mezcla de reacción y las condiciones de amplificación coinciden con las del gen *Tymp* (apartado 4.4.2.1).

#### 4.4.3. Inyección intravenosa de AAVs.

El tratamiento de los animales con los diferentes vectores testados (apartado 4.2.1) se lleva a cabo en ratones machos dKO modelo de la enfermedad de MNGIE mediante una única inyección intravenosa en la vena caudal cuando éstos tienen entre 8 y 12 semanas de edad. La principal razón por la cual no se incluyen hembras en este estudio es porque éstas presentan ciclos hormonales que pueden modificar la respuesta biológica en función de la etapa del ciclo sexual en la que se encuentren.

Las preparaciones víricas de concentración conocida (apartado 4.3) se diluyen con suero fisiológico (NaCl 9 mg/ml). El cálculo de la dosis a inyectar (expresada en genomas víricos (gc) por kg (gc/kg)) se realiza en base al peso de cada animal, de forma que finalmente se inyectan aproximadamente 200 µl de preparación. El número de animales (*n*) tratados con las diferentes dosis para cada vector queda especificado en la siguiente tabla:



**Tabla 4.43. Número de animales tratados con las diferentes dosis de cada vector.**

Dosis (gc/kg)	TBG <sup>1</sup>	PGK <sup>2</sup>	HLP <sup>3</sup>	AAT <sup>4</sup>
5·10 <sup>10</sup>	6	-	-	8
2·10 <sup>11</sup>	6	11	9	10
5·10 <sup>11</sup>	5	9	9	10
10 <sup>12</sup>	-	11	9	10
2·10 <sup>12</sup>	2	11	8	8
5·10 <sup>12</sup>	-	-	-	2
10 <sup>13</sup>	-	-	-	2
2·10 <sup>13</sup>	-	-	-	2

1) TBG, vector AAV2/8 que expresa el gen terapéutico TYMP bajo la acción del promotor hepático de la globulina de unión a tiroxina humana; 2) PGK, vector AAV2/8 que expresa el cADN de TYMP bajo la acción del promotor constitutivo de la fosfoglicerato quinasa humana; 3) HLP, vector scAAV2/8 cuya expresión está regulada por el promotor híbrido específico de hígado (versión reducida de la secuencia potenciadora/promotora apoE/α-1-antitripsina humana); 4) AAT, vector AAV2/8 que expresa el gen TYMP bajo la secuencia potenciadora/promotora apoE/α-1-antitripsina humana.

Para llevar a cabo la inyección se introduce al animal en un cilindro cerrado de medida ajustable que deja la cola libre y accesible (*restrainer*). A continuación, se sumerge la cola del roedor en agua caliente y se realiza una fríega con etanol para ayudar a la vasodilatación y facilitar la inyección. La preparación se inyecta con una jeringa de 1 ml utilizando una aguja de 27 G (0.4 x 13 mm) que se introduce con un ángulo prácticamente nulo en el interior de la vena, empezando siempre por la parte más distal de la cola. Una vez se tiene la aguja introducida se procede a inyectar la solución en el torrente sanguíneo. En caso de notar cierta resistencia al introducir la preparación es necesario retirar la aguja y realizar una nueva inyección en un nuevo punto situado en posición más proximal, ya que esto es un indicativo de que no estamos situados dentro del vaso sanguíneo. Una vez administrada la dosis correspondiente, se retira la aguja y se presiona el punto de inyección durante unos segundos con una gasa estéril para cortar la hemorragia.

#### 4.4.4. Extracción y procesamiento de muestras sanguíneas.

Una vez tratados los animales se realiza el seguimiento de la concentración de dThd y dUrd (*apartado 4.5.1.1*) así como de la actividad ALT (*apartado 4.5.4*) en plasma con una frecuencia semanal durante las primeras 4 semanas, quincenal durante las 4 siguientes y mensual hasta llegar a las 28 semanas post-tratamiento.

Para realizar la extracción de sangre se introduce al animal en un *restrainer*, manteniendo la pata trasera accesible. Posteriormente, ésta se inmoviliza sujetándola por debajo de la rodilla entre los dedos pulgar e índice y se depila la zona externa de forma superficial con una hoja de bisturí, de manera que queda visible la vena safena. Se aplica una pequeña cantidad de vaselina para evitar el derrame de la sangre a lo largo de la pata y se realiza una punción no demasiado profunda de forma perpendicular a la vena utilizando una aguja de 25 G (0.5 x 16 mm). Finalmente se recogen entre 100 y 200 µl de sangre con la ayuda de un contenedor capilar que contiene EDTA-K3 para evitar la coagulación (*Microvette® 100/200 K3E, Sarsted*), se introduce el capilar en hielo y se presiona el punto de punción con una gasa estéril durante unos segundos para cortar la hemorragia.

La sangre obtenida se centrifuga durante 5 minutos a 3500 xg y 4 °C para separar el plasma y la fracción celular. Para determinaciones de dThd y dUrd en plasma, antes de centrifugar se diluyen 50 µl de sangre en 400 µl de PBS estéril (dilución final 1:9) y posteriormente se procede a la separación del plasma diluido y la fracción celular, que se almacenan a -20 y -80 °C, respectivamente, hasta su posterior análisis.

#### 4.4.5. Sacrificio y obtención de muestras.

De forma rutinaria se lleva a cabo un protocolo de supervisión para roedores con el objetivo de detectar posibles signos de dolor o sufrimiento y garantizar en todo momento el bienestar de los animales. Para esto se controla y valora el peso, el comportamiento, la condición corporal y la apariencia física. En caso de detectar anomalías importantes en cualquier de estas variantes se sacrifica al animal mediante asfixia con CO<sub>2</sub> o dislocación cervical y se descarta automáticamente del estudio.

Los animales que no sufren ninguna anomalía se sacrifican 34 semanas después del tratamiento (42-46 semanas de edad en el caso de dKO y WT no tratados) mediante dislocación cervical y se procede a realizar el protocolo de disección para la obtención de las siguientes muestras:

##### - Sangre:

Se obtienen unos 200 µl de sangre mediante punción intracardíaca utilizando una aguja de 25 G (0.5 x 16 mm) y una jeringa de 1 ml. Posteriormente se hace pasar la muestra a través de un capilar con EDTA-K3 (*Microvette® 200 K3E, Sarsted*) y se deja en hielo hasta su posterior procesamiento (*apartado 4.4.4*).

##### - Tejidos:

Se congelan directamente en N<sub>2</sub> líquido los siguientes tejidos: cerebro, corazón, pulmón, riñón, bazo, intestino delgado (previamente lavado con suero fisiológico), soleus, gastrocnemius y bíceps femoral. Se almacenan a -80 °C hasta su uso.

En el caso del hígado (tejido de principal interés en nuestro estudio debido al tropismo del serotipo de AAV utilizado) se divide en 3 porciones, de manera que aproximadamente la mitad del tejido se destina a la extracción de dNTPs mitocondriales (*apartado 4.5.3.1*), una pequeña porción se congela en OCT con N<sub>2</sub> líquido y metilbutano para realizar cortes histológicos, y el resto se congela directamente en N<sub>2</sub> líquido, igual que el resto de tejidos. Las muestras congeladas se almacenan a -80 °C hasta su análisis.

### 4.5. Ensayos bioquímicos.

#### 4.5.1. Determinación de dThd y dUrd.

##### 4.5.1.1. Plasma.

Se parte de dos alícuotas de 200 µl de plasma diluido 1:9 en PBS. En una de las alícuotas, se añaden 3 µl de TP purificada (*Thymidine Phosphorylase, recombinant from E. Coli, T2807 Sigma Aldrich*) para obtener el blanco de reacción y se incuban ambas muestras a 37 °C durante 30 minutos. A continuación, se precipitan las proteínas de la muestra añadiendo 9 µl de HClO<sub>4</sub> 11.7 M y se centrifugan a 20800 xg durante 10 minutos a 4 °C. Finalmente se analizan 200 µl del sobrenadante obtenido por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) mediante detección espectrofotométrica ultravioleta.

Se inyectan 5 µl de muestra en el cromatógrafo *Acquity UPLC (Waters Corporation)*. Posteriormente, la muestra se eluye a través de una columna C18 *Acquity UPLC BEH*, 100 x 2.1 mm, 1.7 µm de tamaño de partícula y 130 Å de tamaño de poro (*Waters Corporation*). Se utiliza una fase móvil que consta de una solución salina o eluyente B (acetato de amonio 20 mM pH 5.6) y una fase orgánica o eluyente A (metanol). La muestra se eluye a un flujo constante de 0.5 ml/minuto con el siguiente gradiente: de 0 a 1.1 minutos, 100% eluyente B; de 1.1 a 5 minutos, gradiente de 100% a 86.4% de eluyente B; de 5 a 5.1 minutos, 86.4% de eluyente B; de 5.1 a 6.1 minutos, 100% de eluyente A y de 6.1 a 7.2 minutos, 100% de eluyente B. La absorbancia del eluido se monitoriza a 267 nm.

La identificación de los picos de dThd y dUrd se realiza en base a sus tiempos de retención. La concentración de cada desoxiribonucleósido se obtiene a partir de la cuantificación del área del pico de cada compuesto mediante interpolación en una curva patrón de multiestándares acuosos que contienen concentraciones conocidas de estos nucleósidos (intervalo 0.05-100 µM). Finalmente, se resta la concentración del blanco de reacción y se multiplica por el factor de dilución aplicado a la muestra.

#### 4.5.1.2. Tejidos de ratón.

Se homogenizan aproximadamente 150 mg de tejido murino en 800 µl de tampón de lisis (tritón x-100 1%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 2 mM, 2-mercaptoetanol 0.02%, Tris-HCl 50 mM pH 7.2) por disrupción mecánica utilizando un homogeneizador *Potter S (B. Braun)* y posteriormente se centrifuga el homogenado durante 30 minutos a 20800 xg y 4 °C. Con el objetivo de prevenir la degradación de nucleósidos in vitro durante el proceso de homogenización en aquellas muestras con elevada actividad TP (>100 nmol Thy/h·mg proteína), se procede a la homogenización de tejido añadiendo 100 µM de 5-bromouracilo (inhibidor de TP) al tampón de lisis. De la misma forma, una vez obtenido el homogenado éste se centrifuga durante 30 minutos a 20800 xg y 4 °C. En ambos casos, se recupera el sobrenadante y se determina la concentración de proteína en las muestras (*apartado 4.1.3*).

Para llevar a cabo la medida de nucleósidos, se divide la muestra en dos alícuotas de 300 µl y se añaden 4.5 µl de TP purificada a una de ellas para hacer el blanco de reacción. Ambas muestras se incuban a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se procede a la eliminación de proteínas de la muestra por ultrafiltración (con filtros 10 kDa *Amicon Ultra filters; Merck Millipore, Billerica, MA*) mediante centrifugación a 14000 xg durante 30 minutos a 4 °C.

Una vez obtenido el homogenado desproteinizado se determina la concentración de dThd y dUrd por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Para ello, se inyectan 5 µl de muestra en el cromatógrafo *Acquity UPLC-MS/MS (Acquity UPLC-Xevo TQ Mass Spectrometer; Waters, Milford, MA)*. Las muestras se eluyen a través de una columna de iguales características a las descritas en el apartado anterior utilizando la misma fase móvil o eluyente B y acetonitrilo como fase orgánica o eluyente A. En este caso, las muestras se eluyen a un flujo de 0.5 ml/minuto con el siguiente gradiente: de 0 a 1.1 minutos, 100% eluyente B; de 1.1 a 5 minutos, gradiente de 0 a 13.6% de eluyente A; de 5 a 5.1 minutos, gradiente de 13.6 a 100% de eluyente A; de 5.1 a 6.1 minutos, 100% eluyente A; de 6.1 a 7.2 minutos, 100% eluyente B. Una vez eluidos los diferentes componentes, éstos se detectan por monitorización de reacción múltiple (*MRM*) mediante ionización con *electrospray* positivo para dThd (transición en masa de 242.8 a 127.1, voltaje del cono 10 V y energía de colisión 12 eV) y dUrd (transición en masa de 228.8 a 113.08, voltaje de cono 8 V y energía de colisión 12 eV).

Finalmente, la concentración de cada desoxiribonucleósido se obtiene a partir de la cuantificación del área del pico de cada compuesto mediante interpolación en una curva patrón de multiestándares acuosos que contienen concentraciones conocidas de estos nucleósidos (intervalo 0.05-20 µM).

#### 4.5.2. Determinación de actividad timidina fosforilasa.

##### 4.5.2.1. Tejidos de ratón.

De igual forma que para la determinación de nucleósidos en tejido, se homogenizan aproximadamente 150 mg de tejido murino en 800 µl de tampón de lisis (tritón x-100 1%, PMSF 2 mM, 2-mercaptoetanol 0.02%, Tris-HCl 50 mM pH 7.2) por disrupción mecánica utilizando un homogeizador *Potter S (B. Braun)* y posteriormente se centrifuga el homogenado durante 30 minutos a 20800 xg y 4 °C. Posteriormente, se recupera el sobrenadante y se determina la concentración de proteína en las muestras (*apartado 4.1.3*) (de hecho puede realizarse el procedimiento a partir de una misma muestra (*apartado 4.5.1.2*) que, una vez determinada la concentración de proteína, se separa en dos alícuotas de forma que una se utiliza para continuar con la determinación de actividad TP en fresco y otra se congela a -20 °C hasta el momento de realizar la determinación de dThd y dUrd. En el caso de muestras con actividades elevadas en las que es necesario añadir 5-bromouracilo al tampón de lisis para inhibir la actividad TP y prevenir la degradación de nucleósidos, es imprescindible el uso de dos piezas de tejido diferentes).

Una vez determinada la concentración de proteína, se diluyen las muestras hasta una concentración final de 1.35 µg/µl en tampón de lisis y se realiza la siguiente mezcla de reacción:

*Tabla 4.44. Mezcla de reacción para la determinación de actividad TP en tejidos.*

	Reacción de determinación	Reacción de blanco	Concentración final
Muestra (1.35 µg/µl)	74 µl (100 µg de proteína)	74 µl	1 µg/µl
Tampón tris-arsenato 0.1M pH 6.5	20 µl	20 µl	20 mM
Timidina (166 mM)	6 µl	-	10 mM
Volumen final	100 µl	94 µl	-

Una vez preparada la mezcla de reacción, se incuba 1 hora a 37 °C. Durante este período la dThd es convertida en timina (Thy) mediante la acción de la actividad TP proporcionada por la muestra. Transcurrido este tiempo, se añade 1 ml de HClO<sub>4</sub> 0.55 M y se incuba 10 minutos en hielo con el fin de inactivar la reacción enzimática y precipitar las proteínas presentes en la muestra. Se añaden también 6 µl de dThd 166 mM al blanco de reacción. Finalmente, se centrifugan las muestras durante 10 minutos a 20800 xg y 4 °C, se recupera el sobrenadante (200 µl) y se procede a la determinación de la concentración de Thy por HPLC (*apartado 4.5.1.1*).

La actividad TP (expresada en nmoles Thy/h·mg proteína) se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad TP} = (C_{Thy} \cdot V_f) / (V \cdot C_{prot} \cdot t)$$

Dónde:  $C_{Thy}$  equivale a la concentración de Thy en la muestra analizada (µM);  $V_f$  al volumen final de reacción (1.1 ml);  $V$  al volumen de muestra (0.074 ml);  $C_{prot}$  a la concentración final de proteína en la muestra (1.35 mg/ml) y  $t$  al tiempo de incubación de la reacción (1 h).

#### 4.5.2.2. Fracción celular de sangre.

Se añaden 200 µl de tampón de lisis a una muestra de fracción celular proveniente de 50 µl de sangre (*apartado 4.4.4*) y se homogeniza mediante disrupción mecánica pasando la totalidad del volumen a través de una aguja de 30 G (0.3 x 13 mm) hasta 12 veces. Se sigue el protocolo descrito para la determinación en tejido y se prepara la siguiente mezcla de reacción:

*Tabla 4.45. Mezcla de reacción para la determinación de actividad TP en fracción celular.*

	Reacción de determinación	Reacción de blanco	Concentración final
<b>Muestra (27 µg/µl)</b>	74 µl (2 mg de proteína)	74 µl	20 µg/µl
<b>Tampón tris-arsenato 0.1M pH 6.5</b>	20 µl	20 µl	20 mM
<b>Timidina (166 mM)</b>	6 µl	-	10 mM
<b>Volumen final</b>	100 µl	94 µl	-

El resto del procedimiento coincide exactamente con el de actividad TP en tejido.

#### 4.5.2.3. Células (muestra control de actividad TP).

Con el objetivo de asegurar que los valores de actividad TP obtenidos en diferentes tipos de muestra son correctos, se utiliza una muestra control de actividad TP conocida que se procesa de forma independiente con cada set de muestras analizado. Concretamente se parte de  $5 \cdot 10^6$  células de un cultivo linfoblastoide que se homogeniza, con 200 µl de tampón de lisis, de forma idéntica a la fracción celular sanguínea. A continuación, se sigue el protocolo descrito para la determinación de actividad TP en tejido de ratón. En este caso las condiciones de la mezcla de reacción son:

*Tabla 4.46. Mezcla de reacción para la determinación de actividad TP en células.*

	Reacción de determinación	Reacción de blanco	Concentración final
<b>Muestra (0.135 µg/µl)</b>	74 µl (10 µg de proteína)	74 µl	100 ng/µl
<b>Tampón tris-arsenato 0.1M pH 6.5</b>	20 µl	20 µl	20 mM
<b>Timidina (166 mM)</b>	6 µl	-	10 mM
<b>Volumen final</b>	100 µl	94 µl	-

### 4.5.3. Determinación de dNTPs.

#### 4.5.3.1. Extracción de dNTPs mitocondriales de hígado.

En primer lugar, se procede a la extracción de mitocondrias mediante centrifugación diferencial y posteriormente se extraen los dNTPs mitocondriales. Para llevar a cabo la purificación de mitocondrias es necesario trabajar a 4 °C (cámara fría) y se sigue el siguiente protocolo:

- Una vez extraído el tejido, introducirlo en 20 ml de tampón de homogenización (MIB) (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA pH 8, 320 mM sacarosa) y cortarlo en trocitos pequeños con la ayuda de unas tijeras.
- Descartar el tampón y volver a añadir 20 ml de MIB. Repetir el procedimiento anterior hasta realizar un total de 3 lavados.

- Homogeneizar el tejido con la ayuda de un homogeneizador de vidrio en 5 ml de MIB hasta que no queden trozos. Traspasar el homogenado a un tubo de 15 ml, limpiar los restos que puedan quedar en el homogeneizador con 2 ml de MIB y juntarlo con el resto del homogenado.
- Centrifugar el homogenado durante 10 minutos a 1000 xg y 4 °C para sedimentar los núcleos.
- Recuperar el sobrenadante con una pipeta, traspasarlo a un tubo de centrifuga de base redonda y centrifugar 10 minutos a 9000 xg y 4 °C.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 8 ml de MIB.
- Distribuir los 8 ml en 8 tubos *ependorf* (1 ml/tubo).
- Centrifugar a máxima velocidad (13000 xg) en una microcentrifuga (rotor previamente enfriado a 4 °C) durante 2 minutos.
- Resuspender los precipitados en 0.5 ml de MIB y distribuir el volumen en 4 *ependorfs* de 1.5 ml.
- Volver a centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos.
- Resuspender los precipitados en 0.5 ml de MIB y distribuir el volumen en 2 *ependorfs* de 1.5 ml.
- Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos.
- Resuspender los precipitados en 0.5 ml de MIB y distribuir el volumen en 1 *ependorf* de 1.5 ml.
- Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 1 ml de tampón de incubación (MAITE) (25 mM sacarosa, 75 mM sorbitol, 100 mM KCl, 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM tris-HCl pH 7.4).
- Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos.
- Descartar el sobrenadante, resuspender el precipitado en 1 ml de MAITE y cuantificar la concentración de proteína (*apartado 4.1.3*). Mientras se realiza la lectura de proteínas, mantener la suspensión de mitocondrias en agitación en una noria a 4 °C.

Una vez obtenidas las mitocondrias se procede a la extracción de dNTPs. Los pasos a seguir son los siguientes:

- Preparar alícuotas de 0.5 mg de proteína (unas 4 alícuotas por muestra).
- Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
- Descartar el sobrenadante y tratar el precipitado con 300 µl de ácido tricloroacético (TCA) 0.5 M.
- Mezclar con vórtex durante 15 segundos.
- Centrifugar a 20000 xg durante 5 minutos a 4 °C.
- Recuperar el sobrenadante en *ependorfs* con tapón de rosca y añadir 450 µl de tri-n-octylamina 0.5 M en freón (1,1,2-triclorofluoroetano, 91440 *Fluka*).
- Hacer vórtex durante 30 segundos.
- Centrifugar a 10000 xg durante 10 minutos a 4 °C.
- Recuperar 150 µl de la fase acuosa superior y secarlos en *speed-vac* hasta que desaparezca la totalidad del líquido (2-3 horas sin fijar temperatura).
- Conservar el liofilizado a -80 °C hasta la determinación enzimática de dNTPs.

#### 4.5.3.2. Determinación enzimática de dNTPs.

Se utiliza un método de determinación enzimática basado en el descrito por Sherman y Fyfe<sup>218</sup>, el cual fue modificado posteriormente por Ferraro y colaboradores<sup>219</sup> y más recientemente por González-

Vioque y colaboradores<sup>67</sup>. La determinación de cada nucleótido se realiza de manera independiente (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). Los principales elementos que intervienen en la reacción enzimática son:

- Oligonucleótido:

Pequeño polímero formado a partir de la hibridación de dos cadenas de desoxiribonucleótidos: una larga, de secuencia específica para cada dNTP que se desea medir, y otra corta, común en todos los casos, que funciona como cebador.

*Tabla 4.47. Secuencias de oligonucleótidos para la determinación de cada dNTP.*

dNTP a determinar	Secuencia del oligonucleótido
dATP	5' AAATAAATAAATAAATAAATGGCGGTGGAGGCGG 3' 3' CCGCCACCTCCGCC 5'
dTTP	5' TTATTATTATTATTATTAGGCGGTGGAGGCGG 3' 3' CCGCCACCTCCGCC 5'
dGTP	5' TTTGTTTGTGGTTTGGTTTGGGCGGTGGAGGCGG 3' 3' CCGCCACCTCCGCC 5'
dCTP	5' TTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTCGGCGGTGGAGGCGG 3' 3' CCGCCACCTCCGCC 5'

La síntesis de cada una de las cadenas que componen el oligonucleótido se realiza de forma independiente (se encargan a *Invitrogen*). Para llevar a cabo la hibridación, se resuspenden los productos liofilizados proporcionados por la casa comercial en NaCl 0.1 M (concentración final 100 µM), y se prepara una dilución equimolar de cada una de ellos. A continuación, se introduce el tubo con la mezcla en agua a 70 °C y se deja que la temperatura baje gradualmente hasta llegar a TA. De esta forma tendremos el oligonucleótido (tal y como aparece en la *Tabla 4.47*) a una concentración final de 50 µM. Finalmente se realiza una dilución 1:10 en agua para tenerlo a una concentración de 5 µM y se congela alicuotado a -20 °C.

- dNTP radioactivo:

Se utiliza (8-<sup>3</sup>H(N))dATP (<sup>3</sup>H-ATP) para la determinación de dTTP, dCTP, dGTP y (metil-<sup>3</sup>H)dTTP (<sup>3</sup>H-TTP) para la determinación de dATP. Los radionucleótidos vienen disueltos en etanol 50% y tienen una actividad específica inicial de 15-35 Ci/mmol. Para llevar a cabo la determinación es necesario eliminar el etanol presente. Para ello se transfiere a un *ependorf* el volumen de radionucleótido necesario según el número de muestras a determinar (0.5 µl/muestra) y se evapora en el concentrador centrífugo *speed-vac* a TA durante 20-30 minutos. El sedimento seco obtenido se resuspende en agua (la concentración final de radionucleótido es de 15 µM). La preparación de los radionucleótidos se realiza el mismo día del ensayo.

- Sequencing Taq DNA Polymerase (117005, *Bioron*):

Enzima con actividad polimerasa que utiliza la cadena larga del oligonucleótido como molde de ADN para incorporar los desoxiribonucleótidos (tanto el radiactivo, como el procedente de la muestra) a partir de la cadena corta que actúa como cebador, en una reacción que transcurre a punto final. La cantidad total de nucleótido radiactivo incorporado, y por lo tanto la señal radioactiva obtenida, depende de la cantidad de cada dNTP en la muestra problema.

Para poder determinar la concentración de los diferentes dNTPs en la muestra problema, se realiza una curva patrón a partir de diluciones seriadas de una mezcla de concentración conocida que contiene los 4 dNTPs. Las diluciones se realizan en tris-HCl 40 mM pH 7.4 y las curvas utilizadas en cada caso son las siguientes:

- **dATP, dCTP, dGTP:** 400 nM, 200 nM, 100 nM, 20 nM, 10 nM y 5 nM (lo que equivale a unas cantidades de 2 pmoles, 1 pmol, 0.5 pmoles, 0.1 pmoles, 0.05 pmoles y 0.025 pmoles cuando se añaden 5 µl en la reacción).
- **dTTP:** 100 nM, 70 nM, 40 nM, 20 nM, 10 nM y 5 nM (0.5 pmoles, 0.35 pmoles, 0.2 pmoles, 0.1 pmoles, 0.05 pmoles y 0.025 pmoles cuando se añaden 5 µl en la reacción).

Los extractos de dNTPs mitocondriales de las muestras (*apartado 4.5.3.1*) se reconstituyen en un volumen determinado de tris-HCl 40 mM pH 7.4 para tener la muestra a una concentración final equivalente a 12.5 µg de proteína/µl (cabe destacar que la muestra en cuestión no presenta proteína ya que ésta se elimina tras la precipitación con TCA realizada en el proceso de extracción de dNTPs (*apartado 4.5.3.1*)). Posteriormente se realiza una dilución de las muestras utilizando el mismo tampón (dilución 1 y 1:3 para la determinación de dATP y dTTP y dilución 1:5 y 1:10 para la determinación de dCTP y dGTP).

Para llevar a cabo la determinación se añaden, por duplicado, 5 µl de cada una de las diluciones de las muestras en un tubo de PCR y, por triplicado, 5 µl de cada una de las diluciones de la curva patrón. A continuación, se añaden 5 µl de la siguiente mezcla de reacción:

*Tabla 4.48. Composición de la mezcla de reacción para la determinación de dNTPs.*

	Volumen para una reacción	Concentración final en la reacción
Tris-HCl 1 M pH 7.4	0.2 µl	20 mM
MgCl <sub>2</sub> 0.1 M	1 µl	10 mM
DTT 0.5 M	0.1 µl	5 mM
Oligonucleótido 5 µM	0.5 µl	0.25 µM
Radionucleótido 15 µM	0.5 µl	0.75 µM
Sequencing Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0.05 µl	0.025 U/µl
Agua	2.65 µl	-

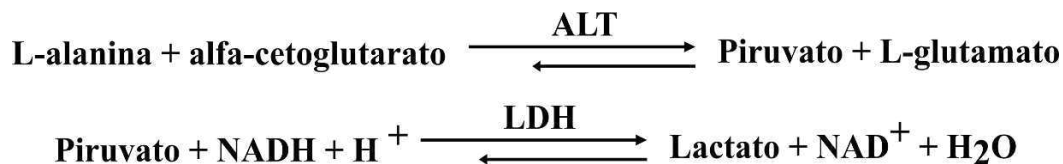
Una vez preparadas las reacciones, se mezclan mediante vórtex, se realiza un *spin* de centrífuga y se incuban en un baño a 48 °C durante 1 hora. A continuación, se para la reacción colocando las muestras en hielo y cargando 9 µl de reacción en cada una de las posiciones de un filtro de fibra de vidrio con grupos activos DEAE de 96 posiciones (*1450-522, Perkin Elmer*). Se deja secar al aire durante 1 hora y se procede a realizar la siguiente serie de lavados (manteniendo siempre el filtro en agitación constante a TA): 3 lavados de 10 minutos y 3 de 5 minutos con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5% (p/v), 1 lavado de 10 minutos con agua miliQ y un último lavado de 10 minutos con etanol 70% (v/v).

Finalmente, se deja secar nuevamente el filtro y se introduce en un horno a 80 °C colocando encima una placa de líquido de centelleo sólido que se funde sobre el filtro (*MeltiLex A, 1450-441 Perkin Elmer*). Una vez impregnado el filtro, se saca del horno, se deja secar y se leen las cuentas por minuto (cpm) en un contador de emisiones β (*1450 MicroBeta TriLux, Perkin Elmer*). Por último, se calcula la concentración de cada dNTP en las muestras interpolando los resultados obtenidos en cpm en la curva patrón de concentración conocida y corrigiendo los factores de dilución correspondientes.



#### 4.5.4. Determinación de actividad alanina aminotransferasa (ALT).

Permite detectar lesión hepatocelular, que podría producirse como consecuencia del tratamiento con AAVs dirigidos a hígado. Se utiliza un método espectrofotométrico que se basa en dos reacciones acopladas:



*Figura 4.9. Reacciones en las cual se basa la determinación de la actividad ALT. ALT, alanina aminotransferasa; LDH, lactato deshidrogenasa.*

Para determinar la actividad enzimática ALT se mide la absorbancia a 340 nm (longitud de onda de absorción de NADH) durante 10 minutos. Según la estequiometría de la reacción, cada mol de piruvato que se convierte en lactato mediante la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) consume un mol de NADH. Dado que la LDH se añade en exceso en la reacción de determinación de ALT (*Tabla 4.49*), el consumo de NADH estará limitado por la cantidad de piruvato, el cual se obtiene mediante actividad ALT a partir de L-alanina y  $\alpha$ -cetoglutarato. Por lo tanto, la disminución de la lectura de absorbancia a 340 nm indica el consumo de NADH y, consecuentemente, la generación de piruvato por acción de la ALT.

En primer lugar, se realiza un blanco de reacción durante el cual se consumen el piruvato y el NADH endógeno de la muestra problema, que puede desaparecer a causa de otros consumos inespecíficos de NADH. Para ello, se añaden a 50  $\mu\text{l}$  de plasma de ratón concentrado (*apartado 4.4.4*), 720  $\mu\text{l}$  de la siguiente mezcla de reacción:

*Tabla 4.49. Composición de la mezcla de reacción para la determinación de actividad ALT.*

	Volumen ( $\mu\text{l}$ )	Concentración final
L-alanina 0.4M	80	44.4 mM
NADH 2 mM	80	0.22 mM
Tris-HCl 1 M pH 7.5	80	0.1 M
LDH 11.6 U/ $\mu\text{l}$ diluída 1/10 en Tris-HCl 1 M pH 7.5	3	4.8 U/ml
Agua	477	-
Volumen final	720	-

Se incuba la mezcla de reacción durante 10 minutos a 37  $^{\circ}\text{C}$  y se procede a la lectura de la absorbancia a 340 nm durante 10 minutos a 37  $^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se añaden 80  $\mu\text{l}$  de  $\alpha$ -cetoglutarato, se mezcla bien por inversión y se determina nuevamente la absorbancia a 340 nm durante 10 minutos a 37  $^{\circ}\text{C}$ .

Finalmente se calcula la actividad ALT (expresada en UI/L) a partir de las pendientes de las rectas obtenidas, mediante la ley de Lambert-Beer:

$$\text{Actividad ALT} = (A \cdot V_f \cdot 1000) / (\epsilon_{\text{NADH}} \cdot l \cdot V)$$

Dónde: **A** equivale a la diferencia de las pendientes de las rectas obtenidas en función del tiempo ( $\Delta\text{Abs}/\text{minuto}$ ); **V<sub>f</sub>** al volumen final de reacción (ml);  $\epsilon_{\text{NADH}}$  al coeficiente de extinción molar de NADH ( $6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ); **l** a la longitud óptica de la cubeta (cm) y **V** al volumen de muestra (ml).

#### 4.6. PCR cuantitativa a tiempo real.

##### 4.6.1. Determinación del número de copias de *TYMP* por qPCR.

Para determinar la eficiencia de transducción de los diferentes vectores, se determina el número de copias del cADN del gen *TYMP* en los tejidos de los animales tratados. Para ello se utilizan sondas *Taqman* prediseñadas por *Applied Biosystems* para el gen *TYMP* humano (*Hs00157317\_m1*) y el gen murino *Ang1* (*Mm00833184\_s1*). Se prepara la siguiente mezcla de reacción:

*Tabla 4.50. Composición de la reacción para la determinación del número de copias por qPCR.*

	Volumen (µl)	Concentración final
2X TaqMan R Universal PCR Master Mix with UNG ( <i>Applied Biosystems</i> )	5	1X
Sonda Taqman 20X específica de cada gen	0.5	1X
ADN (250 ó 50 ng según dilución)	2.5	62.5-12.5 ng/µl
Agua	2	-
Volumen final	10	-

La curva estándar para la determinación de *TYMP* y *Ang1* se realiza mediante diluciones seriadas en tris-HCl 10 mM pH 8 de dos muestras plasmídicas que contienen clonados el gen humano de la timidina fosforilasa y el gen murino de la angiogenina 1, respectivamente.

La reacción se lleva a cabo en una placa de 384 pocillos en la plataforma *ABI7900 HT* (*Applied Biosystems*). Se cargan, por duplicado, cada uno de los puntos de ambas curvas patrón y dos diluciones de las muestras de ADN (*apartado 4.1.1.3.3*), también por duplicado (250 ó 50 ng de ADN según dilución, realizadas también en tris-HCl 10 mM pH 8). Las condiciones de amplificación son las siguientes:

*Tabla 4.51. Condiciones de amplificación para la determinación del número de copias.*

Temperatura	Tiempo	Ciclos
50 °C	2 minutos	1
95 °C	10 segundos	1
95 °C	15 segundos	40
60 °C	1 minuto	

Los datos obtenidos se analizan con el programa *RQ Manager 1.2.1* (*Applied Biosystems*). Para determinar el número de copias de cada uno de los genes en las diferentes muestras, se interpola el valor de *Ct* obtenido (número de ciclos de amplificación necesarios para dar una señal fluorescente que sobrepase el umbral establecido) para cada una de ellas en la curva patrón. A continuación, se calcula el número de copias de *TYMP* por célula (*N*) para cada muestra:

$$N = (N_x/N_z)*2$$

Dónde *N<sub>x</sub>* equivale al número de copias del gen diana *TYMP* y *N<sub>z</sub>* al número de copias del gen endógeno de referencia *Ang1*. El valor obtenido se multiplica por dos porque cada célula es diploide para el gen de referencia.

#### 4.6.2. Determinación del número de copias de mtADN por qPCR.

Para determinar el número de copias de mtADN se utiliza un juego de cebadores y una sonda *Taqman* que reconocen la región 16S del ADN mitocondrial. Las secuencias de los diferentes elementos son las siguientes:

- Sonda MGB: FAM-5' AAGTCCTACGTGATCTGAGGT 3'-MGB
- Cebador directo: AATGGTTCGTTTGTTCACGATT
- Cebador reverso: AGAAACCGACCTGGATTGCTC

En este caso la composición de la mezcla de reacción es la siguiente:

*Tabla 4.52. Composición de la mezcla de reacción para la determinación de mtADN.*

	Volumen (µl)	Concentración final
2X TaqMan R Universal PCR Master Mix with UNG ( <i>Applied Biosystems</i> )	5	1X
Sonda Taqman 16S 5 µM	0.3	0.15 µM
Cebador directo 10 µM	0.3	0.3 µM
Cebador reverso 10 µM	0.3	0.3 µM
ADN (20 ó 5 ng según dilución)	2.5	5-1.25 ng/µl
Agua	1.6	-
Volumen final	10	-

El resto del procedimiento (condiciones de las muestras de ADN, condiciones de reacción, plataforma utilizada y análisis de resultados) coincide con los descritos en el apartado anterior (*apartado 4.6.1*). No obstante, en este caso se utilizan construcciones plasmídicas que contienen clonados los genes murinos *Ang1* y *16S* para la realización de las curvas patrón.

#### 4.7. Identificación de proteínas por western-blot.

##### 4.7.1. Obtención de extractos proteicos.

Se homogenizan aproximadamente 20 mg de tejido murino en 200 µl de tampón de lisis (tritón x-100 1%, PMSF 2 mM, 2-mercaptoetanol 0.02%, tris-HCl 50 mM pH 7.2) por disrupción mecánica utilizando un homogeizador *Potter S (B. Braun)* y se centrifuga el homogenado durante 30 minutos a 20800 xg y 4 °C. Posteriormente, se recupera el sobrenadante y se determina la concentración de proteína en las muestras (*apartado 4.1.3*). Una vez conocida la concentración, se preparan 10 µl de muestra a una concentración final de 2 µg/µl (diluyendo con tampón de lisis) y se añaden 5 µl de tampón de carga 3X (15% 2-beta mercaptoetanol, 6% SDS, 3% glicerol, 0.005% azul de bromofenol, 50 mM tris-HCl pH 6.8). Por último, se incuban las muestras 5 minutos a 95 °C.

##### 4.7.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se prepara un gel de poliacrilamida de 1 mm de grosor utilizando el sistema *Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad)*. En primer lugar, se prepara un gel separador al 10% de poliacrialmida que presenta la siguiente composición:

**Tabla 4.53. Composición del gel separador (10% poliacrilamida).**

	Volumen (ml)
Agua	3.58
Poliacrilamida 40% (p/v)	1.88
Tris 1.5 M pH 8.8	1.9
Dodecilsulfato sódico (SDS) 10% (p/v)	0.075
Persulfato de amonio (APS) 10% (p/v)	0.075
TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina)	0.0015

Se añaden unos 5 ml de la mezcla por gel, seguidamente se añade isopropanol y se deja polimerizar el gel durante al menos 30 minutos. Una vez polimerizado, se elimina el isopropanol por inversión y se realiza un lavado con agua para eliminar restos. Se añaden 2 ml de la mezcla del gel concentrador al 6% de poliacrilamida, se coloca el peine evitando la formación de burbujas y se deja polimerizar otros 30 minutos.

**Tabla 4.54. Composición del gel concentrador (6% poliacrilamida).**

	Volumen (ml)
Agua	1.43
Poliacrilamida 40% (p/v)	0.3
Tris 0.5 M pH 6.8	0.25
Dodecilsulfato sódico (SDS) 10% (p/v)	0.02
Persulfato de amonio (APS) 10% (p/v)	0.02
TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina)	0.002

Una vez polimerizado el gel concentrador se retira el peine y se cargan 15 µl de muestra por carril, reservando siempre un carril dónde se cargan 7 µl del marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ Standards Dual Color (Bio-Rad)*. Los pocillos vacíos se cargan con 5 µl de tampón de carga 3X.

Finalmente se lleva a cabo la electroforesis en un tampón de electroforesis (glicina 192 mM, SDS 0.1% (p/v), tris 25 mM pH 8.3) a 80 V durante los primeros 30 minutos y, posteriormente, a 120 V hasta que desaparece el frente de electroforesis.

#### 4.7.3. Transferencia.

Se realiza en membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) de 6x9 cm (*Bio-Rad*) previamente activadas mediante inmersión durante 1 minuto en metanol y 30 minutos en tampón de transferencia frío (glicina 39 mM; metanol 20% (v/v); tris 48 mM, pH 9). El gel se equilibra en tampón de transferencia frío durante 15 minutos.

A continuación, se procede al montaje de la transferencia, que se realiza utilizando el sistema *Trans-Blot® SD Semi-Dry (Bio-Rad)*. En primer lugar, se colocan cuatro filtros de papel Whatman empapados en tampón de transferencia frío (se colocan uno a uno evitando que queden burbujas). Seguidamente, se coloca la membrana de PVDF, se eliminan las burbujas y se coloca el gel de poliacrilamida previamente equilibrado. Finalmente se colocan nuevamente cuatro filtros Whatman y se empapan bien vertiendo directamente sobre ellos tampón de transferencia frío. Una vez montado el equipo de transferencia, ésta se realiza a 15 V durante 45 minutos evitando que el amperaje supere 290 mA.

#### 4.7.4. Inmunodetección y revelado.

Una vez finalizada la transferencia, se bloquea la membrana de PVDF sumergiéndola, con la cara transferida hacia arriba, en 20 ml de leche al 5% (p/v) en TTBS (tampón tris salino suplementado con Tween 20) (NaCl 137 mM, Tween-20 0.1% (v/v), Tris 20 mM pH 7.6) durante 1 hora a TA con agitación constante. A continuación, se realiza un ciclo de lavados que consta de un total de 5 lavados: 2 lavados de 10 minutos y 3 lavados de 5 minutos en TTBS a TA en agitación constante.

Acto seguido se añade el anticuerpo primario de la proteína que se desea visualizar. Para la detección de TP humana, se utiliza un anticuerpo policlonal de conejo (*ab69120, Abcam*) diluido 1:500 en 7 ml de leche al 5% en TTBS y se incuba en agitación constante durante 1 hora a TA o ON a 4 °C. Pasado este tiempo se realiza nuevamente un ciclo de lavados igual al descrito anteriormente. A continuación, se incuba la membrana con un anticuerpo secundario generado en cabra que reconoce IgGs de conejo y que está conjugado con peroxidasa (*P0448, Dako*) diluido 1:7500 en 7 ml de leche al 5% en TTBS y se incuba durante 1 hora a TA en agitación constante. Una vez finalizada la incubación se realiza nuevamente un ciclo de lavados en TTBS y, por último, se hace un lavado de 5 minutos en TBS (tampón tris salino) (NaCl 137 mM, tris 20 mM pH 7.6).

Para el revelado, se elimina el TBS en el que está sumergida la membrana y se añade sobre ella una mezcla formada por 1 ml de cada uno de los reactivos del kit *Immobilon™ Western (WBKLS0500, Millipore)*. Finalmente, las imágenes se obtienen mediante captación de quimioluminiscencia en el detector *ODYSSEY Fc (Li-COR)* tras una exposición de 30 segundos y el análisis densitométrico se realiza con el programa informático *Image J*.

Sobre la misma membrana, se realiza también la inmunodetección de la proteína control. Para esto, se utiliza un anticuerpo monoclonal murino que reconoce la proteína  $\beta$ -actina (*clon AC-74, A5316, Sigma*) diluido 1:5000 en 7 ml de leche al 5% en TTBS. En el caso del músculo esquelético, la proteína control utilizada es la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que se detecta con un anticuerpo monoclonal murino (*GA1R, Ambion*) diluido 1:5000 en leche al 5% en TTBS. El resto del procedimiento es igual al descrito para la detección de TP. No obstante, en este caso se utiliza un anticuerpo secundario producido en conejo que reconoce IgGs de ratón (*P0260, Dako*), también conjugado con peroxidasa.

#### 4.8. Análisis histoquímico.

##### 4.8.1. Tinción hematoxilina-eosina.

Se realiza para analizar morfológicamente muestras de hígado de ratón con el fin de detectar anomalías anatomopatológicas causadas por el tratamiento con AAVs. En este tipo de tinción se utilizan dos colorantes: la hematoxilina, que marca estructuras ácidas (como el núcleo) en tonos azul y púrpura y la eosina, que tiñe componentes básicos (como el citoplasma y otras estructuras extracelulares) en tonos rosáceos.

La tinción se lleva a cabo en criosecciones de 10  $\mu$ m de grosor. Se introduce el portaobjetos en hematoxilina de Mayer filtrada durante 2 minutos (*1.09249.0500, Merck*) y a continuación se realizan, de forma secuencial, los siguientes lavados: agua corriente, HCl al 2.4% en etanol 80%, amoníaco al 2.4% en agua destilada y, nuevamente, agua corriente. Acto seguido, se realiza la tinción con eosina 0.2% filtrada durante 2 minutos (*1.15935.0025, Merck*), un lavado en agua corriente y se procede a

deshidratar la muestra. Para ello, se sumerge la muestra en las siguientes soluciones: 2X5 minutos en etanol 95%, 2X10 minutos en etanol absoluto y 10 minutos en xileno. Por último, se realiza el montaje utilizando medio de inclusión para histología (*DPX, 06522, Sigma-Aldrich*) y se visualizan las preparaciones en un microscopio óptico de campo claro.

#### 4.8.2. Inmunohistoquímica de hígado para la detección de TP.

Se realiza sobre criosecciones de 10  $\mu\text{m}$  de grosor fijadas con acetona:metanol (1:1 v/v) durante 5 minutos. A continuación, se realizan 3 lavados de 5 minutos en TBS (50 mM tris-HCl pH 7.6, 125 mM NaCl) y posteriormente se procede a realizar un bloqueo con BSA al 2% (p/v) en TBS durante 30 minutos a TA. Para ello, se añaden entre 50 y 100  $\mu\text{l}$  de la solución de bloqueo sobre las láminas secas asegurando que los cortes queden bien cubiertos y se colocan en una cámara de incubación que consiste en una placa de cultivo grande sobre la que se introduce una matriz esponjosa húmeda.

Una vez finalizado el bloqueo, se realiza la incubación de los cortes con el anticuerpo primario anti-TP (*ab69120, Abcam*) ON a 4 °C. Concretamente, se secan los portaobjetos y se añaden 50  $\mu\text{l}$  de anticuerpo (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en BSA al 2% en TBS) por lámina, de forma que se cubran todos los cortes, y se colocan en la cámara de incubación. A la mañana siguiente, se realizan 3 lavados de 5 minutos en TBS y se procede a la incubación de los cortes con un anticuerpo secundario producido en cabra, con afinidad por IgGs de conejo, conjugado al fluoróforo Alexa 488 (*A32731, ThermoFisher Scientific*), diluido 1:200 en BSA al 2% en TBS. Este fluoróforo emite coloración verde cuando se excita con una longitud de onda de 488 nm. La incubación se lleva a cabo durante 1 hora a TA protegiéndolo de la luz.

Finalmente, se realizan 3 lavados de 5 minutos en TBS y se procede al montaje de las láminas con medio de montaje para fluorescencia (*S3023, Dako*) o a la tinción de núcleos (*apartado 4.8.3*).

#### 4.8.3. Tinción de núcleos.

Se realiza con Hoechst 33342 a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en agua. Para ello, se incuban los diferentes cortes con la solución de tinción durante 1 hora a TA protegidos de la luz. A continuación, se realizan 3 lavados de 5 minutos en TBS y se procede al montaje de las preparaciones con medio de montaje para fluorescencia (*S3023, Dako*). Finalmente, se visualizan los núcleos con el microscopio de fluorescencia *FSX100 (Olympus)* utilizando una longitud de onda de excitación de 350 nm. La fluorescencia observada es de color azul cian.

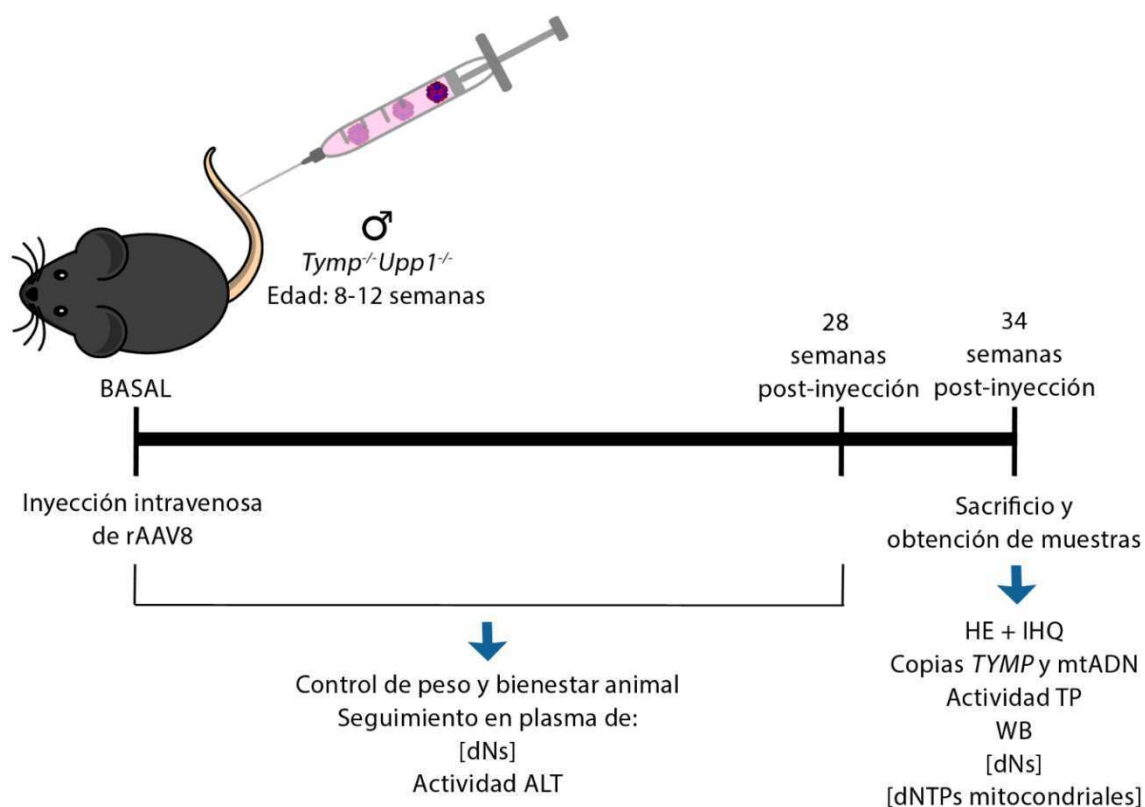
### 4.9. Diseño experimental.

Tal y como se ha comentado en el *apartado 4.4.3*, el tratamiento con rAAVs se lleva a cabo en ratones macho doble KO *Tymp<sup>-/-</sup>Upp1<sup>-/-</sup>* de entre 8 y 12 semanas de edad mediante una única inyección intravenosa por vena caudal de los diferentes vectores a diferentes dosis (*Tabla 4.43*). Antes de realizar la inyección se determina la concentración de dThd y dUrd y la actividad ALT en plasma para disponer de los valores basales.

A partir de este momento y hasta pasadas 28 semanas desde la inyección de rAAVs, se realiza un control del peso y del bienestar de los animales y un seguimiento de la concentración de dThd y dUrd y de la actividad ALT en plasma. Para esto se hacen extracciones periódicas de sangre a través de la vena safena (*apartado 4.4.4*). El seguimiento se lleva a cabo semanalmente durante las primeras 4 semanas, cada 15 días durante las 4 siguientes y mensualmente hasta llegar a las 28 semanas.

34 semanas después de la administración de los vectores (punto final del estudio), se sacrifican los animales para la obtención de muestras (*apartado 4.4.5*) y se evalúan los siguientes parámetros:

- Análisis histoquímico del hígado mediante tinción hematoxilina-eosina (*apartado 4.8.1*).
- Inmunohistoquímica en hígado para la detección de TP (*apartado 4.8.2*).
- Estudio del número de copias de *TYMP* en hígado, cerebro, músculo esquelético e intestino delgado (*apartado 4.6.1*).
- Actividad TP en hígado, cerebro, músculo esquelético e intestino delgado (*apartado 4.5.2*).
- Western-blot anti-TP en hígado, cerebro, músculo esquelético e intestino delgado (*apartado 4.7*).
- Concentración de nucleósidos (dThd y dUrd) en plasma, hígado, cerebro, músculo esquelético e intestino delgado (*apartado 4.5.1*).
- Concentración de dNTPs mitocondriales en hígado (*apartado 4.5.3*).
- Estudio de copias de mtADN en hígado (*apartado 4.6.2*).



**Figura 4.10. Representación esquemática del procedimiento experimental.** *dNs*, desoxiribonucleósidos (incluye *dThd* y *dUrd*); *ALT*, alanina aminotransferasa; *HE*, hematoxilina-eosina; *IHQ*, inmunohistoquímica; *mtADN*, ADN mitocondrial; *TP*, timidina fosforilasa; *WB*, western-blot; *dNTPs*, desoxiribonucleósidos trifosfato

#### 4.10. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realiza con el software *GraphPad Prism 6* (*GraphPad Software, Inc.*). Los tests utilizados en cada caso aparecen especificados en los pies de figura. No obstante, de forma global, se han utilizado test no paramétricos (test de Mann-Whitney, correlación de Spearman) en aquellos casos en los que  $n < 15$  debido a que no puede asumirse una distribución normal de las muestras y tests paramétricos (t-test, correlación de Pearson) cuando  $n > 15$ .

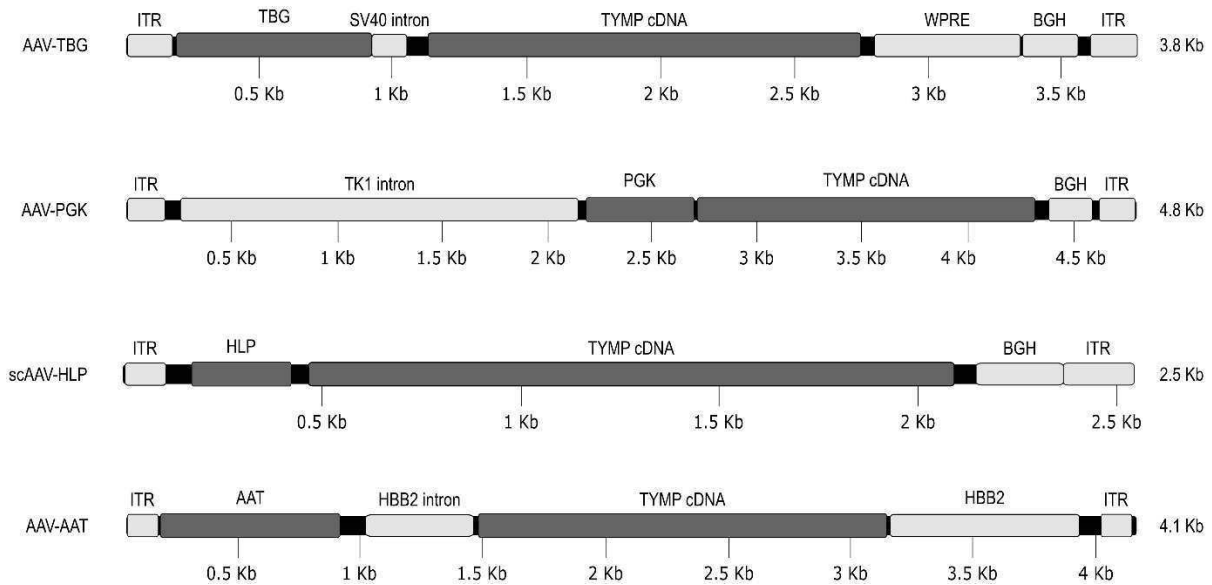
## **5. RESULTADOS**





### 5.1. Construcción de rAAV.

A excepción de la construcción del vector AAV-TBG, la cual se llevó a cabo en el grupo del Dr. Massimo Zeviani (MRC-Mitochondrial Biology Unit, Cambridge, UK) en colaboración con nuestro grupo de investigación<sup>100</sup>, el resto de vectores utilizados se han construido en nuestro laboratorio mediante varios sub-clonajes intermedios (*apartado 4.2.1*). Las construcciones finales son las siguientes:

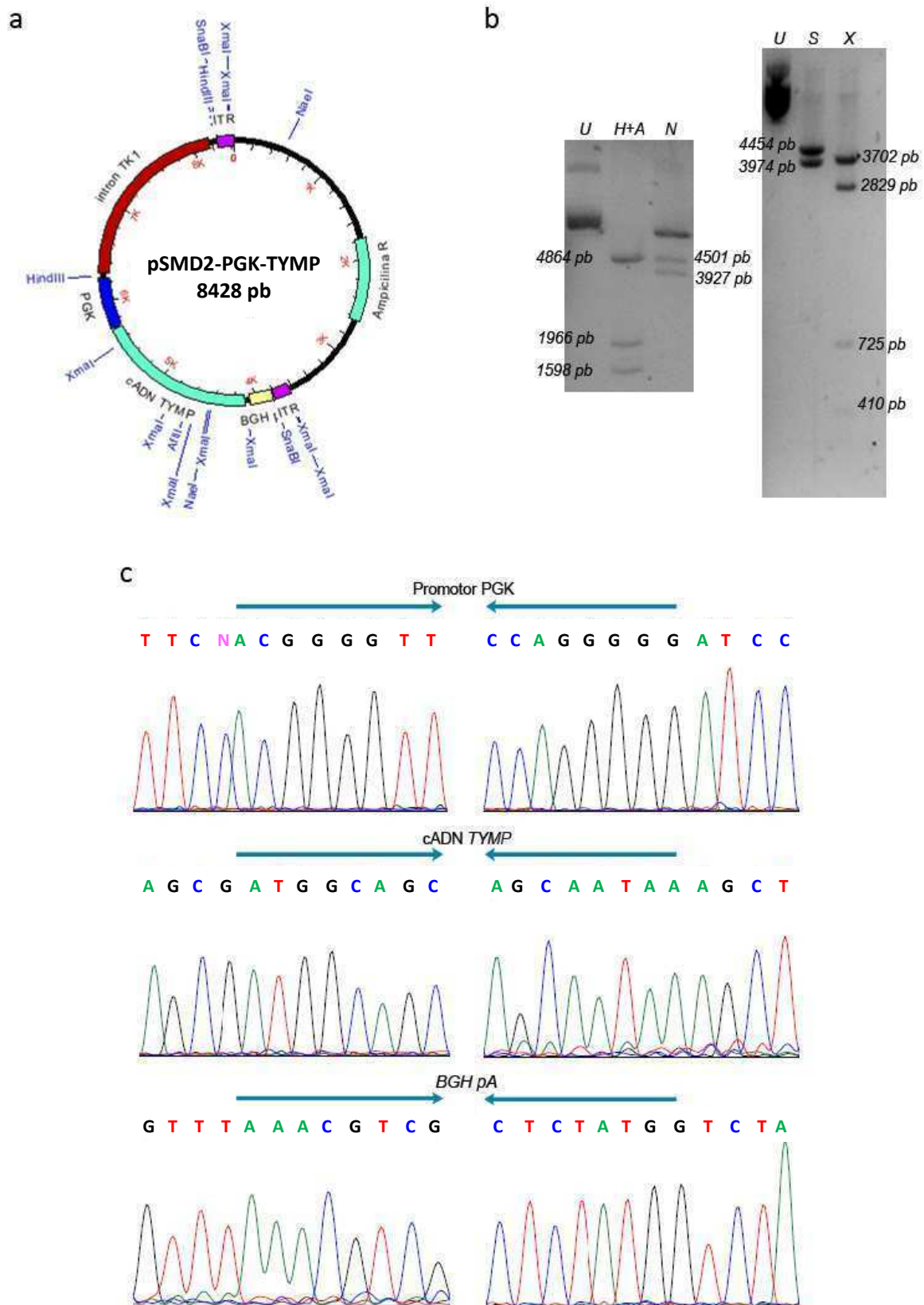


**Figura 5.1. Representación esquemática de los diferentes vectores AAV2/8 testados.** ITR, repeticiones terminales invertidas; TBG, promotor hepático de la tiroxina de unión a globulina; TYMP cDNA, región codificante del gen de la timidina fosforilasa humana; WPRE, elemento de regulación post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota; BGH, señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina; TK1 intrón, secuencia correspondiente al intrón 3 del gen TK1 humano; PGK, promotor constitutivo de la fosfoglicerato quinasa humana; HLP, promotor híbrido específico de hígado; AAT, promotor de la alfa-1-antitripsina humana; HBB2 intron, secuencia intrónica de la subunidad  $\beta$ -2 del gen de la hemoglobina humana; HBB2, señal de poliadenilación de la subunidad  $\beta$ -2 de la hemoglobina bovina.

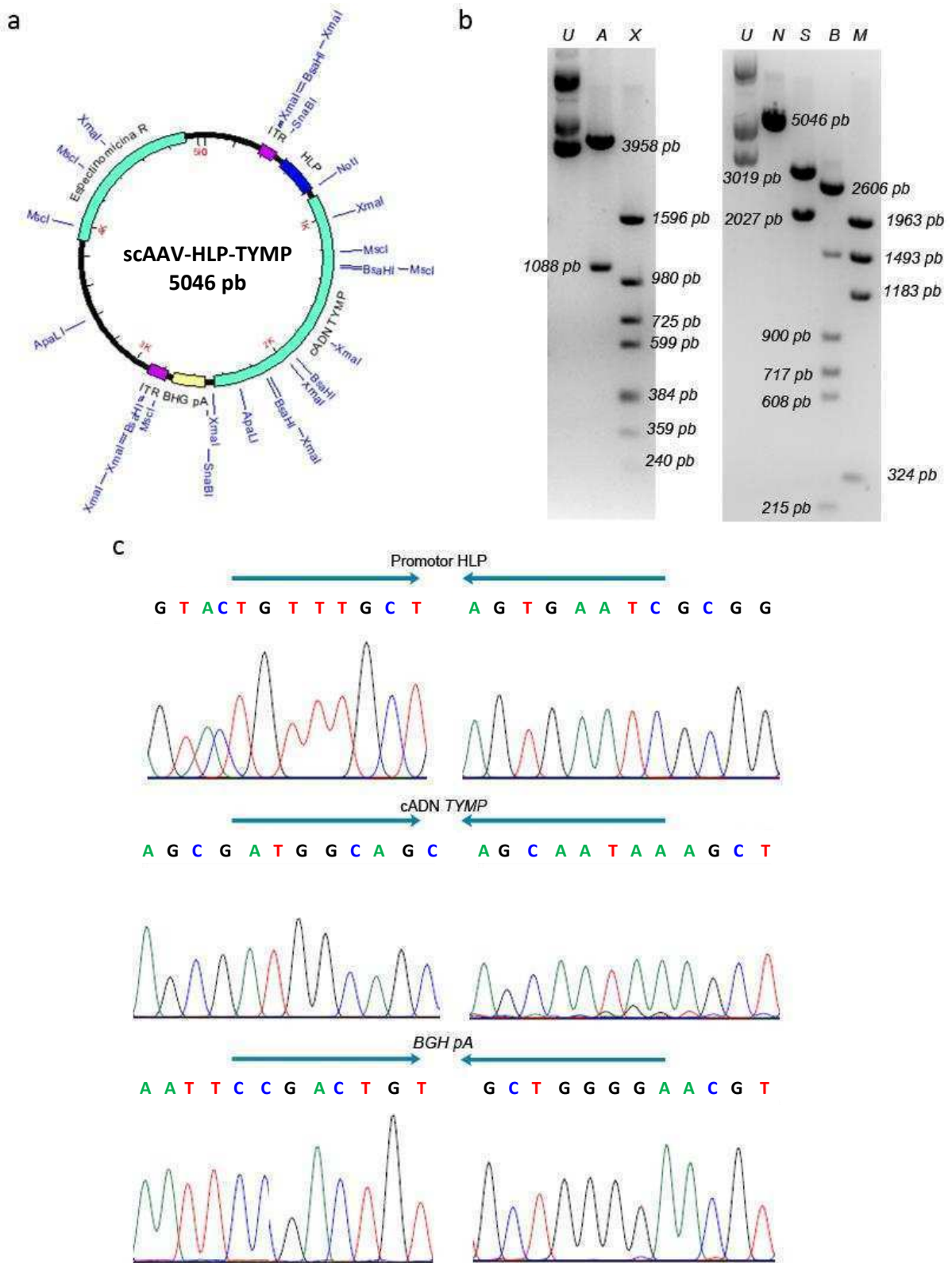
Una vez obtenidos los plásmidos de cada una de las construcciones finales (*Figura 5.2a, 5.3a y 5.4a*), éstos se han comprobado por restricción enzimática y se ha observado que los tamaños de bandas obtenidos concuerdan con los esperados en cada caso (*Figura 5.2b, 5.3b y 5.4b*).

Posteriormente, se ha secuenciado la región comprendida entre los ITRs para comprobar la integridad y la correcta orientación de cada uno de los elementos clave de los diferentes vectores (promotor, cADN de *TYMP* y señal de poliadenilación) (*Figuras 5.2c, 5.3c y 5.4c*). En el caso de los vectores PGK y AAT se han secuenciado también las regiones intrónicas TK1 y HBB2, respectivamente.

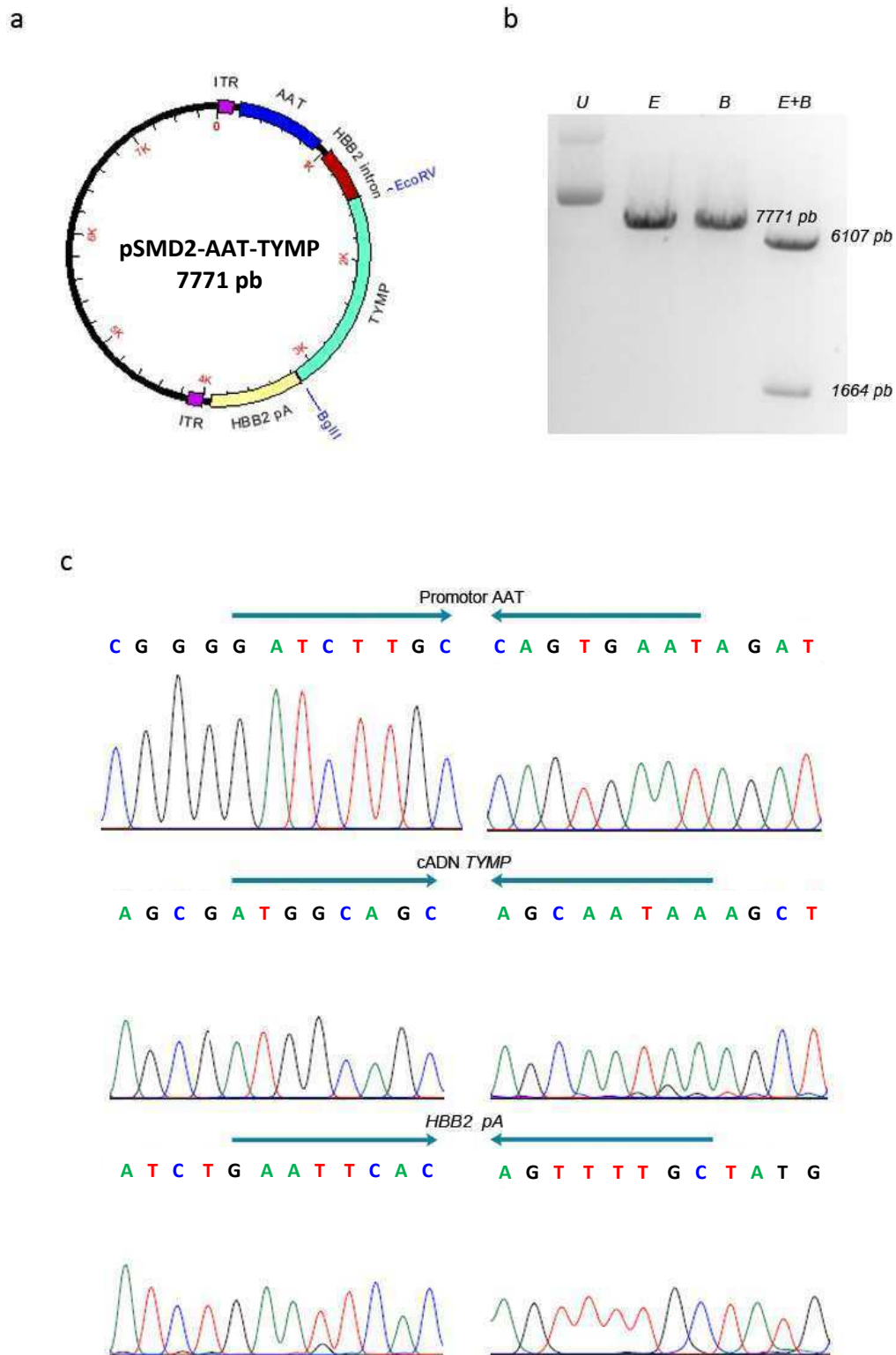
Una vez confirmada la secuencia de los plásmidos finales, se ha realizado una maxiprep de cada uno de ellos para proceder a la producción de los diferentes AAV. Éstos se han comprobado también por restricción enzimática utilizando las mismas dianas de corte.



**Figura 5.2. Comprobación del plásmido AAV-PGK-TYMP.** a) Representación gráfica de la construcción final y de las dianas utilizadas para la comprobación de la secuencia por restricción enzimática. b) Patrones de bandas obtenidos para las diferentes enzimas. U, vector no digerido; H+A, HindIII + AflIII; N, NaeI; S, SnaBI; X, XmaI. c) Electroferogramas correspondientes al inicio y fin de secuencia del promotor PGK, cADN TYMP y señal de poliadenilación (pA) BGH.



**Figura 5.3. Comprobación del plásmido scAAV-HLP-TYMP.** a) Representación gráfica de la construcción final y de las dianas utilizadas para la comprobación de la secuencia por restricción enzimática. b) Patrones de bandas obtenidos para las diferentes enzimas. U, vector no digerido; A, ApaLI; X, XmaI; N, NotI; S, SnaBI; B, BsaHI; M, MscI. c) Electroferogramas correspondientes al inicio y fin de secuencia del promotor HLP, cADN TYMP y señal de poliadenilación (pA) BGH.



**Figura 5.4. Comprobación del plásmido AAV-AAV-TYMP.** a) Representación gráfica de la construcción final y de las dianas utilizadas para la comprobación de la secuencia por restricción enzimática. b) Patrones de bandas obtenidos para las diferentes enzimas. U, vector no digerido; E, EcoRV; B, BglIII. c) Electroferogramas correspondientes al inicio y fin de secuencia del promotor AAT, cADN TYMP y señal de poliadenilación (pA) HBB2.

## 5.2. Titulación de producciones víricas.

Tal y como se ha comentado en el apartado 4.3.1, la producción de los AAV testados se ha llevado a cabo por diferentes centros, cada uno de los cuales utiliza un determinado método de producción, purificación y titulación. Para evitar diferencias en las dosis administradas debido a discrepancias en el método de titulación empleado, se ha retitulado cada uno de los lotes utilizando un método de cuantificación de ADN de doble cadena (*picogreen*) que permite determinar también el porcentaje de ADN no encapsidado (*ver apartado 4.3.2*).

*Tabla 5.1. Resultados de la retitulación de las diferentes producciones víricas.*

Vector	Titulación previa		Retitulación	
	Método	Título (vg/ml)	Título (vg/ml)	% ADN no encapsidado
AAV-TBG	qPCR/dot-blot	$1.8 \cdot 10^{13}$	$5.2 \cdot 10^{12}$	45.7
AAV-PGK	Picogreen	$4.5 \cdot 10^{12}$	$3.7 \cdot 10^{12}$	3
AAV-HLP	Picogreen	$9.7 \cdot 10^{12}$	$6.2 \cdot 10^{12}$	2.6
AAV-AAT	qPCR	$5.3 \cdot 10^{12}$	$5.3 \cdot 10^{13}$	1.3

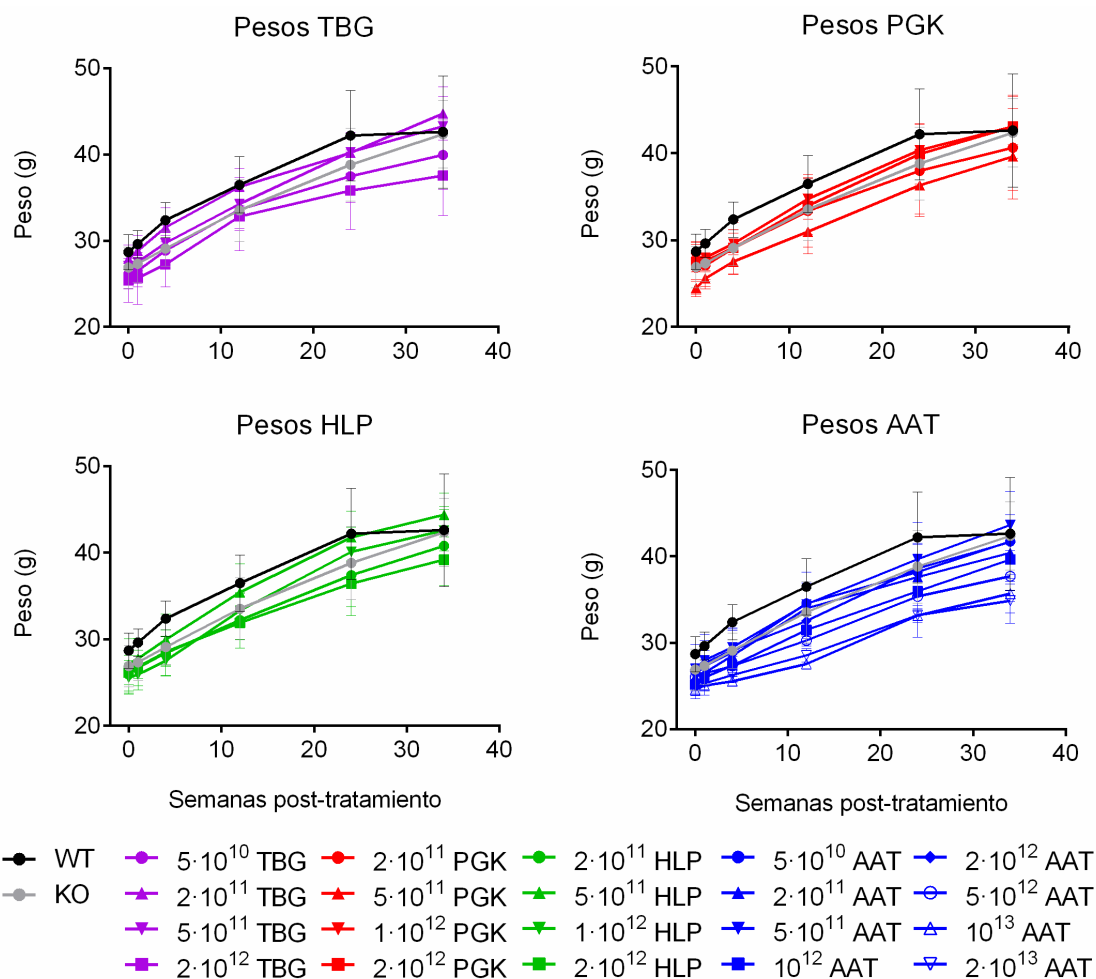
Los resultados obtenidos (*Tabla 5.1*) muestran que el uso de una u otra metodología puede influir de forma muy notable en el título final de una determinada preparación vírica. En el caso de los vectores PGK y HLP el título nuevo determinado es muy similar al título previo proporcionado por el centro encargado de la realización de la producción, lo que indica la robustez y reproducibilidad de la técnica utilizada. Por el contrario, los resultados de la retitulación son 3.5 veces inferiores en el caso del vector TBG y 10 veces superiores en el vector AAT, en comparación con los títulos previos obtenidos mediante qPCR y dot-blot.

Por lo que refiere a la cantidad de ADN no encapsidado puede observarse que, mientras que en las producciones de los vectores PGK, HLP y AAT el porcentaje se sitúa entre el 1 y el 3%, el 45.7% del total de genomas de la preparación TBG no están encapsidados.

## 5.3. Monitorización de parámetros físicos, bioquímicos y toxicológicos a lo largo del tratamiento.

### 5.3.1. Control de peso.

Con el fin de evaluar el bienestar animal y poder detectar anomalías debidas a la administración de AAVs, se ha llevado a cabo un control de peso rutinario de los animales a lo largo de todo el tratamiento. Tal y como muestran los datos representados en la *Figura 5.5*, no se han observado diferencias entre los ratones KO sin tratar y los tratados con los diferentes vectores y dosis. No obstante, pese a que el crecimiento en ratones KO es ligeramente más lento que en ratones WT, tampoco existen diferencias significativas entre ambos grupos.

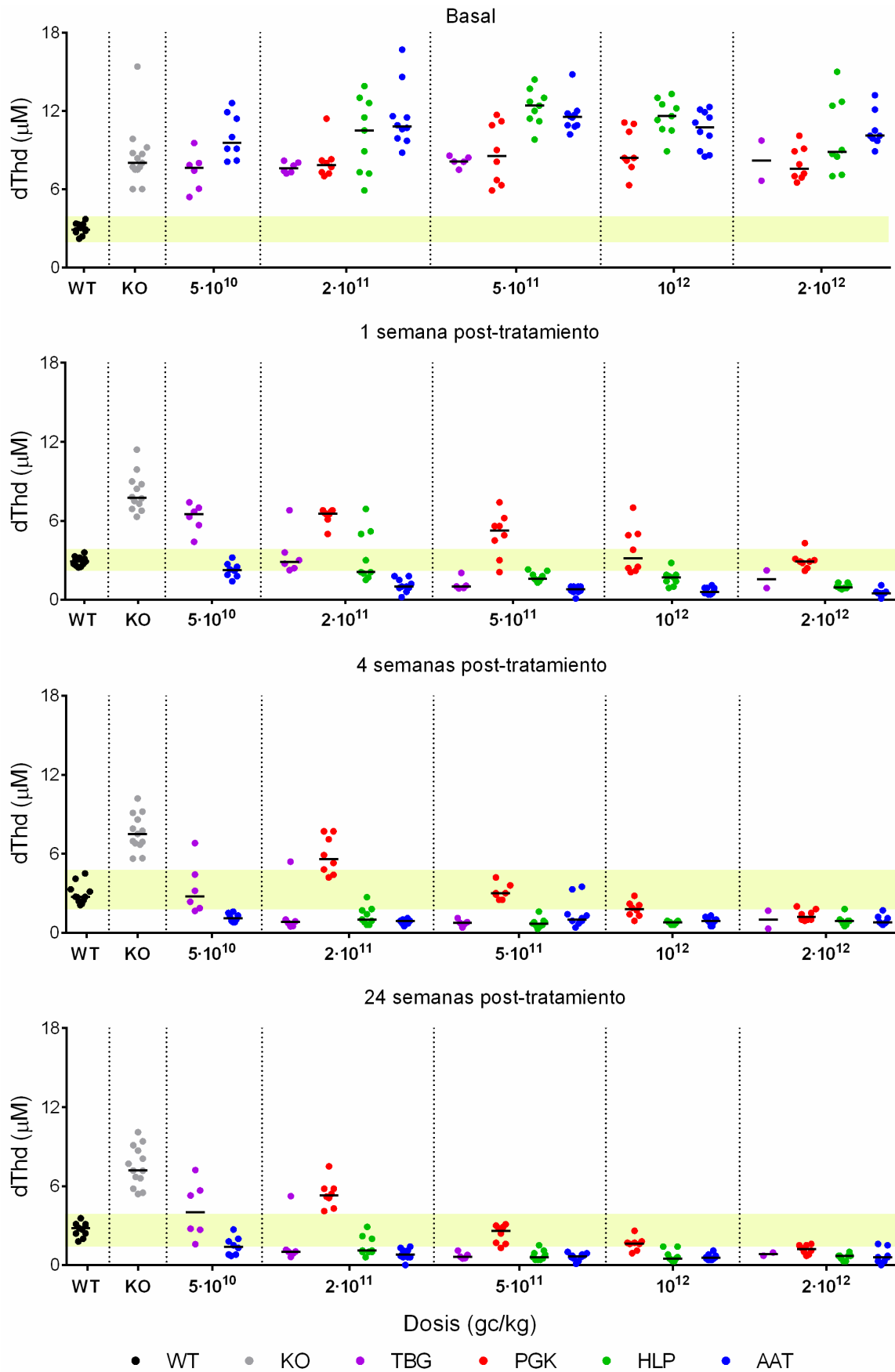


**Figura 5.5. Evolución del peso de los diferentes grupos de estudio.** Los resultados muestran el promedio de peso en gramos. Las barras de error representan la desviación estándar. El tiempo cero corresponde al peso de los ratones en el momento de la administración (8-12 semanas de edad).

### 5.3.2. Concentración de nucleósidos en plasma.

Para determinar la eficacia de cada uno de los vectores testados se ha realizado un seguimiento de la concentración de nucleósidos en plasma a lo largo del tratamiento.

El promedio de la concentración plasmática de dThd en animales KO sin tratar es de entre 3 y 4 veces la de los animales WT durante todo el periodo estudiado (los rangos oscilan entre 5.4 y 16.7  $\mu\text{M}$  para el grupo KO y entre 1.8 y 4.5  $\mu\text{M}$  para el grupo WT). No obstante, el tratamiento de ratones KO con los diferentes vectores propuestos a dosis iguales o superiores a  $5 \cdot 10^{11}$  gc/kg permite reducir la concentración de dThd en plasma hasta niveles iguales o inferiores al de los animales WT durante al menos 24 semanas después de la administración vírica, en todos los casos. A pesar de que todos los vectores resultan eficaces a dosis altas ( $>5 \cdot 10^{11}$  gc/kg), pueden observarse diferencias en los efectos producidos por cada uno de ellos a dosis más bajas. La diferencia más evidente es que el descenso en los niveles de dThd es mayor y más rápido en los animales tratados con los vectores de expresión específica de hígado (TBG, HLP y AAT) que en los animales tratados con el vector de expresión constitutiva (PGK) (Figura 5.6).

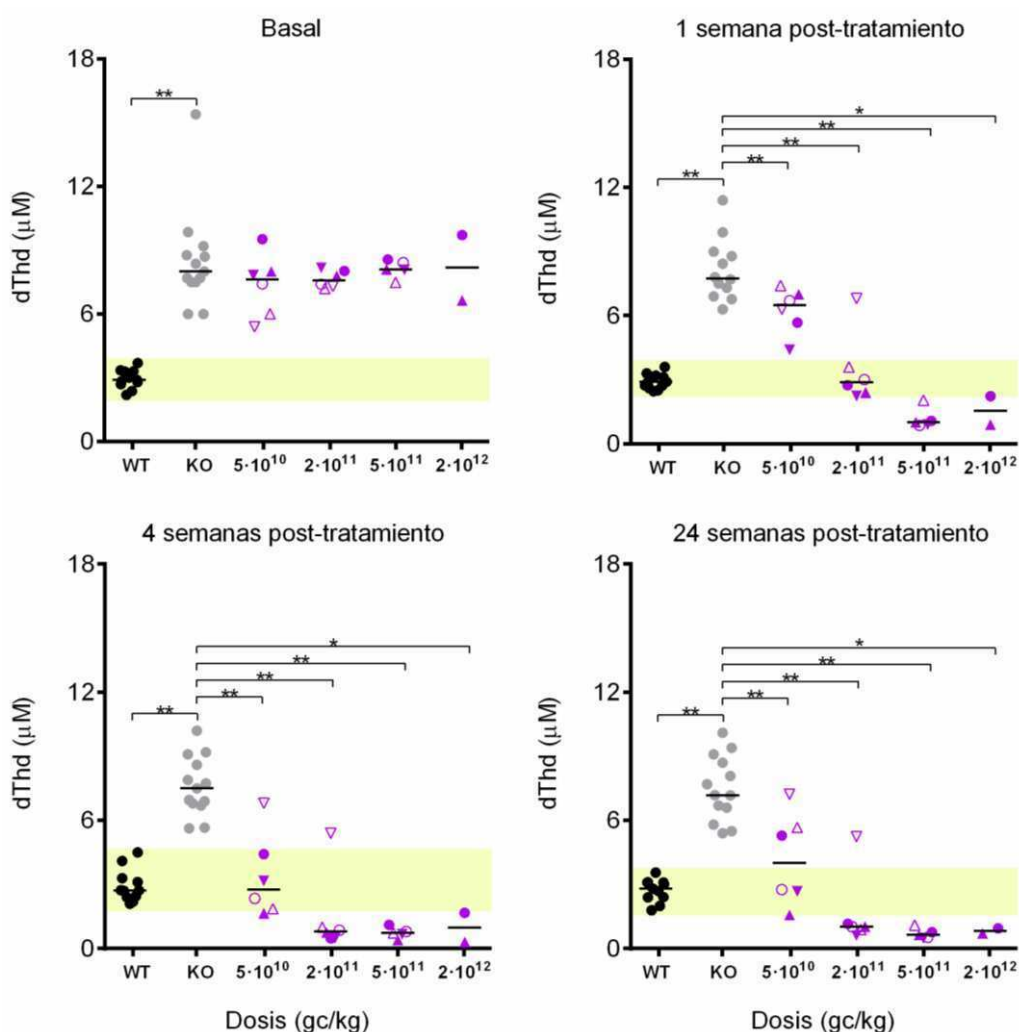


**Figura 5.6.** Concentración de dThd en plasma en los diferentes grupos de animales a diferentes tiempos. El área sombreada en amarillo corresponde al rango de concentración de los animales WT. Las líneas horizontales representan la mediana.



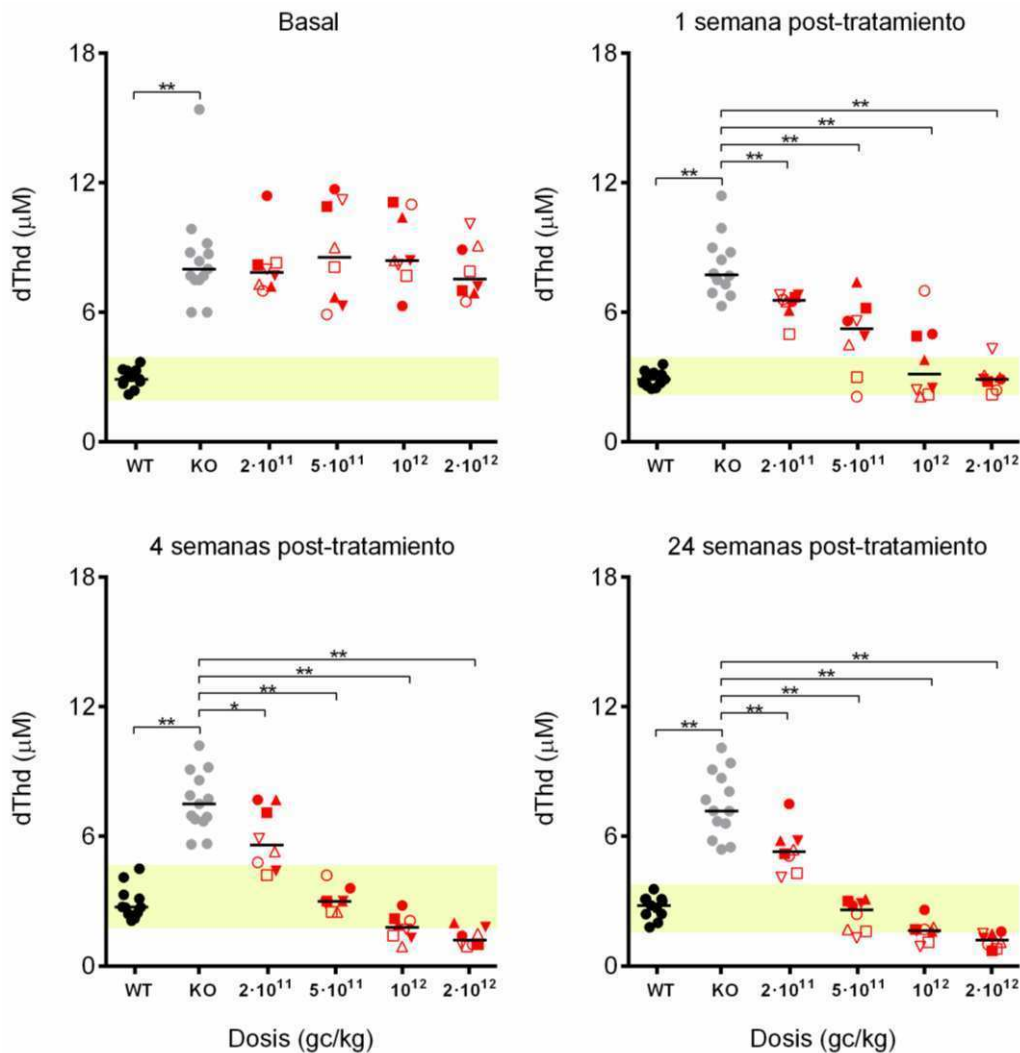
Para poder ver en detalle los valores de dThd plasmática en cada uno de los grupos tratados con los diferentes vectores y dosis, así como las diferencias significativas existentes entre grupos, se muestran los resultados desglosados para cada vector (*Figuras 5.7-5.10*). Además, con el fin de realizar un seguimiento individualizado de los diferentes parámetros evaluados, se ha representado cada animal con un símbolo distinto dentro de cada grupo. La simbología se mantiene a lo largo de toda la sección de resultados para cada ratón.

En el caso de los animales tratados con el vector TBG, una semana es suficiente para reducir los niveles de dThd hasta valores de concentración iguales o inferiores a los WT en el 92.3% de los animales tratados con la una dosis igual o superior a  $2 \cdot 10^{11}$  gc/kg. Además, estas concentraciones se mantienen por debajo de  $1.1 \mu\text{M}$  en todos los casos hasta, al menos, 24 semanas post-tratamiento. Por lo que refiere a la dosis más baja testada ( $5 \cdot 10^{10}$  gc/kg), 5 de un total de 6 animales (83.3%) logra normalizar los valores de dThd en plasma 4 semanas después de la administración. Sin embargo, tras 24 semanas, el efecto terapéutico se mantiene únicamente en el 50% de los casos. Así pues, la dosis mínima efectiva con el vector TBG es de  $2 \cdot 10^{11}$  gc/kg (*Figura 5.7*).



**Figura 5.7. Vector TBG: Evolución de la concentración de dThd en plasma.** Concentración de dThd en plasma en animales wild-type (WT, n=11), knock-out (KO, n=13) y animales tratados con el vector TBG a diferentes dosis ( $5 \cdot 10^{10}$  y  $2 \cdot 10^{11}$ , n=6;  $5 \cdot 10^{11}$ , n=5 y  $2 \cdot 10^{12}$ , n=2). Las líneas horizontales representan la mediana. Los asteriscos muestran las diferencias significativas (test de Mann-Whitney) de cada grupo respecto al KO (\*=  $p < 0.05$ ; \*\*= $p < 0.01$ ). El área sombreada en amarillo corresponde al rango de concentración de los animales WT.

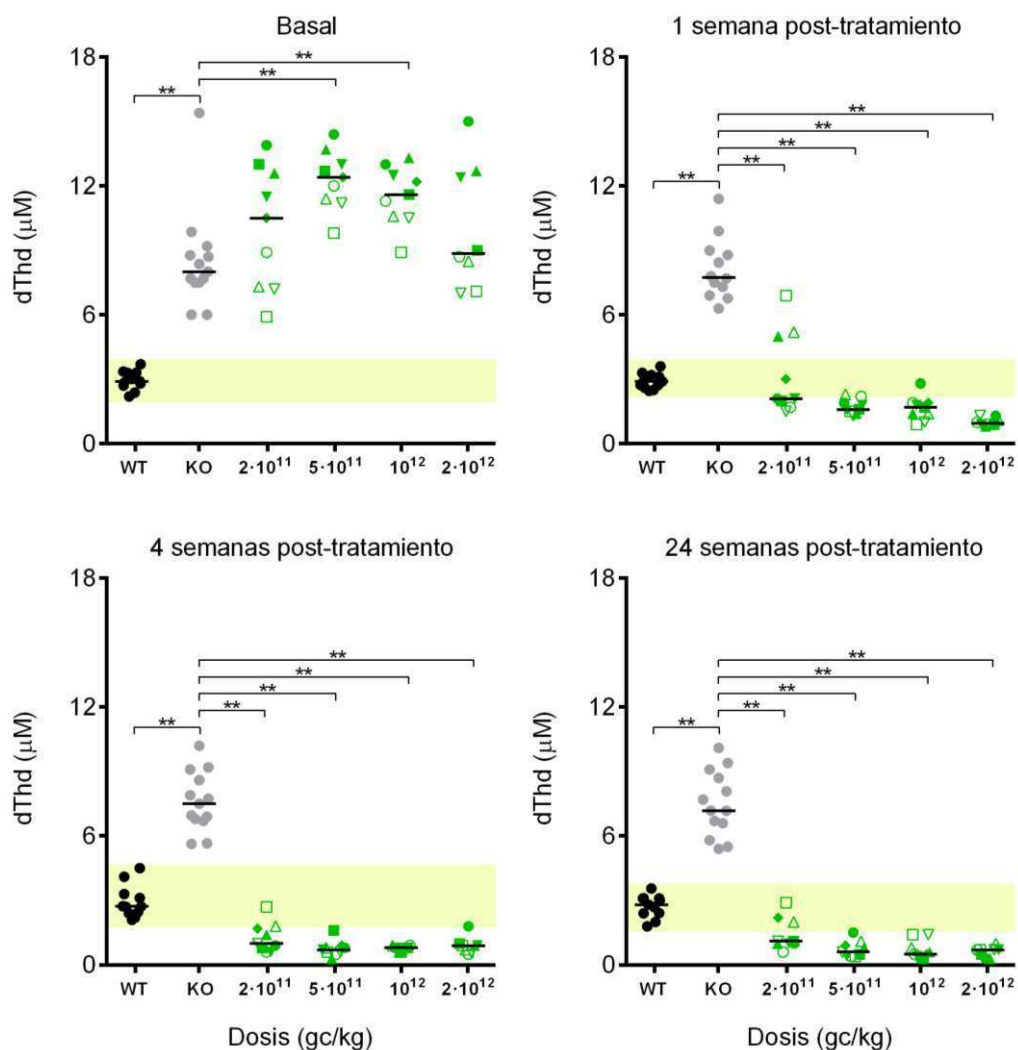
En el caso del vector PGK, la mínima dosis con efecto terapéutico es de  $5 \cdot 10^{11}$  gc/kg y el tiempo necesario para normalizar la concentración de dThd en plasma es de 4 semanas. A diferencia de lo que ocurre con los vectores de expresión específica de hígado, la administración de  $2 \cdot 10^{11}$  gc/kg únicamente produce efecto en el 25% de los casos tras 4 semanas de tratamiento. No obstante, 24 semanas después de la administración, la concentración de dThd vuelve a situarse por encima del rango de concentración WT y únicamente los animales tratados con una dosis mínima de  $5 \cdot 10^{11}$  gc/kg mantienen el efecto terapéutico (Figura 5.8).



**Figura 5.8. Vector PGK: Evolución de la concentración de dThd en plasma.** Concentración de dThd en plasma en animales wild-type (WT, n=11), knock-out (KO, n=13) y animales tratados con el vector PGK a diferentes dosis (n=8 para todas las dosis). Las líneas horizontales representan la mediana. Los asteriscos muestran las diferencias significativas (test de Mann-Whitney) de cada grupo respecto al KO (\*= p<0.05; \*\*=p<0.01). El área sombreada en amarillo corresponde al rango de concentración de los animales WT.

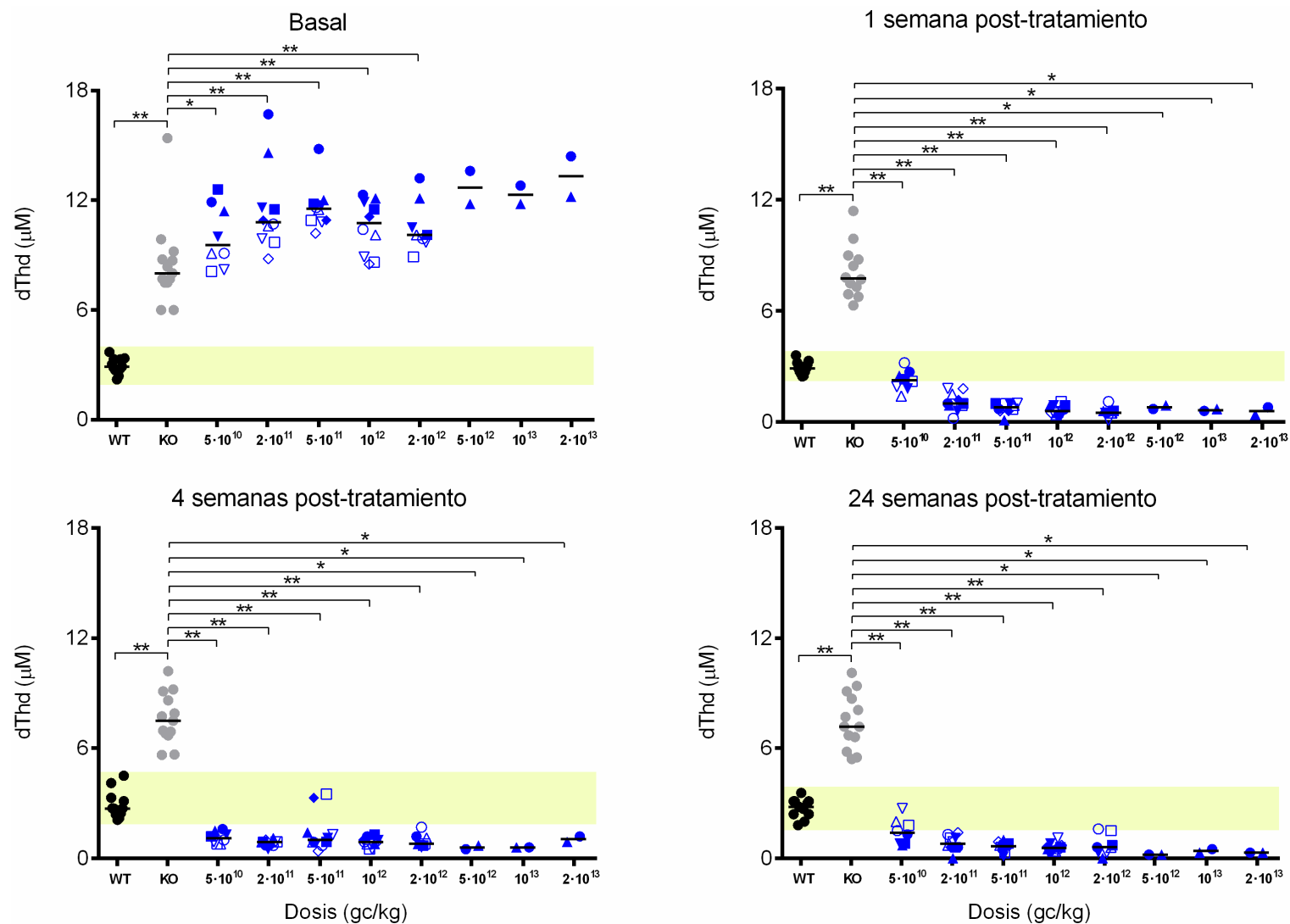
La administración de dosis iguales o superiores a  $2 \cdot 10^{11}$  gc/kg del vector HLP resulta suficiente para mantener la concentración de dThd en plasma por debajo de  $1 \mu\text{M}$  en todos los animales tratados (n=35) durante 24 semanas (Figura 5.9). En este caso no se han testado dosis inferiores a  $2 \cdot 10^{11}$  gc/kg porque el tiempo necesario para reducir la concentración de dThd plasmática en el 100% de los ratones tratados con esta dosis es de 4 semanas. Esto indica que el efecto terapéutico producido por el vector HLP es menor que el producido por el vector TBG, ya que tras la administración de  $2 \cdot 10^{11}$  gc/kg de TBG los animales reducen los niveles de dThd plasmática en una semana. Teniendo en cuenta esto y, a

sabiendas de que la dosis de  $5 \cdot 10^{10}$  gc/kg no resulta efectiva en todos los animales tratados con TBG, asumimos que la administración de dosis inferiores tampoco lograría mantener el efecto terapéutico a largo plazo en caso de tratamiento con HLP.



**Figura 5.9. Vector HLP: Evolución de la concentración de dThd en plasma.** Concentración de dThd en plasma en animales wild-type (WT,  $n=11$ ), knock-out (KO,  $n=13$ ) y animales tratados con el vector HLP a diferentes dosis ( $n=9$  para todas las dosis excepto para  $2 \cdot 10^{12}$ ,  $n=8$ ). Las líneas horizontales representan la mediana. Los asteriscos muestran las diferencias significativas (test de Mann-Whitney) de cada grupo respecto al KO (\*=  $p<0.05$ ; \*\*= $p<0.01$ ). El área sombreada en amarillo corresponde al rango de concentración de los animales WT.

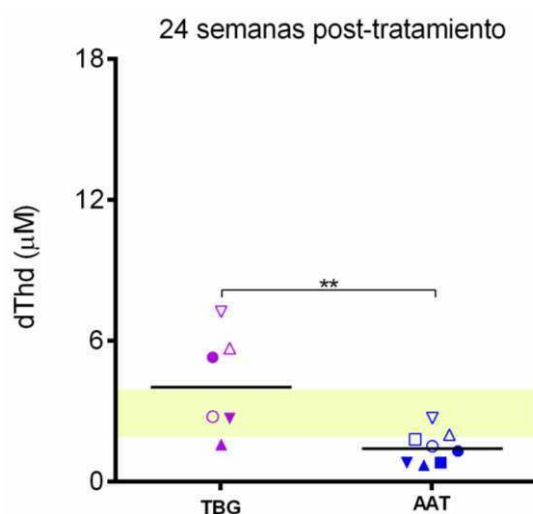
Tal y como puede observarse en las Figuras 5.9 y 5.10, tanto en los animales tratados con el vector HLP como en los tratados con el vector AAT la concentración basal de dThd en plasma es significativamente más elevada que en el grupo KO control. Sin embargo, esto no ocurre en los diferentes grupos de estudio de los vectores TBG o PGK (Figuras 5.7 y 5.8). No obstante, el tratamiento se ha realizado en animales doble KO *Tymp<sup>-/-</sup>Upp1<sup>-/-</sup>* pertenecientes a la misma colonia en todos los casos, por lo que no existen diferencias en cuanto al genotipo o a las condiciones de estabulación. Desconocemos cuál puede ser la causa de este ligero aumento de concentración, pero lo más probable es que se deba a diferencias en la técnica cromatográfica de determinación, ya que el estudio en cuestión se ha realizado de forma secuencial (siendo los vectores HLP y AAT los últimos testados) y el intervalo de tiempo transcurrido entre la determinación de la concentración de los grupos KO no tratados y la de los grupos HLP o AAT es de 4 años.



**Figura 5.10. Vector AAT: Evolución de la concentración de dTThd en plasma.** Concentración de dTThd en plasma en animales wild-type (WT, n=11), knock-out (KO, n=13) y animales tratados con el vector AAT a diferentes dosis (5·10<sup>10</sup> y 2·10<sup>12</sup>, n=8; 2·10<sup>11</sup>, 5·10<sup>11</sup> y 10<sup>12</sup>, n=10; 5·10<sup>12</sup>, 10<sup>13</sup> y 2·10<sup>13</sup>, n=2). Las líneas horizontales representan la mediana. \* = p < 0.05; \*\* = p < 0.01 respecto a grupo KO (test de Mann-Whitney). El área sombreada en amarillo corresponde al rango de concentración de los animales WT.

Los resultados obtenidos con el vector AAT muestran que el uso de éste permite reducir la dosis terapéutica al menos hasta  $5 \cdot 10^{10}$  gc/kg, ya que el 100% de los animales tratados con este vector y dosis reducen la concentración de dThd plasmática hasta valores de WT e inferiores en tan sólo una semana. Además, el efecto terapéutico es estable al menos durante 24 semanas desde el momento de la administración (Figura 5.10).

De acuerdo a lo expuesto, las construcciones más potentes por lo que refiere a la capacidad de normalización de la concentración de dThd en plasma son TBG y AAT. No obstante, la versión optimizada AAT resulta más eficaz y eficiente que el vector inicial TBG y existe una diferencia significativa ( $p=0.0077$ , test de Mann-Whitney) entre la concentración de dThd alcanzada en los animales tratados con ambos vectores a la dosis común más baja testada (mediana AAT=1.4  $\mu$ M; rango AAT=0.7-2.7  $\mu$ M; mediana TBG=4  $\mu$ M; rango TBG=1.6-7.2  $\mu$ M) (Figura 5.11).

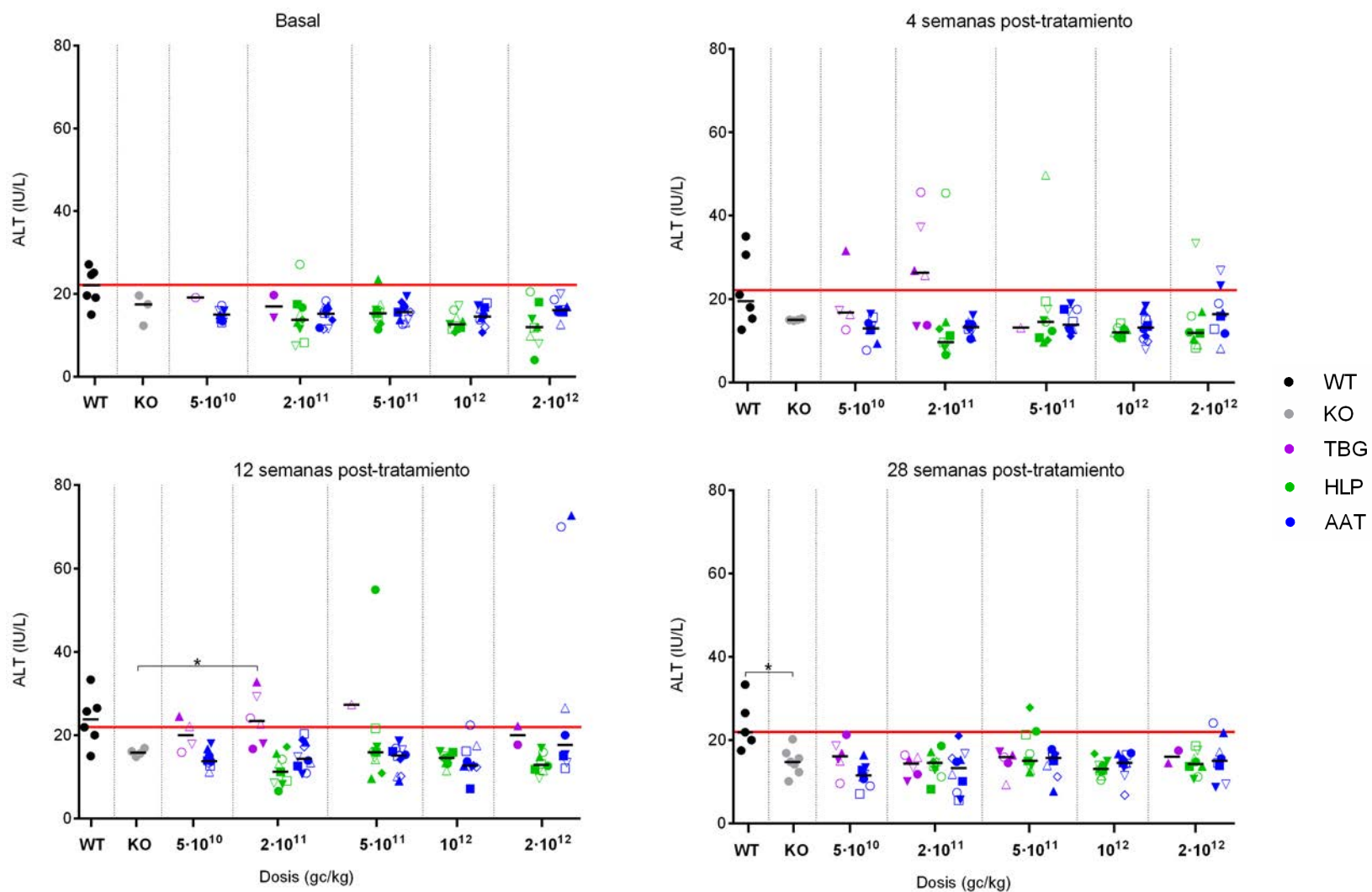


**Figura 5.11. Concentración plasmática de dThd 24 semanas post-tratamiento en animales tratados con  $5 \cdot 10^{10}$  gc/kg de los vectores TBG y AAT.** Las líneas horizontales representan la mediana.  $**=p<0.01$  (test de Mann-Whitney). El área sombreada en amarillo corresponde al rango de concentración de los animales WT.

De forma paralela se ha monitorizado también la evolución de la concentración plasmática de dUrd. Los resultados obtenidos (no mostrados) coinciden con los presentados para la concentración de dThd.

### 5.3.3. Evaluación de toxicidad hepática.

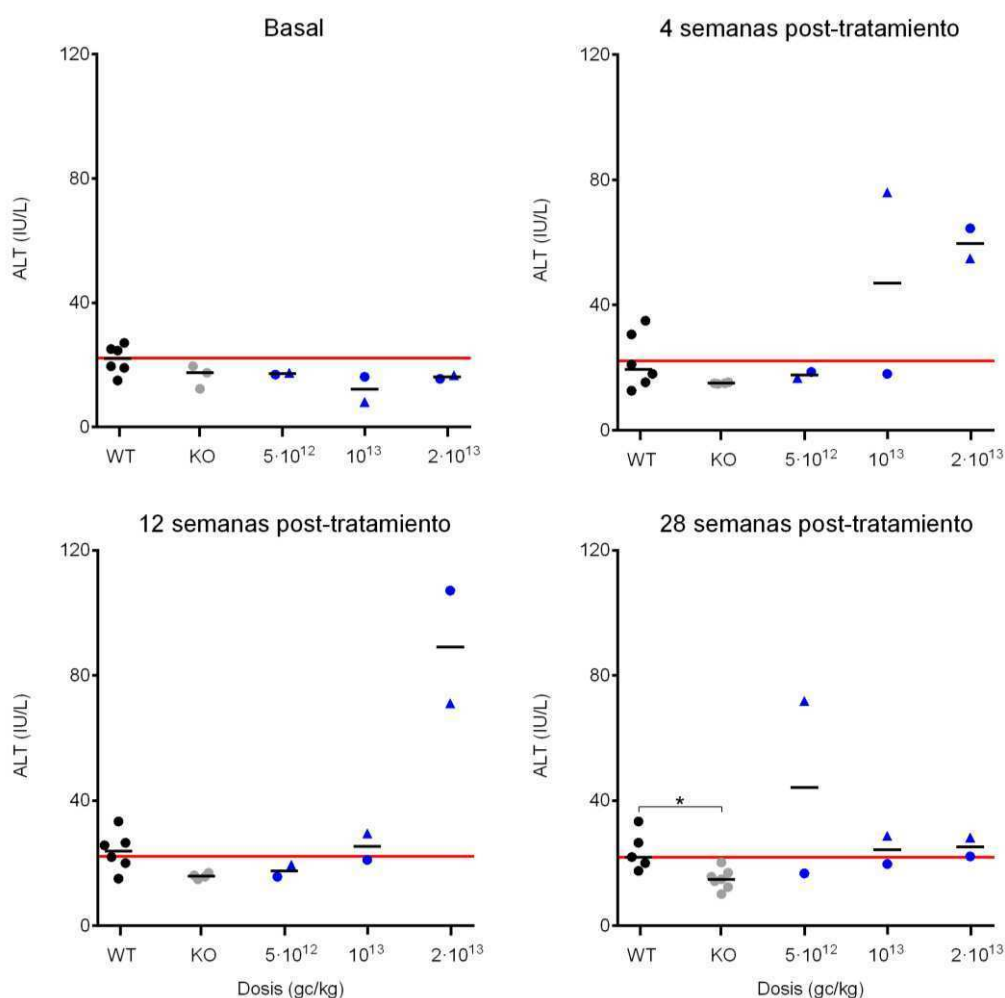
La elevación de la actividad alanina aminotransferasa (ALT) circulante es un marcador de lesión hepatocelular. Con el fin de poder detectar signos de toxicidad hepática asociada al uso de AAV, se ha realizado un seguimiento de la actividad ALT en plasma a lo largo del tratamiento en aquellos animales que han sido inyectados con AAV que contienen promotores específicos de hígado (TBG, HLP y AAT). El estudio de toxicidad no se ha realizado en los ratones tratados con el vector PGK ya que, en este caso, esperábamos un efecto sistémico que supusiera menor expresión del transgén y menor actividad TP en hígado y, por lo tanto, menor compromiso de la función y toxicidad en este tejido.



**Figura 5.12. Seguimiento de actividad ALT en plasma en animales WT, KO, TBG, HLP y AAT.** La línea roja representa el nivel de actividad a partir del cual podemos considerar que existen signos de toxicidad y corresponde a la media de actividad ALT de KO no tratados más dos veces la desviación estándar. Las líneas horizontales en cada dosis representan la mediana. \*= $p < 0.05$  respecto a KO (test de Mann-Whitney).

Tal y como puede observarse en la *Figura 5.12*, los valores de actividad ALT en animales WT son ligeramente superiores a los de los ratones KO no tratados (mediana WT=22.1 UI/L, rango: 12.6-35 UI/L; mediana KO= 17.5 UI/L, rango: 7.9-27.1 UI/L) a pesar de que en ambos casos se trata de ratones con fondo genético C57BL/6J. Tras el tratamiento con AAV de expresión hepática, 7 de un total de 98 animales tratados con una dosis igual o inferior a  $2 \cdot 10^{12}$  gc/kg (7.1%) presentan valores puntuales de actividad ALT superiores a los de los animales WT. De forma más concreta, se observa aumento puntual de actividad ALT en el 10.5% de animales tratados con TBG, el 8.6% de los tratados con HLP y el 4.5% de los pertenecientes al grupo AAT (considerando las dosis comprendidas entre  $5 \cdot 10^{10}$  y  $2 \cdot 10^{12}$  gc/kg).

A dosis mayores a  $2 \cdot 10^{12}$  gc/kg (testadas únicamente en el caso del vector AAT), el 66.7% de los animales presentan niveles de ALT en plasma superiores a los de los ratones WT en algún punto del seguimiento. Además, en el caso del tratamiento con la dosis de  $2 \cdot 10^{13}$  gc/kg, los niveles de ALT se mantienen elevados durante un período de tiempo más largo (*Figura 5.13*).



**Figura 5.13. Seguimiento de actividad ALT en plasma de animales tratados con el vector AAT a dosis altas.** La línea roja representa el nivel de actividad a partir del cual podemos considerar que existen signos de toxicidad y corresponde a la media de actividad ALT de KO no tratados más dos veces la desviación estándar. Las líneas horizontales en cada dosis representan la mediana. \*= $p < 0.05$  respecto a KO (test de Mann-Whitney).

A pesar de la observación de algunos valores posiblemente patogénicos de ALT en los animales tratados, todos excepto un animal tratado con el vector AAT a una dosis de  $5 \cdot 10^{12}$  gc/kg, recuperan los niveles basales de ALT al final del tratamiento.

## 5.4. Estudio de los efectos del transgén *TYMP* 34 semanas después del tratamiento.

### 5.4.1. Número de copias de *TYMP*.

Para poder determinar la eficiencia de transducción y la potencia de los promotores utilizados en cada uno de los diferentes vectores testados, se ha cuantificado el número de copias de transgén por célula en hígado mediante qPCR. Cabe destacar que se han observado diferencias en el número de copias en función del método de extracción de ADN utilizado.

En un primer momento, la extracción de ADN se realizó mediante el uso del kit comercial *QIAMP® DNA Mini Kit (QIAGEN)*. Utilizando este método, se detectó la secuencia del transgén *TYMP* en hígado, pero no en otros tejidos (cerebro, músculo esquelético o intestino delgado). No obstante, dado que tampoco se observó actividad TP en estos tejidos en los animales tratados con los vectores TBG o PGK (*Figuras 5.28a-b, 5.29a-b y 5.30a-b*), pensamos que la falta de detección indicaba la transducción preferente y única del tejido hepático.

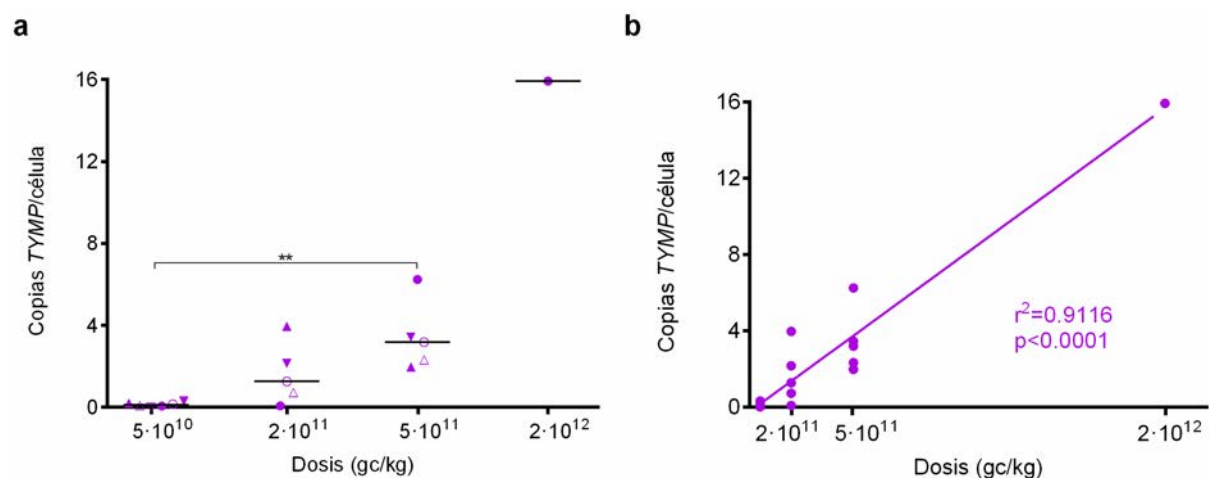
Posteriormente, los resultados de actividad TP obtenidos con el vector HLP y, principalmente, AAT (*Figuras 5.28c-d, 5.29c-d y 5.30c-d*), mostraron que, aunque en menor grado, el uso del serotipo AAV8 a las dosis testadas permitía transducir también estos tejidos. No obstante, tampoco se detectó el transgén en estos casos. En vista de esto, decidimos realizar las extracciones de ADN mediante el método clásico fenol-cloroformo (*apartado 4.1.1.3.3*).

El cambio del protocolo de extracción permitió detectar el transgén en tejidos no hepáticos en algunos de los animales tratados y supuso un aumento en el número de copias de *TYMP* en hígado. Este hecho evidenció la baja eficiencia de extracción de ADN vectorial del kit utilizado. Sin embargo, a pesar de la mejora, el aumento en el número de copias en tejidos no hepáticos se observó en un número muy reducido de animales y no en todos aquellos que presentaban actividad TP.

Tras realizar una búsqueda bibliográfica extensiva se decidió probar un nuevo método de extracción adaptado del método clásico de Hirt, el cual favorece la purificación de moléculas de ADN de bajo peso molecular (*apartado 4.1.1.3.4*). A pesar de que se realizaron varios intentos de optimización de la extracción, éste método no sólo no permitió detectar el transgén en tejidos no hepáticos, sino que disminuyó la eficiencia de recuperación en hígado (en comparación con los resultados obtenidos tras la extracción con fenol-cloroformo). Por este motivo, el método de extracción utilizado se basa en el método clásico de fenol-cloroformo y únicamente se muestran los resultados de número de copias de *TYMP* en hígado.

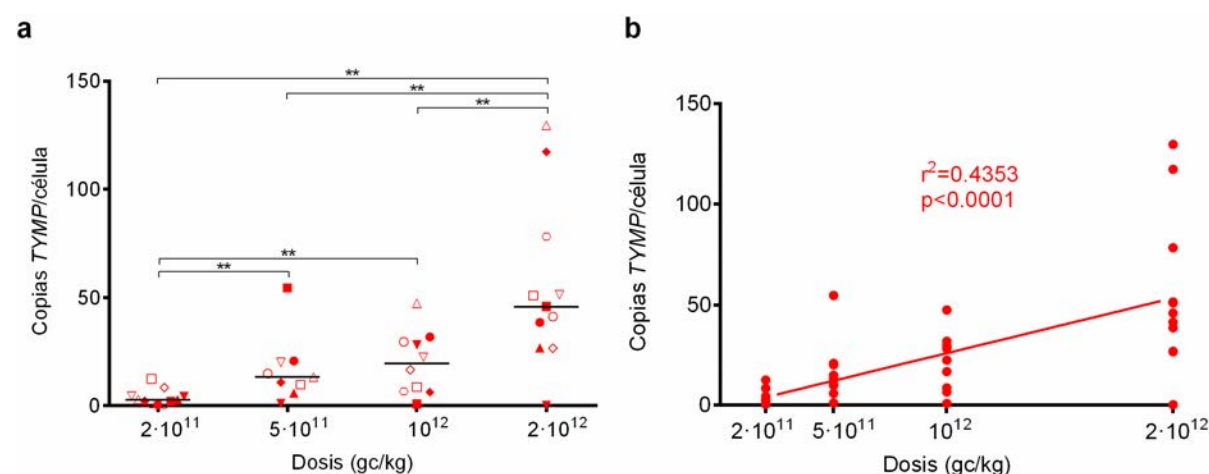


En el caso del vector TBG, el número de copias de transgén por célula determinado 34 semanas después del tratamiento correlaciona claramente con la dosis administrada (*Figura 5.14b*) y el número de copias en aquellos animales que muestran respuesta terapéutica (disminución de la concentración de nucleósidos) oscila entre 0.2 y 15.9 copias/célula (*Figura 5.14a*).



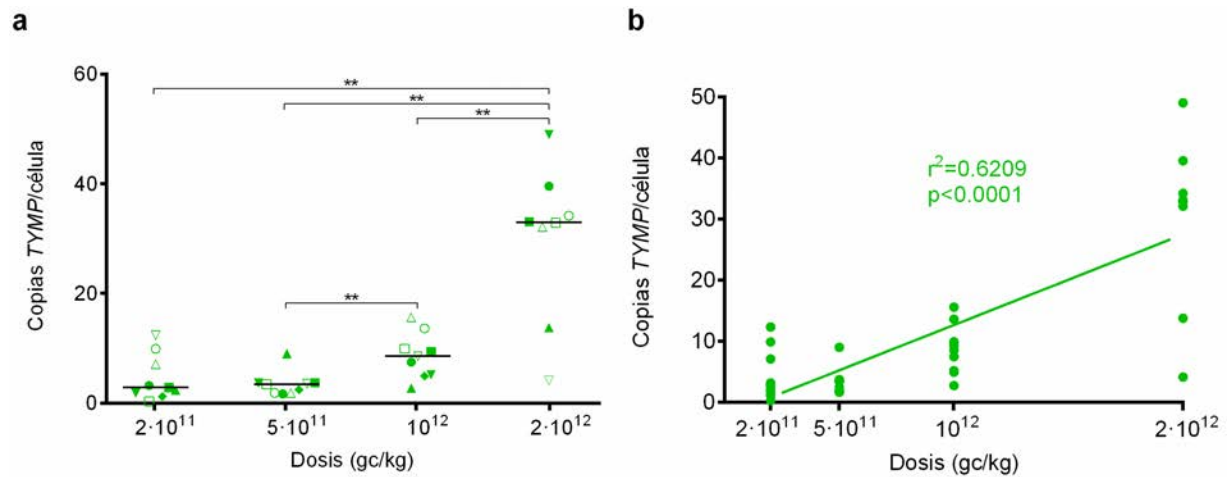
**Figura 5.14. Vector TBG: Relación entre el número de copias de TYMP y la dosis administrada.** a) Número de copias de TYMP por célula en hígado tras 34 semanas de tratamiento. Las barras horizontales representan la mediana. \*\*= $p < 0.01$  (test de Mann-Whitney). b) Correlación (Pearson) entre la dosis administrada y el número de copias de transgén por hepatocito.

Pese a que en todos los casos la cápside utilizada corresponde a la del serotipo AAV8, el vector PGK presenta mayor eficiencia de transducción en hígado a todas las dosis comunes testadas y, tal y como puede observarse en la *Figura 5.15a*, la administración de 2·10<sup>12</sup> gc/kg permite alcanzar valores de hasta 130 copias/célula (55.2 ± 38.9 copias/célula). En este caso, existe también correlación entre la dosis administrada y el número de copias/célula (*Figura 5.15b*). Sin embargo, los resultados obtenidos muestran una mayor dispersión de los datos. Debido a la potencia del promotor PGK, sólo aquellos animales que contienen un mínimo de 2 copias/célula logran sostener la concentración plasmática de dThd dentro del rango WT a largo plazo. Por consiguiente, no se observa reducción de la concentración de nucleósidos en los animales con menos de 2 copias/hepatocito.



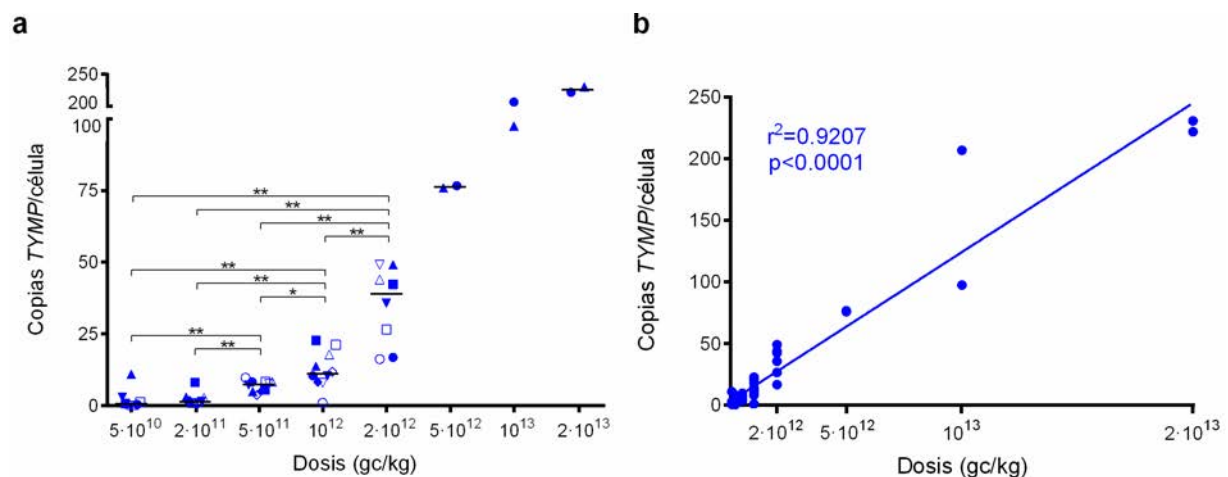
**Figura 5.15. Vector PGK: Relación entre el número de copias de TYMP y la dosis administrada.** a) Número de copias de TYMP por célula en hígado tras 34 semanas de tratamiento. Las barras horizontales representan la mediana. \*\*= $p < 0.01$  (test de Mann-Whitney). b) Correlación (Pearson) entre la dosis administrada y el número de copias de transgén por hepatocito.

La administración del vector HLP provoca también un aumento significativo en el número de copias de vector por célula de forma dependiente de la dosis (excepto para las dosis de  $2 \cdot 10^{11}$  y  $5 \cdot 10^{11}$  gc/kg, *Figura 5.16a*). En este caso, el nivel de transducción es mayor que el del vector TBG pero menor que el del vector de expresión constitutiva y llegan a alcanzarse valores de  $29.9 \pm 14.3$  copias/célula en los animales tratados con la dosis más alta. El número de copias mínimo requerido para sobrepasar el umbral terapéutico es de 1.2 copias/célula (se define como umbral terapéutico al número de copias mínimo a partir del cual se observan valores de concentración de dThd situados en el rango WT).



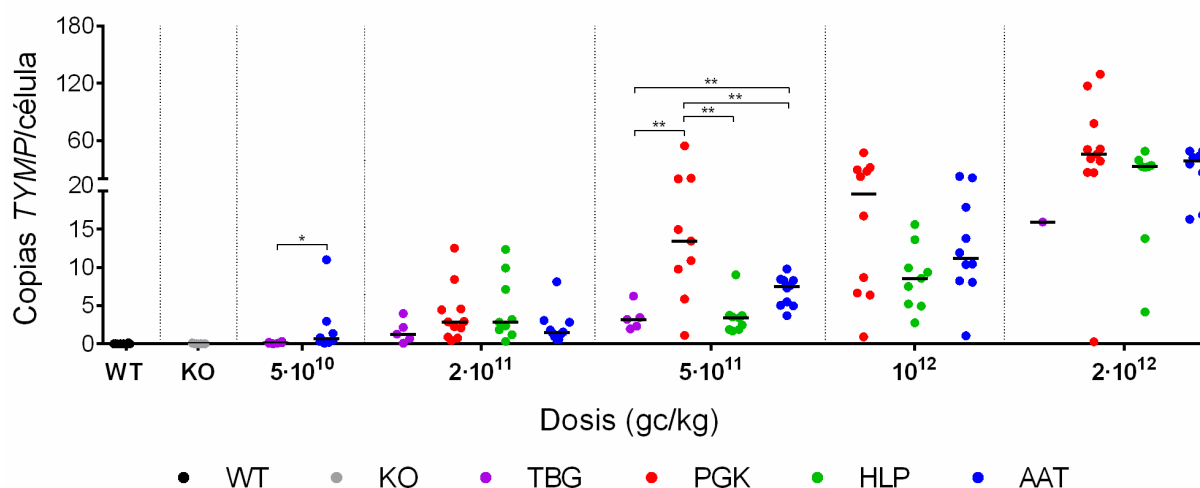
**Figura 5.16. Vector HLP: Relación entre el número de copias de TYMP y la dosis administrada.** a) Número de copias de TYMP por célula en hígado tras 34 semanas de tratamiento. Las barras horizontales representan la mediana. \*\*= $p < 0.01$  (test de Mann-Whitney). b) Correlación (Pearson) entre la dosis administrada y el número de copias de transgén por hepatocito.

Por último, el vector AAT es el que muestra una mayor correlación entre el número de copias y la dosis administrada (*Figura 5.17b*). Además, aun considerando las dosis más altas testadas (hasta  $2 \cdot 10^{13}$  gc/kg), no se observa una saturación de la capacidad de transducción y llegan a alcanzarse valores máximos de hasta 230 copias/célula (*Figura 5.17a*). De forma similar a lo observado para el vector TBG, niveles de transducción del 20% son suficientes para mantener el efecto terapéutico a largo plazo.



**Figura 5.17. Vector AAT: Relación entre el número de copias de TYMP y la dosis administrada.** a) Número de copias de TYMP por célula en hígado tras 34 semanas de tratamiento. Las barras horizontales representan la mediana. \*\*= $p < 0.01$  (test de Mann-Whitney). Existen diferencias significativas entre las dosis  $5 \cdot 10^{12}$ ,  $10^{13}$  y  $2 \cdot 10^{13}$  gc/kg y el resto de dosis testadas ( $p < 0.05$ , test de Mann-Whitney). Nota: el eje de ordenadas está dividido en dos segmentos (0-100 y 200-250). b) Correlación (Pearson) entre la dosis administrada y el número de copias de transgén por hepatocito.

A continuación, se muestran los resultados conjuntos para todos los vectores testados.



**Figura 5.18. Número de copias de TYMP por célula en hígado 34 semanas después del tratamiento a las diferentes dosis comunes testadas.** Las barras horizontales representan la mediana. \*= $p < 0.05$  y \*\*= $p < 0.01$  (test de Mann-Whitney). Nota: el eje de ordenadas está dividido en dos segmentos (0-20 y 20-180).

Tal y como puede observarse en la *Figura 5.18*, los niveles de transducción más elevados se obtienen con el vector PGK. No obstante, sólo existen diferencias significativas entre el número de copias/célula determinadas para ésta y el resto de construcciones cuando se administra una dosis de  $5 \cdot 10^{11}$  gc/kg. Al margen de esto, y a pesar de no haber significancia estadística, a la dosis común más baja testada ( $2 \cdot 10^{11}$  gc/kg), la transducción con los vectores TBG y AAT es menor a la de los vectores PGK y HLP (mediana TBG=1.3; mediana AAT=1.5; mediana PGK=2.9; mediana HLP=2.9 copias/célula). Sin embargo, esta tendencia deja de observarse a dosis más altas. Al comparar los vectores de mayor efecto terapéutico, TBG y AAT, vemos que la administración de  $5 \cdot 10^{10}$  gc/kg supone una mayor eficiencia de transducción en el vector AAT ( $2.1 \pm 3.7$  copias/célula) que en el vector TBG ( $0.1 \pm 0.1$  copias/célula). Por último, los animales KO y WT no tratados presentan valores nulos de copias de TYMP/célula, lo que indica la especificidad de la sonda utilizada por la secuencia del gen TYMP humano.

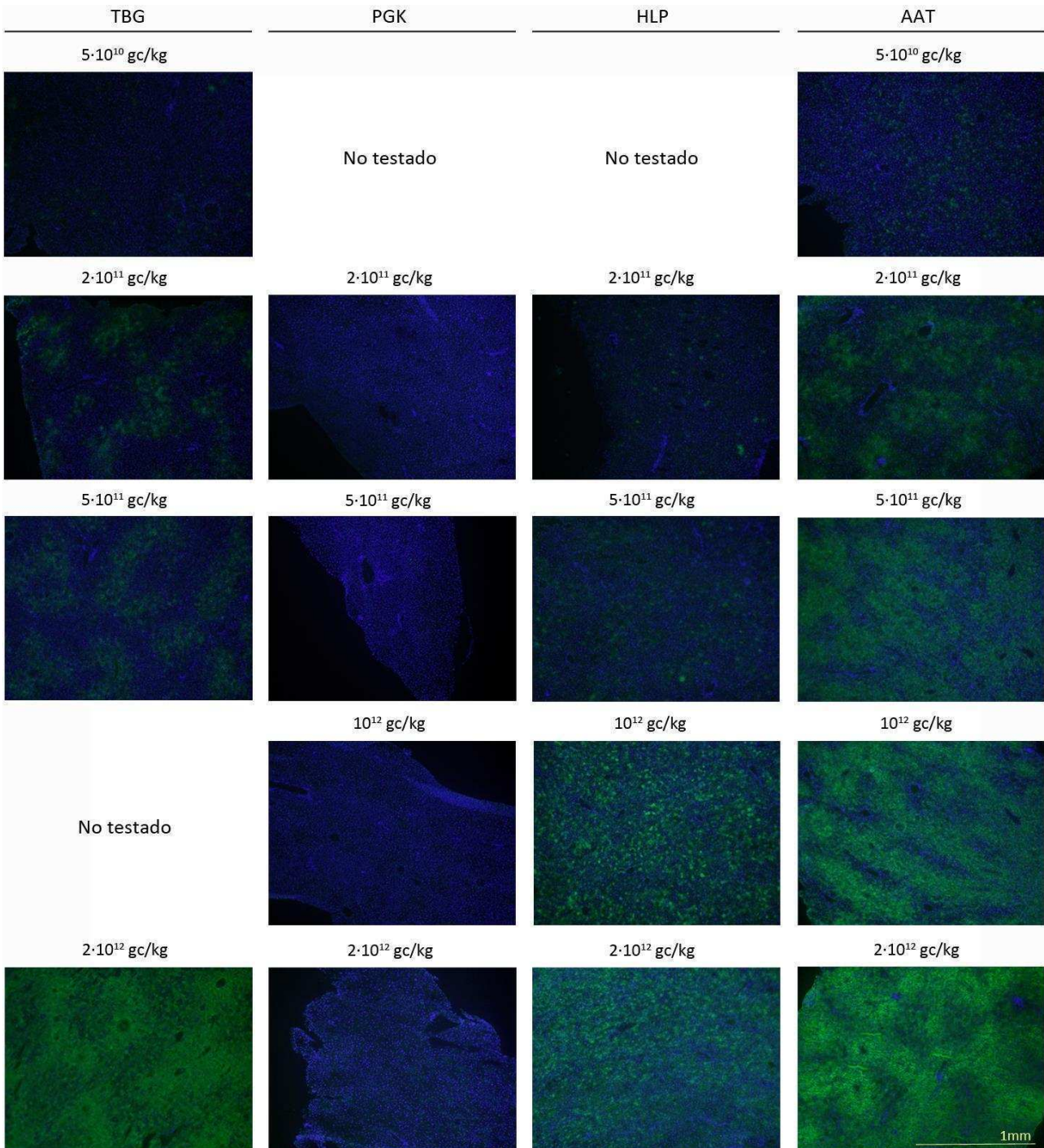
#### 5.4.2. Inmunodetección, actividad y cuantificación de la enzima TP.

##### 5.4.2.1. Inmunohistoquímica de hígado.

La inmunohistoquímica realizada en hígado confirma la presencia de la proteína TP en este tejido 34 semanas después de la administración vírica. Exceptuando los animales tratados con el vector PGK, puede observarse que el número de hepatocitos que expresan la proteína terapéutica concuerda con el número de copias y la dosis administrada. Tal y como era de esperar, la enzima TP presenta una localización citosólica en todos los casos. Por lo que refiere a la distribución, se observa un parcheado que revela una mayor transducción en aquellos hepatocitos situados alrededor de los vasos sanguíneos (*Figuras 5.19 y 5.20*).

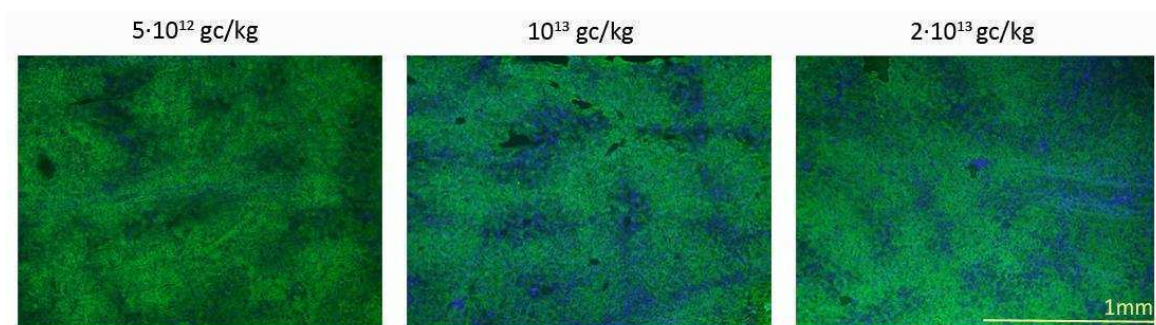
Si comparamos la expresión de TP en animales tratados con dosis equivalentes de los diferentes vectores, podemos observar diferencias que concuerdan con los resultados bioquímicos obtenidos. En el caso del vector PGK, no se ha podido detectar la proteína TP en ninguno de los animales tratados (*Figura 5.19*) ya que, debido a la baja potencia del promotor constitutivo en el tejido hepático, la expresión de proteína en una única célula no es suficiente como para que esta pueda ser detectada ni

siquiera a las dosis más altas. Por lo que refiere al resto de vectores, los resultados muestran, una vez más, que las dos construcciones más potentes son las que contienen los promotores TBG y AAT. Centrándonos en estos dos grupos, podemos observar que el uso del promotor AAT resulta en un nivel de expresión mayor que el del promotor TBG, sobre todo a las dosis más bajas (Figura 5.19).

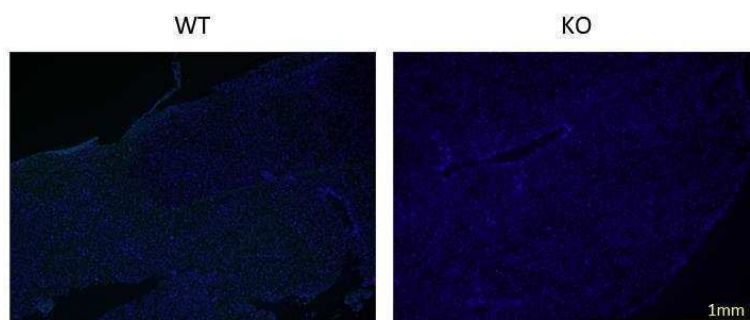


**Figura 5.19. Inmunohistoquímica en hígado 34 semanas después del tratamiento.** Se muestra un animal representativo de cada dosis (5·10<sup>10</sup>, 2·10<sup>11</sup>, 5·10<sup>11</sup>, 10<sup>12</sup> y 2·10<sup>12</sup> gc/kg) para cada vector (TBG, PGK, HLP y AAT). En verde se muestra la enzima timidina fosforilasa y en azul los núcleos celulares.

Tal y como puede observarse en la *Figura 5.20*, el uso de dosis superiores a  $2 \cdot 10^{12}$  gc/kg del vector AAT resulta en la transducción de la mayor parte del tejido diana. Aunque el nivel de expresión continúa siendo más elevado en los hepatocitos localizados alrededor de los vasos, el aumento de dosis comporta una distribución cada vez más homogénea de la proteína TP.



*Figura 5.20. Inmunohistoquímica en hígado de animales tratados con dosis altas del vector AAT 34 semanas después del tratamiento. Se muestra un animal representativo de las dosis  $5 \cdot 10^{12}$ ,  $10^{13}$  y  $2 \cdot 10^{13}$  gc/kg del vector AAT. En verde se muestra la enzima timidina fosforilasa y en azul los núcleos celulares.*



*Figura 5.21. Inmunohistoquímica en hígado de un animal WT y un animal KO no tratado. Se muestra un animal representativo en cada caso. En verde se muestra la enzima timidina fosforilasa y en azul los núcleos celulares.*

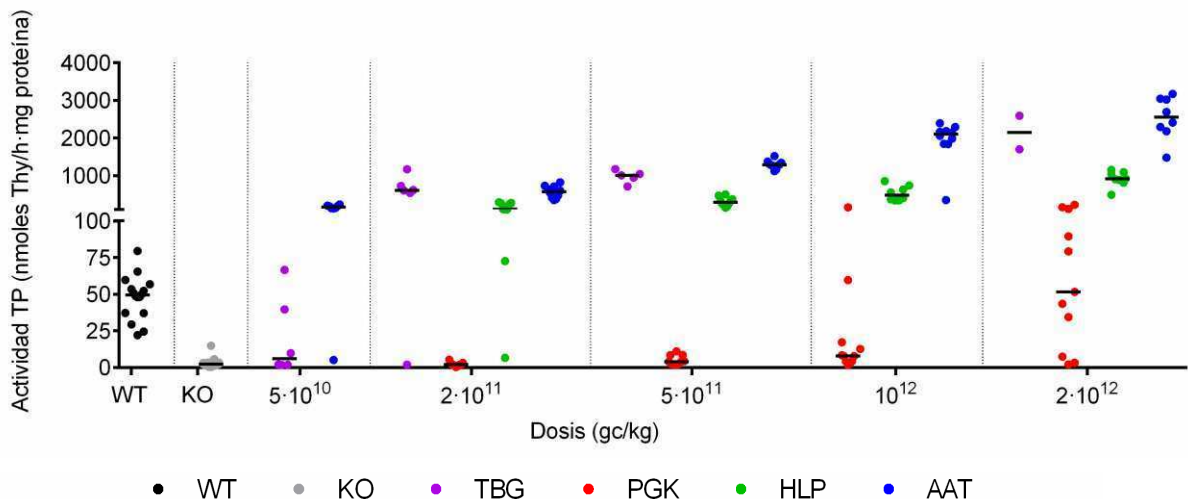
La *Figura 5.21* manifiesta la especificidad del anticuerpo utilizado frente a la enzima TP humana.

#### 5.4.2.2. Actividad TP.

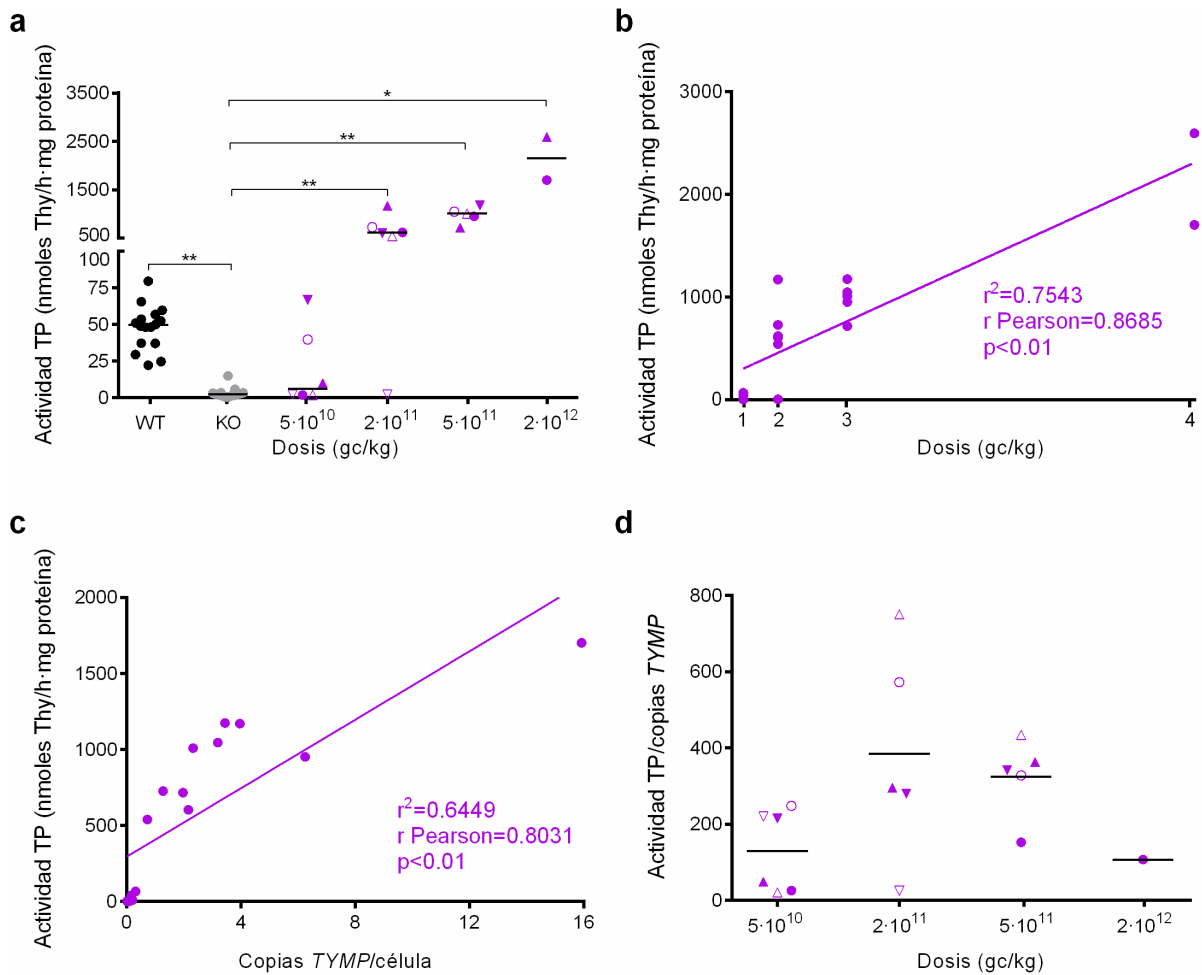
Para determinar la eficiencia y potencia de cada uno de los vectores y promotores utilizados se ha estudiado la actividad TP en hígado (principal órgano diana del AAV8 tras administración intravenosa periférica) y otros tejidos especialmente afectados en pacientes de MNGIE (cerebro, músculo esquelético e intestino delgado) tras 34 semanas de tratamiento.

##### - Actividad TP en hígado.

Los animales KO *Tymp*<sup>-/-</sup> *Upp1*<sup>-/-</sup> mantienen únicamente el 6% de la actividad TP en hígado (media KO=3 nmoles Thy/h-mg proteína; media WT=48 nmoles Thy/h-mg proteína). El tratamiento con los diferentes vectores AAV8 permite un aumento de la actividad TP en el tejido hepático de hasta 60 veces (en comparación con el grupo WT). Tal y como puede observarse en la *Figura 5.22*, los niveles de actividad TP alcanzados con los vectores TBG, HLP y AAT tras la administración de una dosis de  $2 \cdot 10^{12}$  gc/kg son entre 13 y 34 veces superiores a los obtenidos con el vector PGK.

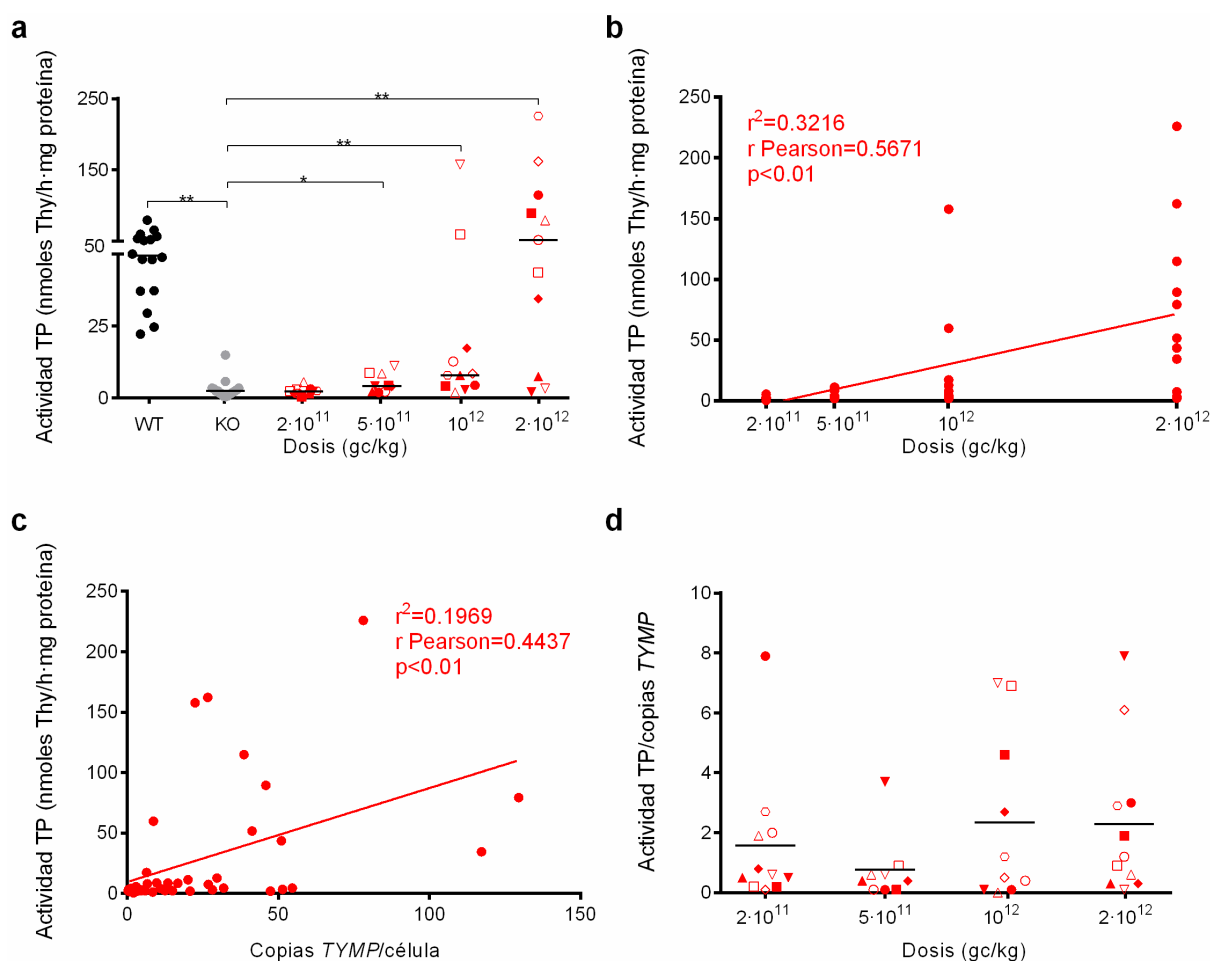


**Figura 5.22. Actividad TP en hígado 34 semanas después del tratamiento.** WT, n=16; KO, n=17; TBG, n=2-6; PGK, n=9-11; HLP y AAT, n=8-10. Las líneas horizontales representan la mediana. Únicamente se representan las dosis comunes testadas. Nota: el eje de ordenadas está dividido en dos segmentos (0-100 y 100-4000).



**Figura 5.23. Vector TBG: Resultados referentes a la actividad TP en hígado.** a) Actividad TP en hígado. Las barras horizontales representan la mediana. \*= $p < 0.05$  y \*\*= $p < 0.01$  respecto al grupo KO (test de Mann-Whitney). Nota: el eje de ordenadas está dividido en dos segmentos (0-100 y 500-3500). b) Correlación (Pearson) dosis-actividad TP. Dosis (gc/kg): 1= $5 \cdot 10^{10}$ , 2= $2 \cdot 10^{11}$ , 3= $5 \cdot 10^{11}$  y 4= $2 \cdot 10^{12}$ . c) Correlación (Pearson) actividad TP-número de copias TYMP. d) Potencia del vector (actividad TP/copia de transgén). Las barras horizontales muestran la media.

En el caso particular del tratamiento con el vector TBG, la actividad TP tras administrar una dosis de  $2 \cdot 10^{12}$  gc/kg es 45 veces superior a la actividad WT ( $2148 \pm 632$  nmoles Thy/h-mg proteína). A las dosis testadas, sólo 5 de los 19 animales tratados (26.3%) no logran restituir los valores enzimáticos de actividad TP. De entre estos, 4 pertenecen al grupo tratado con la dosis más baja ( $5 \cdot 10^{10}$  gc/kg) y uno al grupo tratado con  $2 \cdot 10^{11}$  gc/kg (Figura 5.23a). La actividad TP correlaciona claramente con la dosis administrada y con el número de copias de transgén en hígado ( $p < 0.01$ ) (Figuras 5.23b y 5.23c). La actividad aportada por cada copia de transgén nos da una idea de la potencia del vector utilizado. En aquellos animales en los que se observa reducción de la concentración de dThd, este valor oscila entre 107 y 750 nmoles Thy/h-mg proteína-copia (media 318 nmoles Thy/h-mg proteína-copia) (Figura 5.23d). En animales con número de copias por célula  $>6$ , se observa disminución en la potencia del vector. Los valores de actividad por copia más elevados se obtienen en aquellos animales con alrededor de 1 copia de transgén por célula.

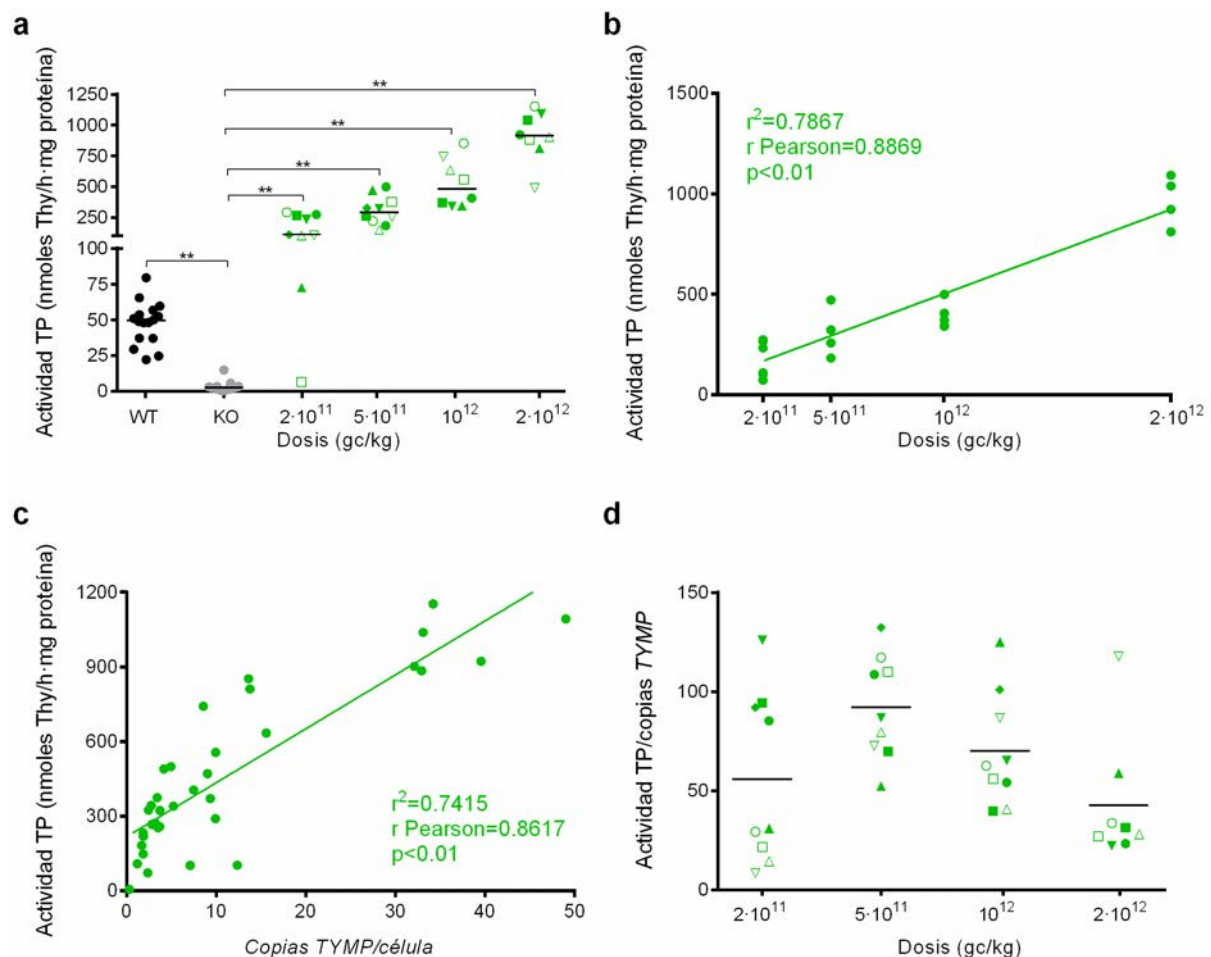


**Figura 5.24. Vector PGK: Resultados referentes a la actividad TP en hígado.** a) Actividad TP en hígado. Las barras horizontales representan la mediana.  $*$ = $p < 0.05$  y  $**$ = $p < 0.01$  respecto al grupo KO (test de Mann-Whitney). Nota: el eje de ordenadas está dividido en dos segmentos (0-50 y 50-250). b) Correlación (Pearson) dosis-actividad TP. c) Correlación (Pearson) actividad TP-número de copias TYMP. d) Potencia del vector (actividad TP/copia de transgén). Las barras horizontales muestran la media.

La máxima actividad TP alcanzada en hígado 34 semanas después de la administración de  $2 \cdot 10^{12}$  gc/kg con el vector PGK es de 226 nmoles Thy/h-mg proteína, 4.7 veces superior a la actividad en animales WT (Figura 5.24a). En este caso, únicamente 10 de un total de 42 animales tratados con las diferentes dosis (23.8%) logran alcanzar valores de actividad de WT. Sin embargo, tal y como puede observarse en la Figura 5.8, el 100% de los animales tratados con  $5 \cdot 10^{11}$  gc/kg reducen la concentración de dThd

en plasma. Aunque se observa correlación entre dosis y actividad TP en hígado, la dispersión de los datos es mucho mayor que en cualquiera de los tratamientos basados en el uso de promotores específicos ( $r=0.5671$ ) (Figura 5.24b). También se observa correlación entre la actividad TP y el número de copias de transgén en el tejido hepático ( $p<0.01$ ) (Figura 5.24c). Por lo que refiere a la actividad TP por copia, ésta se sitúa en torno a 2 nmoles Thy/h·mg proteína·copia. Esto refleja la baja potencia del promotor constitutivo en hígado en comparación a los promotores específicos de tejido (Figura 5.24d).

En el caso del tratamiento con el vector HLP, la media de actividad TP alcanzada con la máxima dosis testada es de 972 nmoles Thy/h·mg proteína (20.4 veces superior a la actividad WT). A las dosis administradas, el 97% de los animales logran valores de actividad iguales o superiores a los de los animales WT (rango=73-1153 nmoles Thy/h·mg proteína, Figura 5.25a). Al igual que con el vector TBG, la actividad TP en hígado correlaciona positivamente con la dosis administrada y con el número de copias de transgén en hígado (Figuras 5.25b y 5.25c). Por lo que refiere a la potencia del promotor utilizado (Figura 5.25d), ésta se comprende entre 8 y 125 nmoles Thy/h·mg proteína·copia (media=66 nmoles Thy/h·mg proteína·copia), lo que representa un 20% de la potencia del vector TBG. La máxima eficiencia se da en aquellos animales que presentan entre 1 y 5 copias por célula (media=101 nmoles Thy/h·mg proteína·copia).

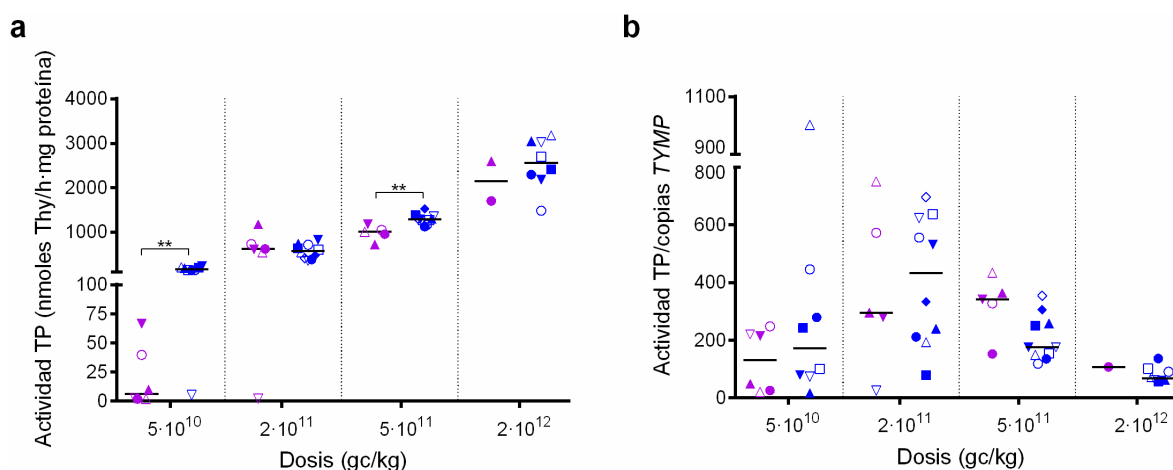


**Figura 5.25. Vector HLP: Resultados referentes a la actividad TP en hígado.** a) Actividad TP en hígado. Las barras horizontales representan la mediana.  $*=p<0.05$  y  $**=p<0.01$  respecto al grupo KO (test de Mann-Whitney). Nota: el eje de ordenadas está dividido en dos segmentos (0-100 y 100-1250). b) Correlación (Pearson) dosis-actividad TP. c) Correlación (Pearson) actividad TP-número de copias TYMP. d) Potencia del vector (actividad TP/copia de transgén). Las barras horizontales muestran la media.

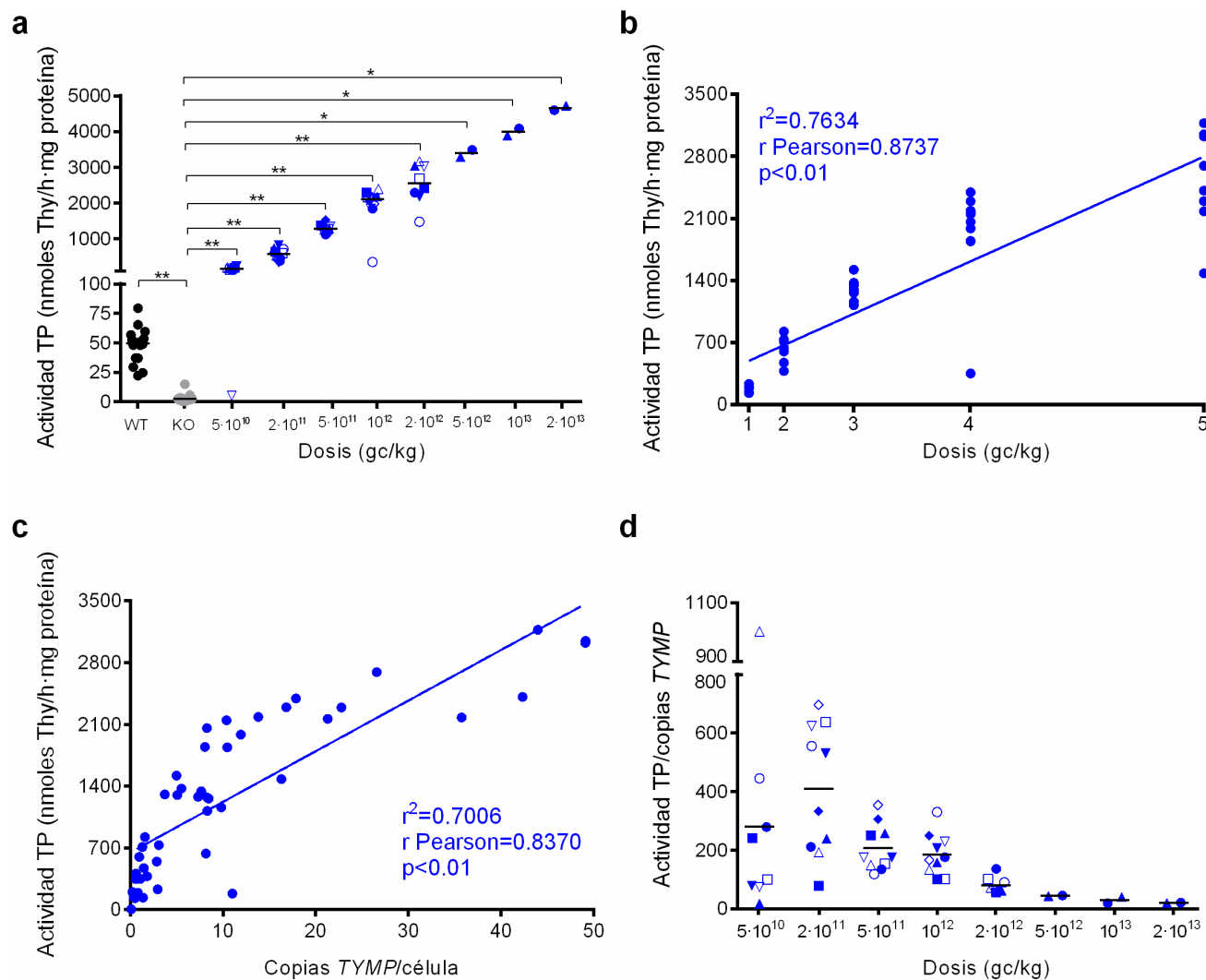


Exceptuando la dosis de  $5 \cdot 10^{10}$  gc/kg, los resultados obtenidos tras la administración del vector AAT son bastante semejantes a los observados con el vector TBG. A la máxima dosis común administrada,  $2 \cdot 10^{12}$  gc/kg, la actividad TP alcanzada con la construcción AAT es de  $2538 \pm 566$  nmoles Thy/h-mg proteína (53 veces superior a la de los animales WT). Además, de un total de 52 animales tratados con las diferentes dosis, sólo uno (tratado con la dosis más baja) no alcanza valores de actividad WT en hígado (Figura 5.26a). No obstante, el animal en cuestión presenta disminución de la concentración de nucleósidos (Figura 5.34). Igual que ocurre con el resto de vectores de expresión específica de hígado, la actividad TP correlaciona con la dosis administrada y con el número de copias de transgén en hígado (Figuras 5.26b y 5.26c). Por último, teniendo en cuenta las dosis comunes utilizadas con el resto de vectores, la potencia del vector AAT se comprende entre 57 y 1003 nmoles Thy/h-mg proteína·copia (media = 237 nmoles Thy/h-mg proteína·copia). En este caso, la eficiencia máxima se da en animales que presentan entre 0.2 y 1.5 copias por célula (rango = 446-1003 nmoles Thy/h-mg proteína·copia, media = 603 nmoles Thy/h-mg proteína·copia (n=8)), lo cual nos indica que el promotor AAT es más eficiente que el resto de promotores utilizados, especialmente a dosis bajas (Figura 5.26d).

De acuerdo con lo observado en cuanto a la capacidad de reducción de la concentración de nucleósidos y a la expresión de TP mediante inmunohistoquímica de hígado, los vectores que dan lugar a valores de actividad TP hepáticos más elevados son los vectores TBG y AAT. No obstante, a las dosis de  $5 \cdot 10^{10}$  y  $5 \cdot 10^{11}$  gc/kg, la actividad TP en hígado tras el tratamiento con el vector AAT es significativamente superior a la del vector TBG ( $p < 0.01$ , test de Mann-Whitney) (Figura 5.27a). Sin embargo, pese a que la potencia del vector AAT es ligeramente superior a las dosis de  $5 \cdot 10^{10}$  y  $2 \cdot 10^{11}$  gc/kg, no existen diferencias significativas entre grupos. Por el contrario, y pese a que tampoco existen diferencias significativas, a las dosis más altas el vector TBG resulta más eficiente en cuanto a la actividad TP producida por número de copias de TYMP (Figura 5.27b).



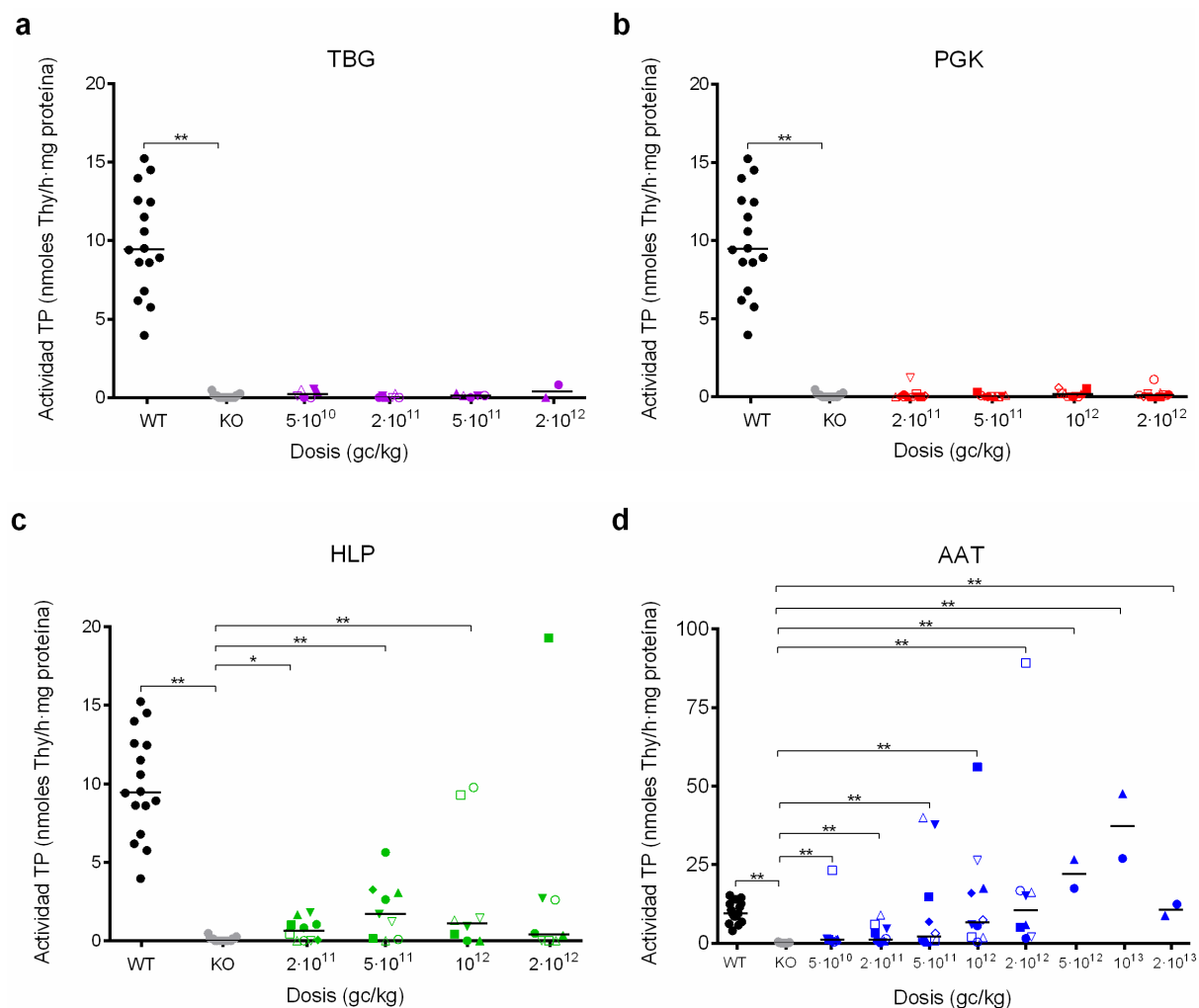
**Figura 5.27. Comparación de actividad TP en hígado y potencia del promotor entre los vectores TBG (en morado) y AAT (en azul).** a) Actividad TP en hígado. Las barras horizontales representan la mediana. \*\*= $p < 0.01$ , test de Mann-Whitney. Nota: el eje de ordenadas está dividido en dos segmentos (0-100 y 100-4000). b) Comparación de la potencia de los vectores TBG y AAT. Las barras horizontales representan la mediana. Nota: el eje de ordenadas está dividido en dos segmentos (0-800 y 900-1100).



**Figura 5.26. Vector AAT: Resultados referentes a la actividad TP en hígado.** a) Actividad TP en hígado. Las barras horizontales representan la mediana. \*= $p<0.05$  y \*\*= $p<0.01$  respecto al grupo KO (test de Mann-Whitney). Nota: el eje de ordenadas está dividido en dos segmentos (0-100 y 100-5000). b) Correlación (Pearson) dosis-actividad TP. Dosis (gc/kg): 1=5·10<sup>10</sup>, 2=2·10<sup>11</sup>, 3=5·10<sup>11</sup>, 4=10<sup>12</sup> y 5=2·10<sup>12</sup>. c) Correlación (Pearson) actividad TP-número de copias TYMP. d) Potencia del vector (actividad TP/copia de transgén). Las barras horizontales muestran la media. Nota: el eje de ordenadas está dividido en dos segmentos (0-800 y 900-1100).

- Actividad TP en cerebro.

La actividad TP media en cerebro de ratones WT es de 10 nmoles Thy/h·mg proteína (rango=4-15.2 nmoles Thy/h·mg proteína, n=16). Sin embargo, los animales doble KO *Tymp*<sup>-/-</sup>*Upp1*<sup>-/-</sup> no presentan actividad TP residual en cerebro (n=17) (Figura 5.28).



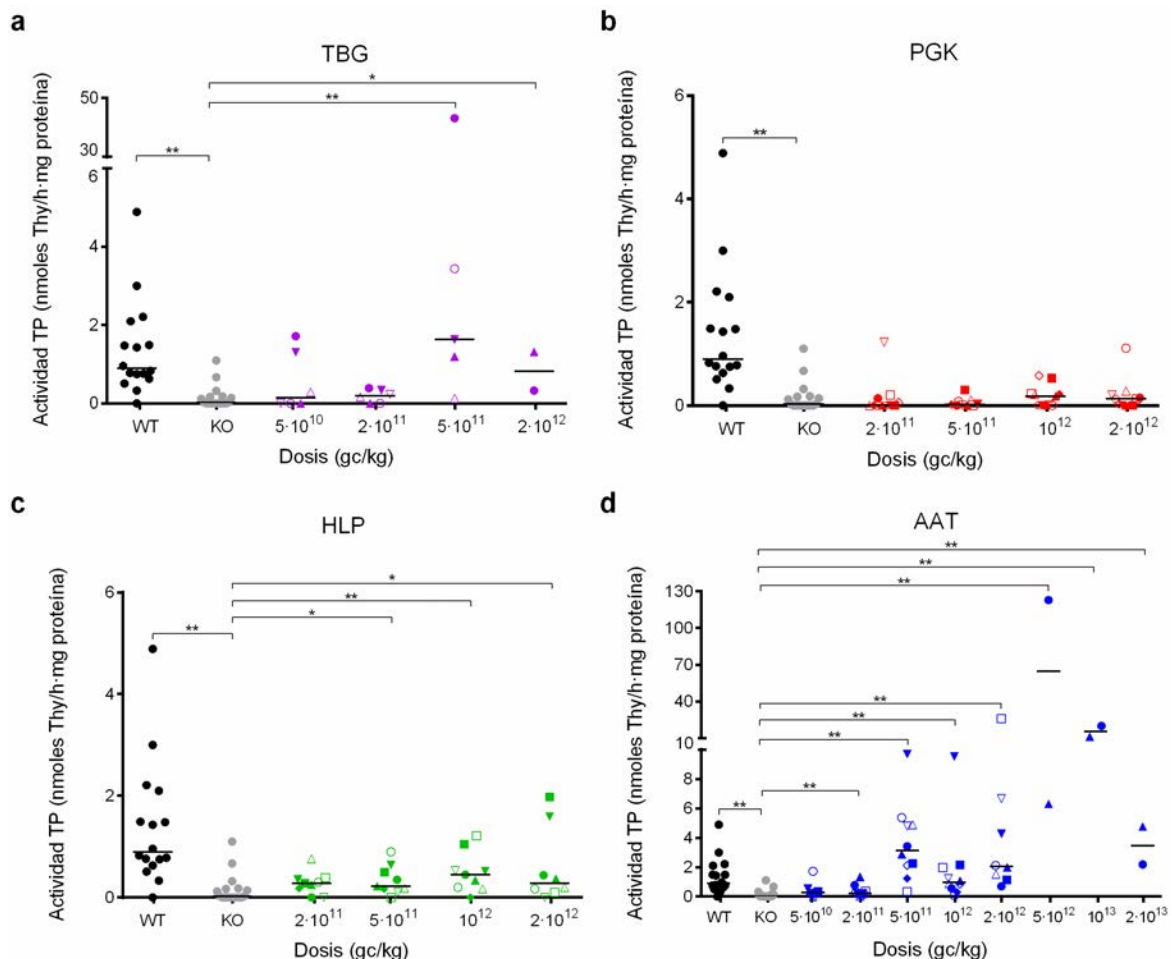
**Figura 5.28. Actividad TP en cerebro 34 semanas post-tratamiento.** Para todos los paneles las barras horizontales representan la mediana, \*= $p < 0.05$  y \*\*= $p < 0.01$  respecto a KO (test de Mann-Whitney). a) Actividad TP en cerebro en animales tratados con el vector TBG. b) Actividad TP en cerebro en animales tratados con el vector PGK. c) Actividad TP en cerebro en animales tratados con el vector HLP. d) Actividad TP en cerebro en animales tratados con el vector AAT.

A diferencia de lo observado en hígado, el tratamiento de animales KO con los vectores TBG y PGK no produce aumento de actividad TP en cerebro a ninguna de las dosis testadas (Figuras 5.28a-b). Contrariamente, el tratamiento con los vectores basados en el uso de promotores derivados del promotor de la alfa-1-antitripsina humana produce un aumento de la actividad TP cerebral. Más concretamente, en el caso del vector HLP, 4 de los 35 animales tratados (11.4%) presentan valores de actividad iguales o superiores a los de los animales WT (rango=6-19 nmoles Thy/h·mg proteína, media =11 nmoles Thy/h·mg proteína) (Figura 5.28c). En el caso del tratamiento con el vector AAT el porcentaje asciende al 50% y los niveles de actividad alcanzados son de hasta 6 veces los de los animales WT en algún caso (rango=5-89 nmoles Thy/h·mg proteína, media = 21 nmoles Thy/h·mg proteína, n=26) (Figura 5.28d). Además, existe correlación positiva entre dosis y actividad TP (para los grupos tratados con dosis de entre 5·10<sup>10</sup> y 2·10<sup>12</sup> gc/kg, r Pearson=0.3371, p<0.05).

- Actividad TP en músculo esquelético.

El músculo esquelético es uno de los tejidos de más baja actividad TP. De hecho, a pesar de que existen diferencias significativas entre la actividad TP en animales WT y KO, se observa solapamiento entre ambos grupos (rango WT=0-5 nmoles Thy/h·mg proteína, media WT=1.4 nmoles Thy/h·mg proteína (n=16); rango KO=0-1.1 nmoles Thy/h·mg proteína, media KO=0.2 nmoles Thy/h·mg proteína (n=17)). Por lo que refiere al efecto del tratamiento con AAV, puede observarse aumento de la actividad TP hasta niveles de WT y superiores en ciertos animales. No obstante, los valores observados son despreciables en la mayoría de los casos y no se observa correlación entre la dosis administrada y la actividad TP en músculo en ninguno de los vectores testados (Figura 5.29).

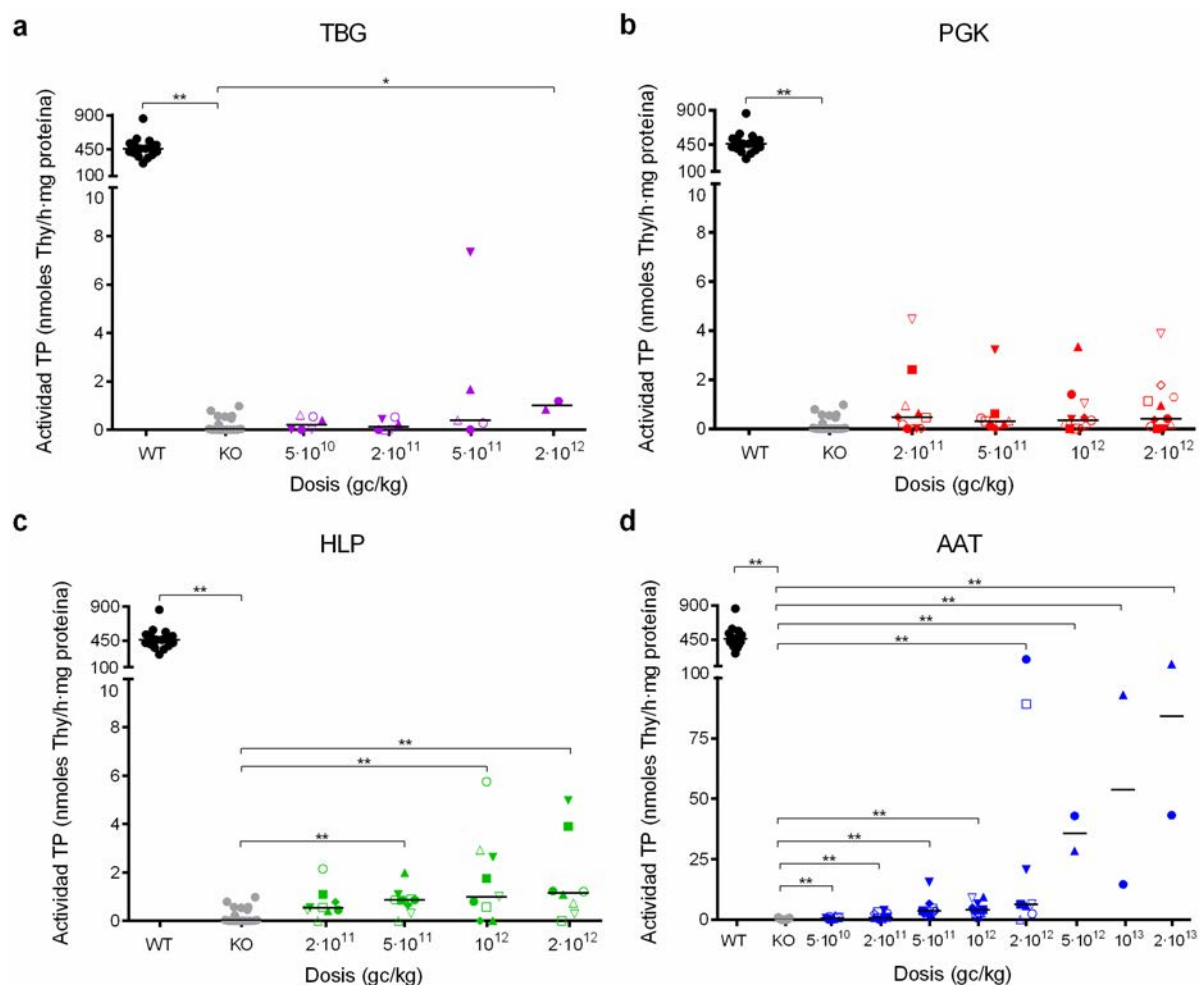
En el grupo de animales tratados con el vector TBG, 7 de un total de 19 ratones (36.8%) presentan valores de actividad TP superiores a 1.1 nmoles Thy/h·mg proteína. Sin embargo, exceptuando un animal que presenta un valor anormalmente elevado (perteneciente al grupo de  $5 \cdot 10^{11}$  gc/kg), el promedio de actividad es de 1.8 nmoles Thy/h·mg proteína (n=6), muy similar al de los ratones WT (Figura 5.29a). Por el contrario, la administración con el vector PGK, no produce aumento de la actividad TP en músculo en ninguno de los animales tratados (Figura 5.29b).



**Figura 5.29. Actividad TP en músculo esquelético (gastrocnemius) 34 semanas post-tratamiento.** Para todos los paneles las líneas horizontales representan la mediana, \*= $p < 0.05$  y \*\*= $p < 0.01$  respecto al grupo KO (test de Mann-Whitney). a) Actividad TP en músculo de animales tratados con el vector TBG. Nota: el eje de ordenadas está dividido en dos segmentos (0-6 y 30-50). b) Actividad TP en músculo de animales tratados con el vector PGK. c) Actividad TP en músculo de animales tratados con el vector HLP. d) Actividad TP en músculo de animales tratados con el vector AAT. Nota: el eje de ordenadas está dividido en dos segmentos (0-10 y 10-130).

En el caso del vector HLP, sólo 3 de los 35 animales de estudio (8.6%) presentan valores superiores a 1.1 nmoles Thy/h·mg proteína (media=1.6 nmoles Thy/h·mg proteína) (Figura 5.29c). El tratamiento con el vector AAT produce aumento de actividad TP en músculo esquelético en 27 de los 52 ratones (52%). De entre estos 27, tres superan los 20 nmoles Thy/h·mg proteína. Sin considerar estos tres casos y aquellos animales pertenecientes a los grupos tratados con las dosis más altas ( $5 \cdot 10^{12}$ ,  $10^{13}$  y  $2 \cdot 10^{13}$  gc/kg), la media de actividad TP es de 3.6 nmoles Thy/h·mg proteína (n=20), lo que supone un incremento de 2.6 veces respecto a la actividad TP en músculo de ratones WT (Figura 5.29d). No obstante, estos valores de actividad siguen siendo prácticamente despreciables en comparación a los valores típicos de actividad TP presentados por otros tejidos.

- Actividad TP en intestino delgado.



**Figura 5.30. Actividad TP en intestino delgado 34 semanas post-tratamiento.** Para todos los paneles las líneas horizontales representan la mediana, \*= $p < 0.05$  y \*\*= $p < 0.01$  respecto al grupo KO (test de Mann-Whitney). Nota: el eje de ordenadas está dividido en dos segmentos (0-10 y 100-900 en los paneles a-c y 0-100 y 100-900 en el panel d). a) Actividad TP en intestino delgado de animales tratados con el vector TBG. b) Actividad TP en intestino delgado de animales tratados con el vector PGK. c) Actividad TP en intestino delgado de animales tratados con el vector HLP. d) Actividad TP en intestino delgado de animales tratados con el vector AAT.

El intestino delgado es uno de los tejidos más ricos en actividad TP en animales WT (rango=268-859 nmoles Thy/h·mg proteína, media=471 nmoles Thy/h·mg proteína (n=16)). El modelo murino doble KO *Tymp<sup>-/-</sup>Upp1<sup>-/-</sup>* no presenta actividad TP en intestino delgado (rango=0-1 nmoles Thy/h·mg proteína, media=0.2 nmoles Thy/h·mg proteína (n=17)) (Figura 5.30).

El tratamiento con los diferentes vectores AAV no permite alcanzar niveles intestinales de actividad TP situadas dentro del rango WT en ningún caso (rango TBG=0-7 nmoles Thy/h·mg proteína, media TBG=0.8 nmoles Thy/h·mg proteína; rango PGK=0-4.5 nmoles Thy/h·mg proteína, media PGK=0.8 nmoles Thy/h·mg; rango HLP=0-6 nmoles Thy/h·mg proteína, media HLP=1.2 nmoles Thy/h·mg proteína; rango AAT=0-190 nmoles Thy/h·mg proteína, media AAT=15 nmoles Thy/h·mg proteína) (Figura 5.30). No obstante, al igual que para el resto de tejidos, el vector AAT es el que produce un mayor incremento de la actividad TP en intestino delgado. De hecho, existe correlación entre la dosis administrada y la actividad TP determinada en este órgano ( $r=0.5301$ ,  $p<0.01$ , correlación de Pearson).

### 5.4.2.3. Cuantificación de los niveles de proteína.

Los análisis por western-blot (WB) han permitido detectar la proteína TP en hígado en todos aquellos animales que presentan valores de actividad TP en este tejido superiores a 10 nmoles Thy/h·mg proteína (Figura 5.31). Además, los estudios semicuantitativos de densitometría de las membranas han revelado que, a las dosis comunes testadas, los niveles de proteína aumentan de forma paralela a la actividad TP con una correlación estadísticamente significativa ( $p<0.05$ , correlación de Spearman) salvo para la dosis de  $5 \cdot 10^{10}$  gc/kg (Figura 5.32).

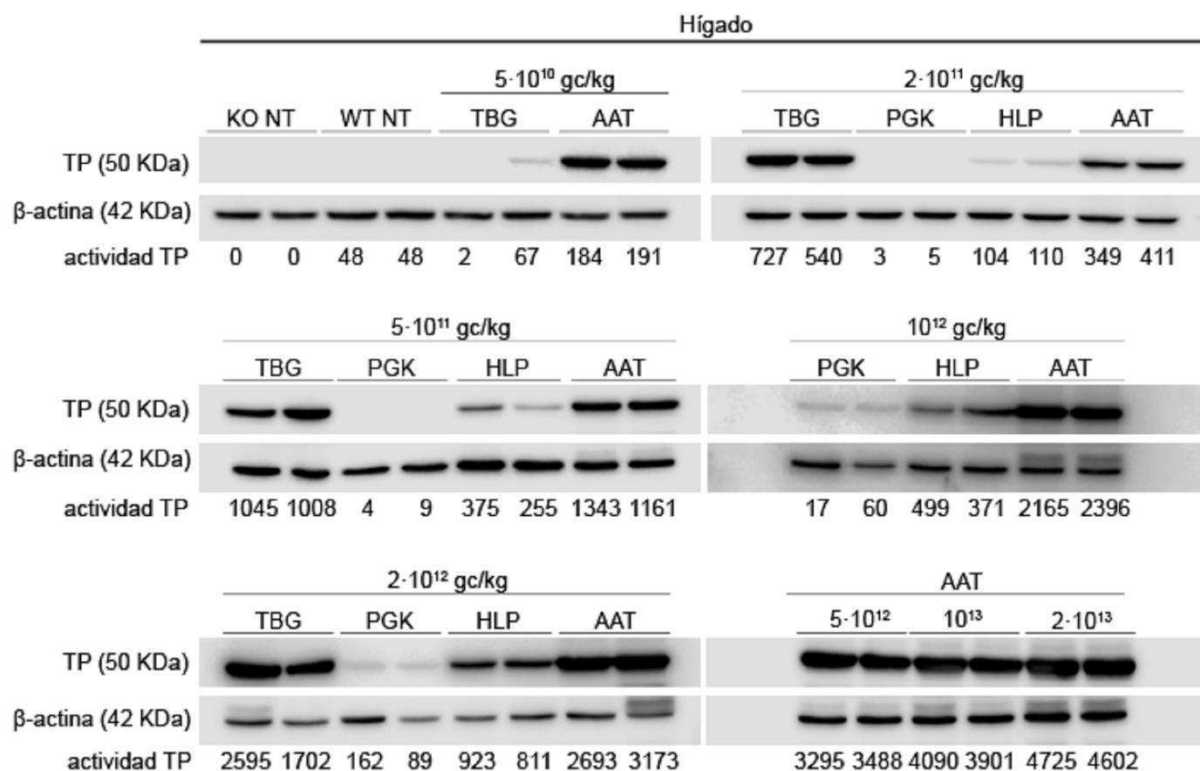
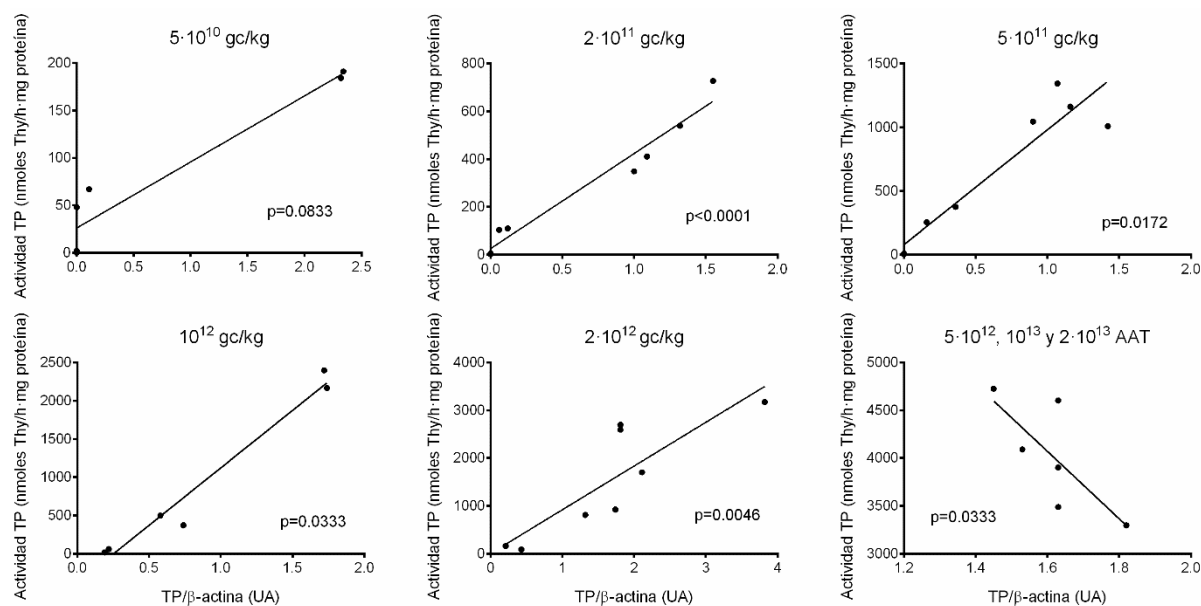
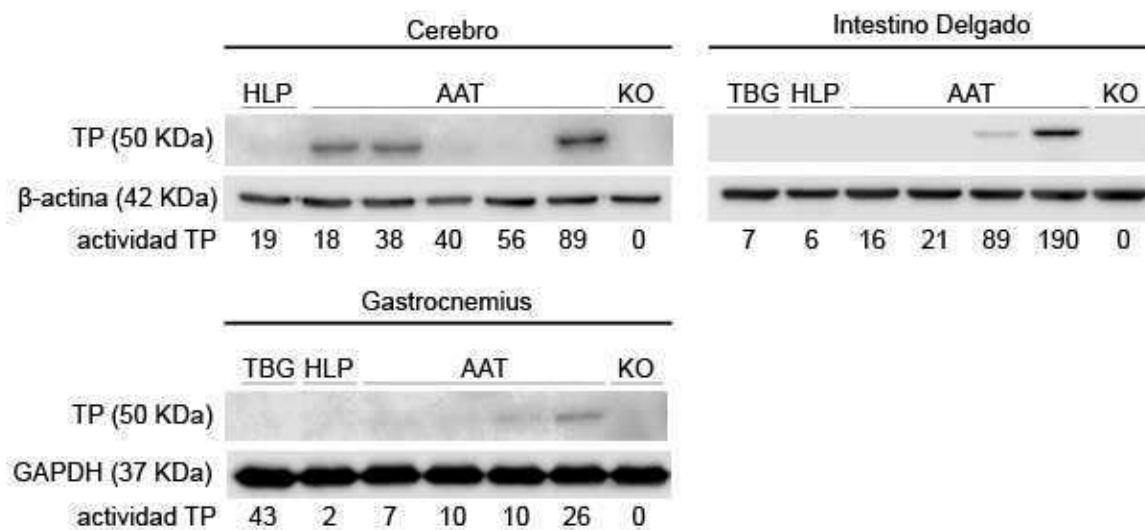


Figura 5.31. Imagen representativa de la detección de TP y β-actina por WB en extractos proteicos de hígado de animales tratados con los diferentes vectores y dosis. Se muestran también los valores de actividad TP (nmoles Thy/h·mg proteína).



**Figura 5.32.** Correlación entre la cuantificación de proteína por densitometría (expresado como la ratio entre TP y β-actina) y la actividad TP. p= coeficiente de correlación de Spearman para cada membrana. UA, unidades arbitrarias.

Sin embargo, en cerebro, gastrocnemius e intestino delgado no se detecta proteína en todos aquellos animales que presentan incremento de actividad TP y la cantidad de proteína cuantificada por densitometría de las membranas de WB no correlaciona con la actividad TP determinada (Figura 5.33).



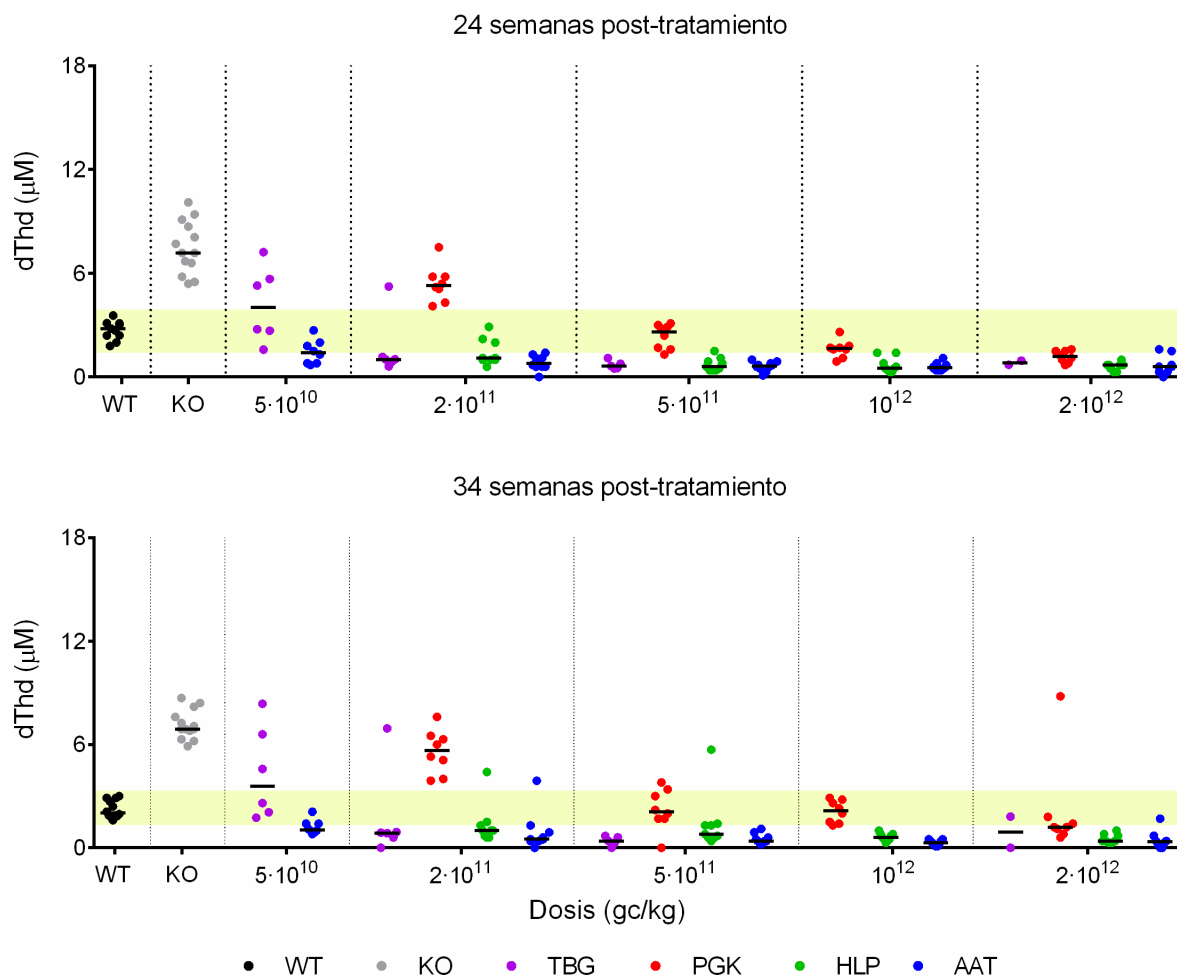
**Figura 5.33.** Imagen representativa de WB anti-TP en cerebro, intestino delgado y gastrocnemius de animales tratados con los diferentes vectores y dosis. Se muestran también los valores de actividad TP (nmol Thy/h-mg proteína).

### 5.4.3. Concentración sistémica de nucleósidos.

Con el fin de evaluar la capacidad de los diferentes vectores testados en la reducción de la concentración de nucleósidos a nivel sistémico, se han analizado las concentraciones de dThd y dUrd en plasma, hígado, cerebro, músculo esquelético e intestino delgado 34 semanas después de la administración vírica (punto final). Dada la similitud entre la concentración de ambos nucleósidos, únicamente se muestran los resultados finales de concentración de dThd.

- Concentración de dThd en plasma.

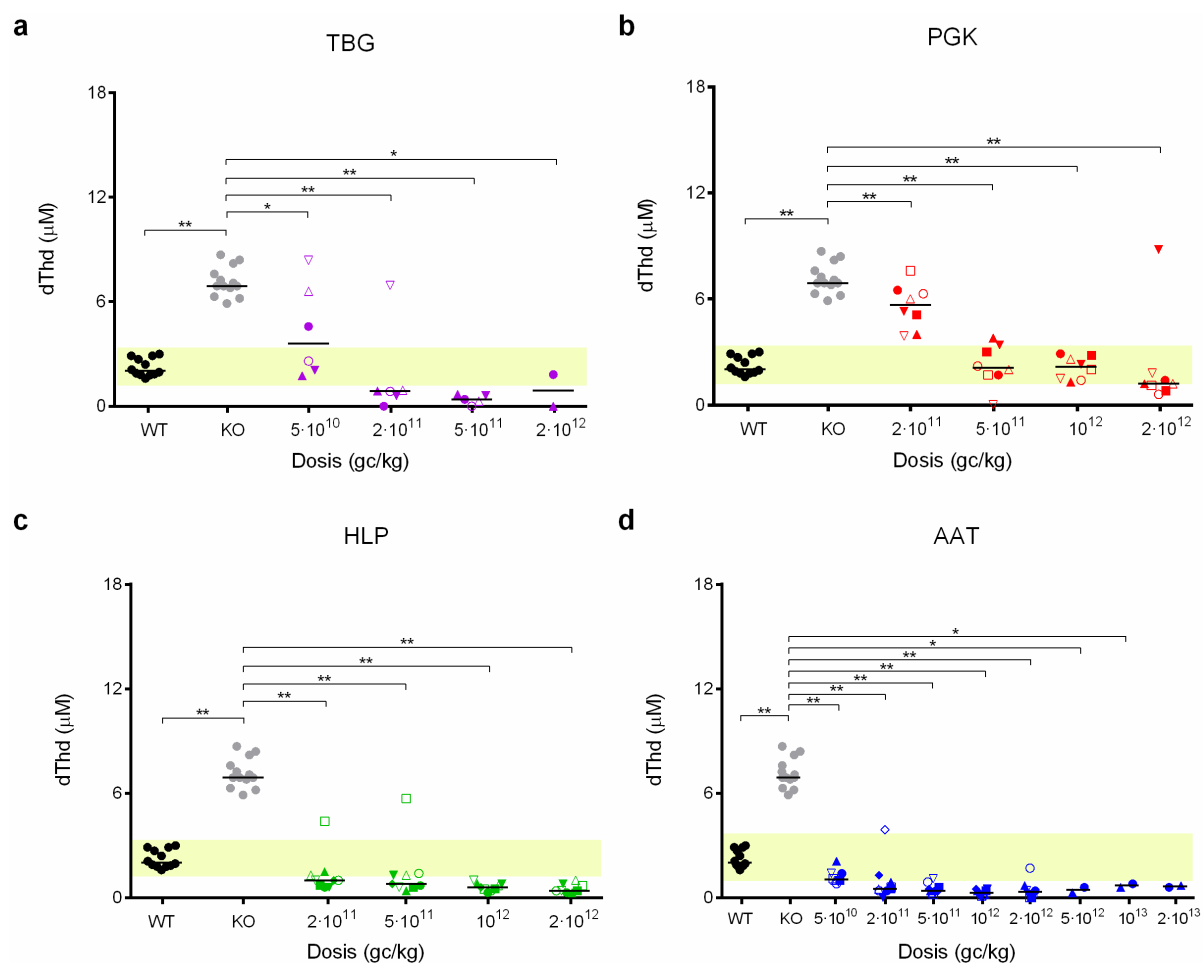
Tal y como se ha especificado en el apartado 4.4.5, la extracción de sangre en el momento del sacrificio se realizó mediante punción intracardíaca (durante el período de seguimiento las extracciones se han realizado a través de la vena safena).



**Figura 5.34. Concentración de dThd en plasma 24 y 34 semanas después del tratamiento.** El área sombreada en amarillo corresponde al rango de concentración de los animales WT. Las líneas horizontales representan la mediana. 24 semanas: extracción de sangre por vena safena. 34 semanas: extracción de sangre intracardíaca.

La concentración de dThd en plasma a punto final es muy similar a la concentración determinada 24 semanas después del tratamiento (Figura 5.34). Sin embargo, en 6 de los animales tratados con los diferentes vectores, la concentración de dThd asciende a valores superiores a los del grupo WT (en comparación con los resultados obtenidos 24 semanas después de la administración de AAVs). No obstante, el aumento en la concentración plasmática de dThd podría ser debido al método de extracción sanguínea utilizado a punto final ya que, por lo general, la punción intracardíaca resulta en una mayor hemólisis de las muestras y esto puede conllevar la alteración de los resultados. En los casos en los que también se observan concentraciones de nucleósidos elevadas en el resto de tejidos analizados, el motivo principal de este incremento reside en la pérdida del efecto terapéutico por dilución del número de copias del transgén (Figura 5.18). Para poder identificar la causa de cada caso particular, a continuación, se muestran los resultados de dThd plasmática a punto final desglosados para cada vector.





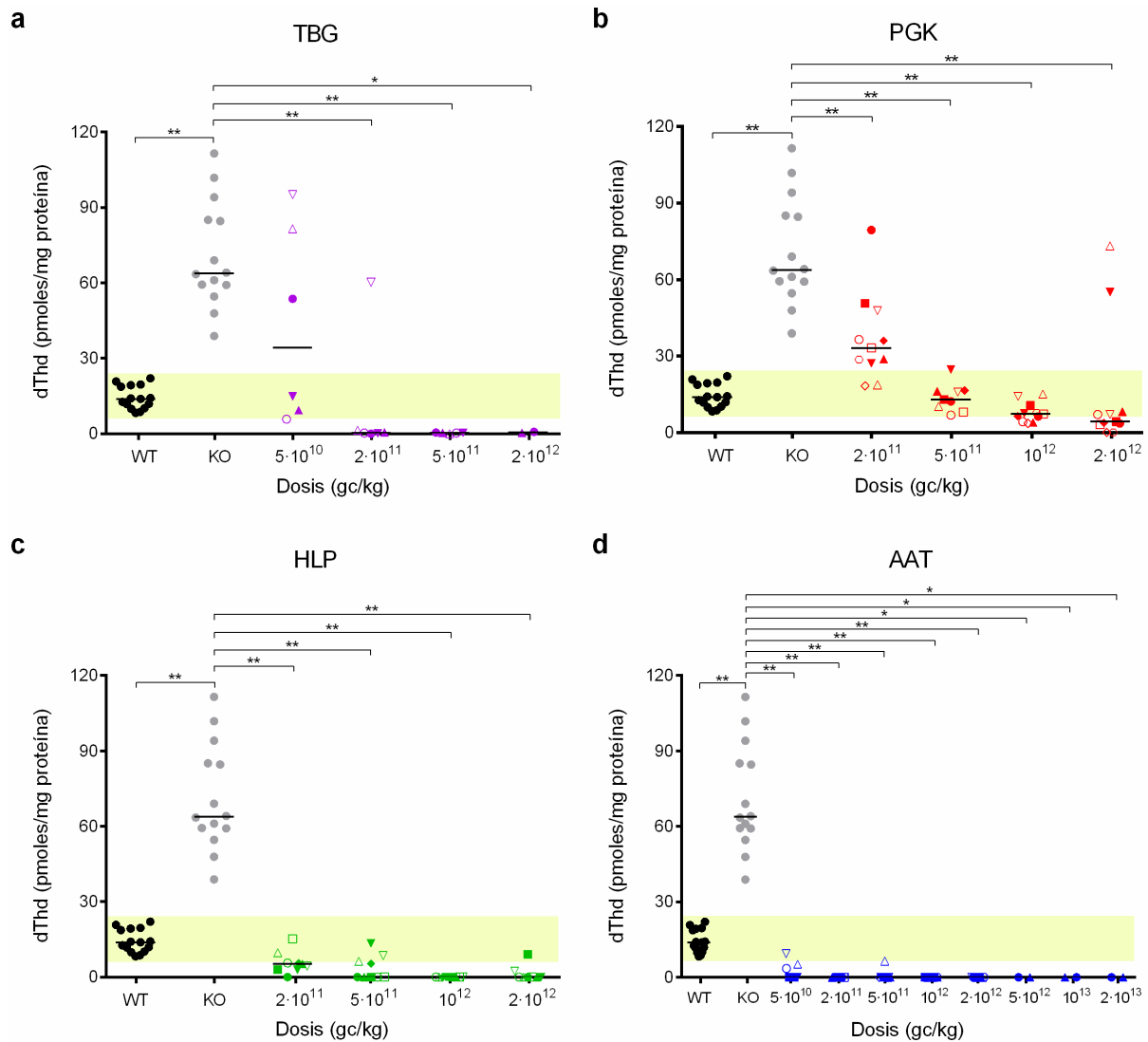
**Figura 5.35. Concentración de dThd en plasma 34 semanas post-tratamiento.** a) Concentración de dThd en animales tratados con el vector TBG. b) Concentración de dThd en animales tratados con el vector PGK. c) Concentración de dThd en animales tratados con el vector HLP. d) Concentración de dThd en animales tratados con el vector AAT. En todos los casos el área sombreada en amarillo corresponde al rango de concentración de animales WT, las barras horizontales representan la mediana y  $*=p<0.05$ ,  $**=p<0.01$  respecto al grupo KO (test de Mann-Whitney).

En base a lo anteriormente expuesto y teniendo en cuenta los resultados de número de copias de transgén, la actividad TP en hígado y la concentración de dThd en los diferentes tejidos (Figuras 5.14a-5.17a, 5.23a-5.26a y 5.36-5.39), vemos que en el caso del animal tratado con una dosis de  $2 \cdot 10^{12}$  gc/kg con el vector PGK (simbolizado con un triángulo invertido relleno) y del animal tratado con  $2 \cdot 10^{11}$  gc/kg del vector HLP (simbolizado con un cuadrado vacío), el aumento de dThd en plasma se debe a la pérdida del efecto terapéutico (número de copias=0.2 y 0.3 copias *TYMP*/célula y actividad TP hepática=2.3 y 6.7 nmoles Thy/h·mg proteína, respectivamente). Por el contrario, en el animal tratado con  $5 \cdot 10^{11}$  gc/kg del vector HLP (simbolizado con un cuadrado vacío) y del animal tratado con  $2 \cdot 10^{11}$  gc/kg del vector AAT (simbolizado con un rombo vacío), el aumento podría deberse a la hemólisis de las muestras de sangre o a otras causas asociadas al método de extracción sanguínea utilizado a punto final.

- Concentración de dThd en hígado.

La concentración de dThd en hígado de animales KO es, en promedio, 5 veces superior a la del grupo WT (rango KO=39-112 pmoles/mg proteína, media=71 pmoles/mg proteína (n=14)); rango WT=8-22 pmoles/mg proteína, media=14 pmoles/mg proteína (n=15)) (Figura 5.36). La actividad TP

proporcionada por los diferentes AAV permite reducir la concentración de dThd en hígado hasta valores iguales o inferiores a los WT (e incluso hasta límites indetectables en algunos casos). Esta reducción correlaciona con la actividad TP en hígado en los vectores TBG, HLP y AAT ( $p < 0.05$ , correlación de Pearson).



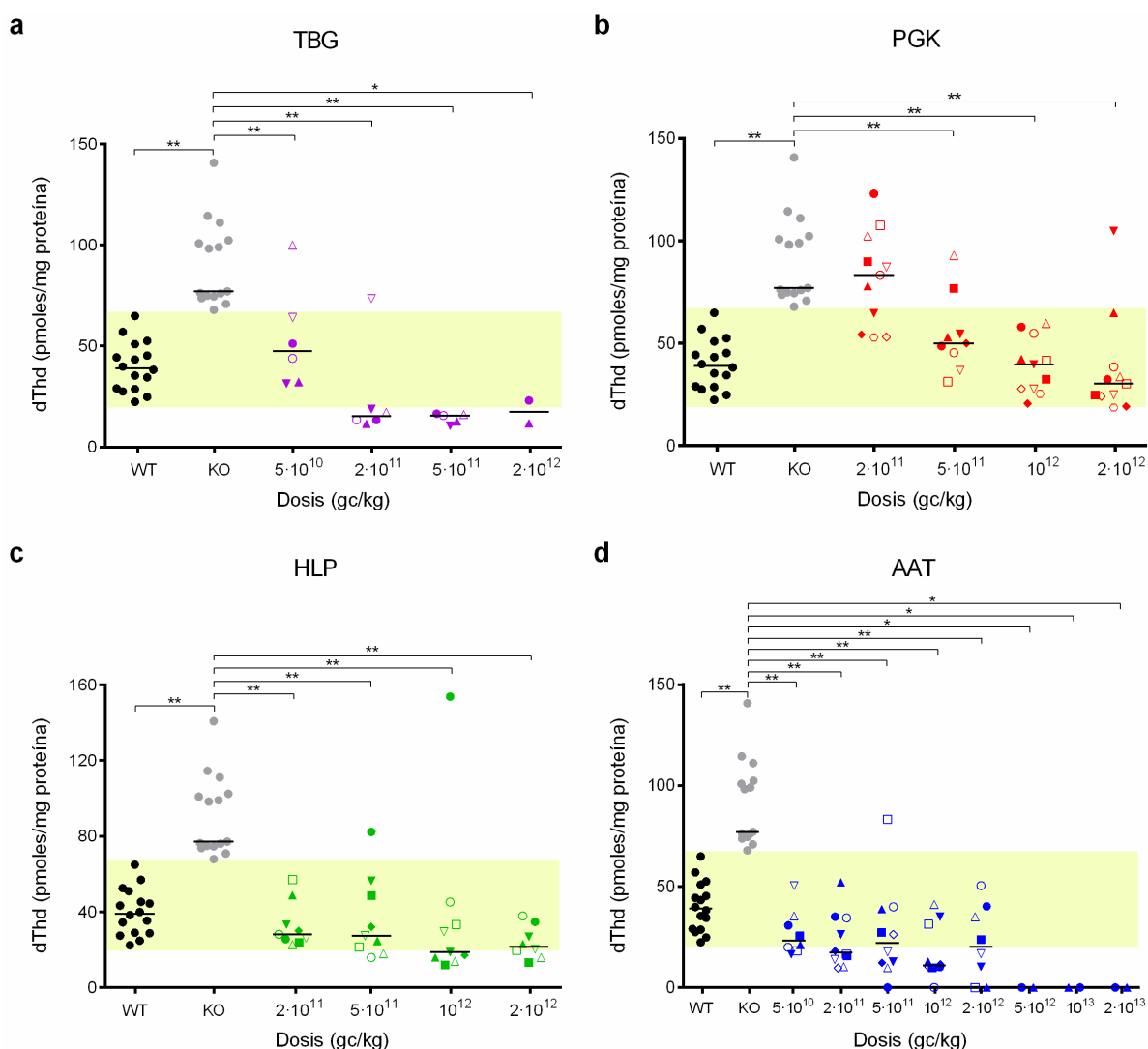
**Figura 5.36. Concentración de dThd en hígado 34 semanas post-tratamiento.** El área sombreada en amarillo corresponde al rango de concentración de los animales WT. Las barras horizontales representan la mediana. \*= $p < 0.05$  y \*\*= $p < 0.01$  respecto al grupo KO (test de Mann-Whitney). a) Animales tratados con el vector TBG. b) Animales tratados con el vector PGK. c) Animales tratados con el vector HLP. d) Animales tratados con el vector AAT.

Tras 34 semanas de tratamiento con el vector TBG, 15 de los 19 ratones tratados (78.9%) presentan disminución de los niveles de dThd en hígado (coincidiendo con lo observado en plasma) (Figura 5.35a y 5.36a). Sin embargo, la actividad TP en este tejido alcanza valores de WT en el 73.7%. Esto indica que valores de actividad inferiores a los de los animales WT pueden ser suficientes para corregir el exceso en la concentración de nucleósidos. De igual forma, a pesar de que sólo el 23.8% de los animales tratados con el vector PGK presentan valores de actividad TP en hígado iguales o superiores a los de los animales WT, la reducción de la concentración de dThd en este tejido se da en un 71.4% de los animales tratados (Figura 5.36b). Igual que ocurre en el resto de tejidos, el uso del vector de expresión

constitutiva produce una reducción menos acusada y se requiere de una dosis mínima de  $5 \cdot 10^{11}$  gc/kg para lograr efecto terapéutico.

La administración de los vectores HLP y AAT permite reducir la concentración de dThd hepática en el 100% de los animales tratados (*Figuras 5.36c y 5.36d*). No obstante, cabe destacar que en uno de los ratones tratados con una dosis de  $2 \cdot 10^{11}$  gc/kg del vector HLP (simbolizado con un cuadrado vacío), se observa disminución de dThd en hígado, cerebro y músculo esquelético, pero no en plasma. Además, tampoco se ha detectado actividad TP, reducción del pool de dTTP mitocondrial ni aumento en el número de copias de transgén en hígado. En concordancia con el resto de resultados presentados, el vector AAT es el único que resulta efectivo con una dosis de  $5 \cdot 10^{10}$  gc/kg. De hecho, en este caso, se observan diferencias significativas con el vector TBG a todas las dosis comunes testadas ( $p < 0.01$  para  $5 \cdot 10^{10}$  y  $2 \cdot 10^{11}$  gc/kg y  $p < 0.05$  para  $10^{12}$  y  $2 \cdot 10^{12}$  gc/kg, test de Mann-Whitney).

- Concentración de dThd en cerebro.



**Figura 5.37. Concentración de dThd en cerebro 34 semanas post-tratamiento.** El área sombreada en amarillo corresponde al rango de concentración de los animales WT. Las barras horizontales representan la mediana. \*= $p < 0.05$  y \*\*= $p < 0.01$  respecto al grupo KO (test de Mann-Whitney). a) Animales tratados con el vector TBG. b) Animales tratados con el vector PGK. c) Animales tratados con el vector HLP. d) Animales tratados con el vector AAT.

A pesar de la falta de actividad TP en cerebro de animales tratados con el vector TBG y PGK, el 94.7% y el 76.2% de los animales tratados, respectivamente, presentan concentraciones de dThd iguales o inferiores a las de los animales WT (rango WT=22-68 pmoles dThd/mg proteína, media WT=40 pmoles dThd/mg proteína (n=16)). Aunque en ambos casos se observa reducción de dThd en algunos animales que no presentan corrección de actividad TP en hígado, y viceversa, existe correlación entre la concentración cerebral de nucleósidos y la actividad TP hepática ( $p < 0.01$ , correlación de Pearson) (*Figuras 5.37a y 5.37b*).

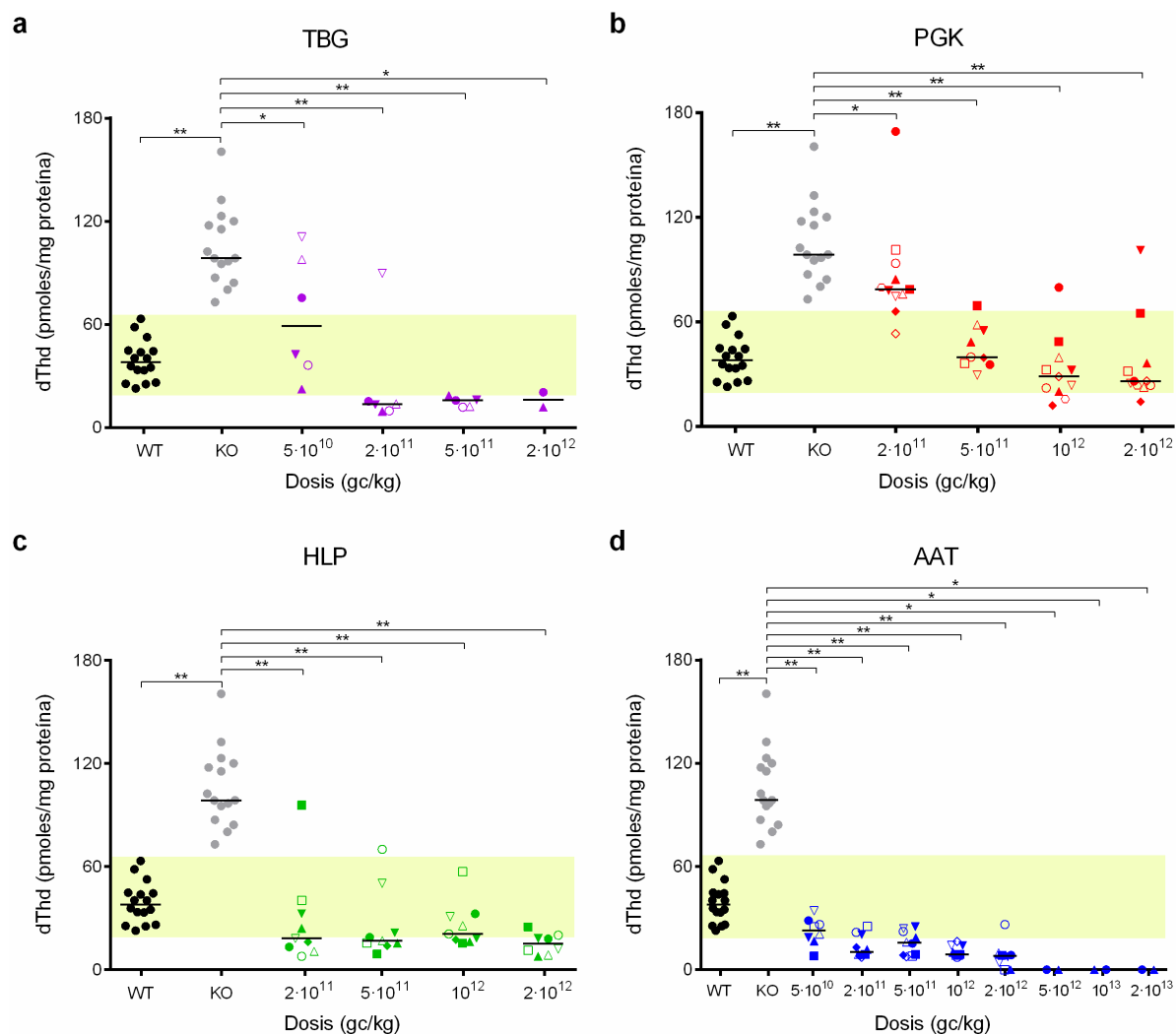
El tratamiento con el vector HLP permite reducir la concentración de dThd en cerebro en 33 de los 35 animales tratados (94.3%) (*Figura 5.37c*). No obstante, pese a que el 97% de los animales presentan restitución de los valores de actividad TP en hígado y el 11.4% lo hace también en cerebro, no se observa correlación entre la actividad TP hepática y/o cerebral y la concentración de dThd en cerebro en ningún caso (hígado:  $p = 0.3664$ ; cerebro:  $p = 0.6599$ , correlación de Pearson).

Por lo que refiere a los resultados obtenidos 34 semanas después de la administración del vector AAT, sólo uno de un total de 52 animales tratados con las diferentes dosis no reduce la concentración de dThd en cerebro (*Figura 5.37d*). De forma similar a lo que ocurre con el vector HLP, no existe correlación entre la actividad TP hepática y la concentración de nucleósidos en cerebro ( $p = 0.4365$ , correlación de Pearson). Sin embargo, si se observa correlación entre la concentración y la actividad TP en cerebro ( $p = 0.0031$ , correlación de Pearson). En comparación con el vector TBG, únicamente la dosis más baja administrada ( $5 \cdot 10^{10}$  gc/kg) resulta más eficiente en este caso ( $p = 0.0127$ , test de Mann-Whitney).

#### - Concentración de dThd en músculo esquelético.

A pesar de que la diferencia de actividad TP en músculo esquelético entre animales KO y WT es menos evidente que en el resto de tejidos debido a la baja expresión de la enzima TP en condiciones normales en músculo, la concentración de dThd en gastrocnemius de animales KO es 2.7 veces superior a la de los ratones WT (KO=106  $\pm$  23 pmoles dThd/mg proteína; WT=39  $\pm$  12 pmoles dThd/mg proteína) (*Figura 5.38*).

De forma similar a lo que ocurre en cerebro, el tratamiento con los diferentes vectores adeno-asociados logra reducir la concentración de dThd en músculo esquelético (*Figura 5.38*). Esta disminución correlaciona con la actividad TP en hígado para los vectores TBG, PGK y AAT (TBG,  $p = 0.0053$ ; PGK,  $p = 0.0215$ ; AAT,  $p < 0.0001$ ; HLP,  $p = 0.2889$  (correlación de Pearson)). Para el vector AAT, se observa también correlación entre actividad TP en músculo y concentración de nucleósidos en este mismo tejido ( $p = 0.0438$ , correlación de Pearson). En este caso, se observan también diferencias significativas ( $p = 0.008$ , test de Mann-Whitney) entre los valores presentados por los animales tratados con los vectores TBG (64  $\pm$  36 pmoles dThd/mg proteína) y AAT (22  $\pm$  8 pmoles dThd/mg proteína) al comparar la dosis más baja testada.



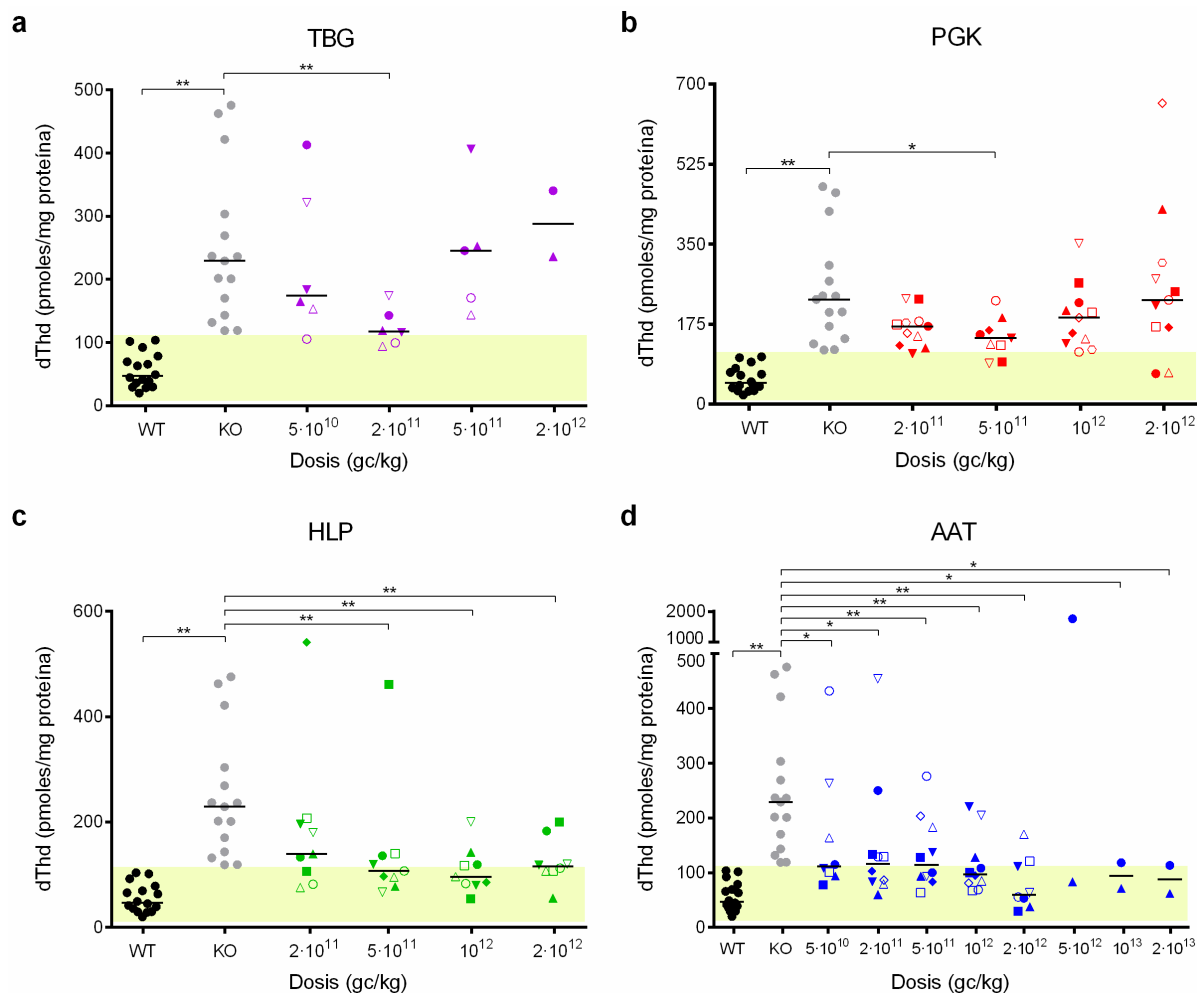
**Figura 5.38.** Concentración de dThd en músculo esquelético (gastrocnemius) 34 semanas post-tratamiento. El área sombreada en amarillo corresponde al rango de concentración de los animales WT. Las barras horizontales representan la mediana. \*= $p < 0.05$  y \*\*= $p < 0.01$  respecto al grupo KO (test de Mann-Whitney). a) Animales tratados con el vector TBG. b) Animales tratados con el vector PGK. c) Animales tratados con el vector HLP. d) Animales tratados con el vector AAT.

- Concentración de dThd en intestino delgado.

El intestino delgado es uno de los órganos más ricos en actividad TP y uno de los más afectados en los pacientes de MNGIE. El efecto del tratamiento en este tejido es menos pronunciado que el observado en el resto de tejidos analizados (Figura 5.39).

Pese a la dispersión de los resultados, la concentración de dThd en animales KO es de  $248 \pm 120$  pmoles dThd/mg proteína, 4.5 veces superior a la concentración en animales WT ( $56 \pm 27$  pmoles dThd/mg proteína) (Figura 5.39). De entre todos los animales tratados con las diferentes dosis del vector TBG, sólo el 15.8% presenta valores de dThd situados dentro del rango WT (Figura 5.39a). El porcentaje se reduce hasta un 9.5% en los animales tratados con PGK (Figura 5.39b). En el caso de los vectores HLP y AAT los niveles de dThd en intestino delgado logran reducirse hasta valores normales en el 45.7% y el 53.8% de los ratones tratados, respectivamente (Figuras 5.39c y 5.39d). Pese a que estos porcentajes son notablemente más elevados que los obtenidos con los vectores TBG y PGK, la eficiencia del tratamiento en cuanto al aclaramiento de la concentración de nucleósidos en intestino delgado es de aproximadamente la mitad a la observada en el resto de tejidos analizados, dónde la reducción ocurre

en el 90-100% de los animales tratados. Otro hecho diferencial es que no se observa correlación entre la actividad TP en hígado y la concentración de dThd en intestino delgado en ningún caso. Además, particularmente para el vector AAT, la concentración de dThd tampoco correlaciona con la actividad TP en éste órgano (en el resto de tejidos, sí existe correlación entre actividad y nucleósidos determinados en un mismo tejido para el vector AAT).



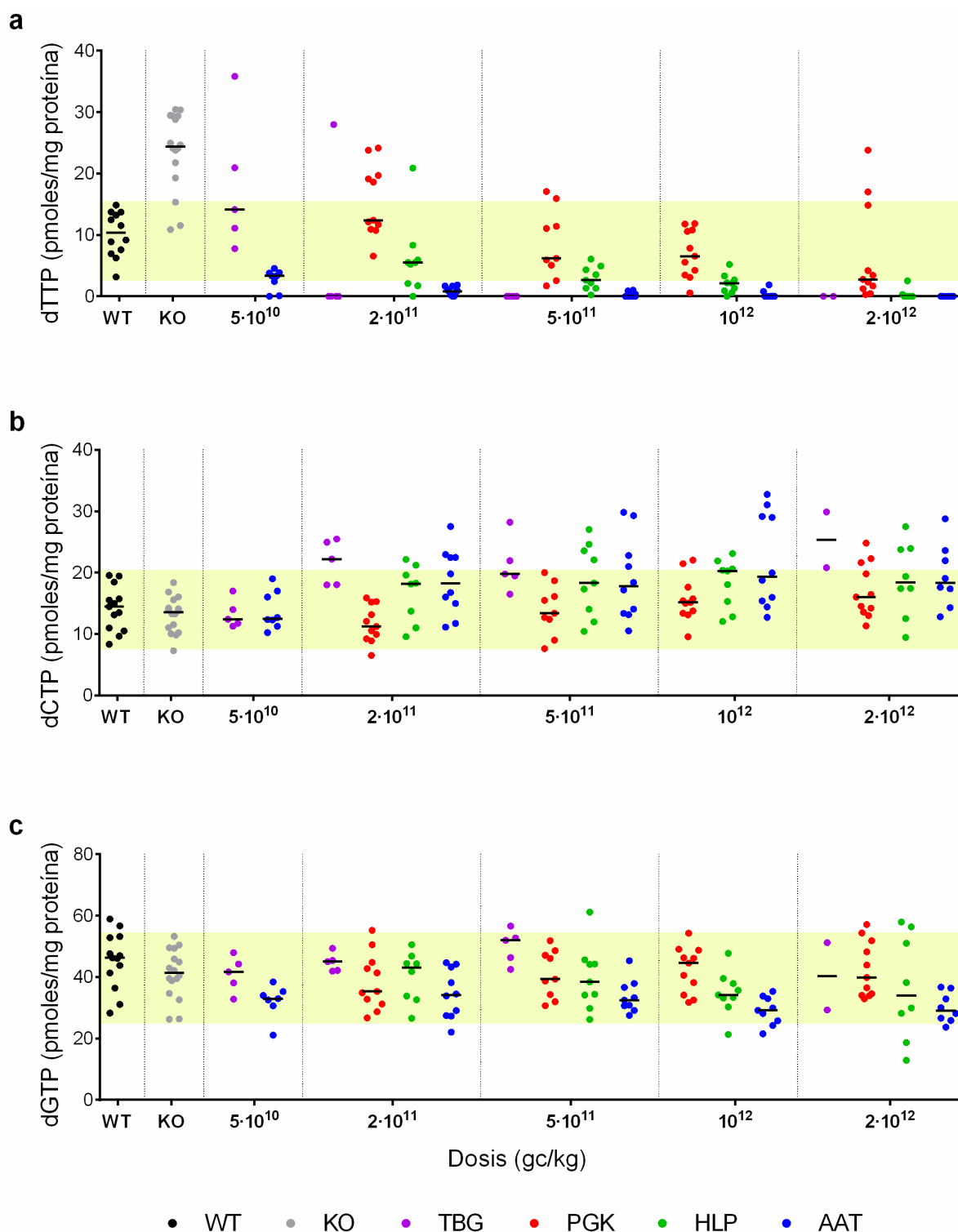
**Figura 5.39. Concentración de dThd en intestino delgado 34 semanas post-tratamiento.** El área sombreada en amarillo corresponde al rango de concentración de los animales WT. Las barras horizontales representan la mediana. \*= $p < 0.05$  y \*\*= $p < 0.01$  respecto al grupo KO (test de Mann-Whitney). a) Animales tratados con el vector TBG. b) Animales tratados con el vector PGK. c) Animales tratados con el vector HLP. d) Animales tratados con el vector AAT. Nota: el eje de ordenadas está dividido en dos segmentos (0-500 y 1000-2000).

#### 5.4.4. Concentración de dNTPs mitocondriales en hígado.

Con el fin de determinar qué efecto tiene la reducción de la concentración de nucleósidos sobre el pool de dNTPs mitocondriales, se han medido los niveles de dTTP, dCTP y dGTP en mitocondrias de hígado. Debido a limitaciones en el método de determinación, no ha sido posible determinar la concentración de dATP.

Antes de mostrar los resultados, es necesario destacar el hecho de que, debido a la descatalogación de algunos reactivos clave para la medida, nos hemos visto forzados a realizar modificaciones en el protocolo (*ver materiales y métodos apartado 4.5.3.2*). Por esta razón y, con el fin de evitar diferencias entre grupos debidas a la metodología empleada, se han vuelto a determinar las concentraciones de

dNTPs en los animales TBG, KO y WT. Los resultados obtenidos con este nuevo método difieren de los anteriormente publicados<sup>100</sup>.

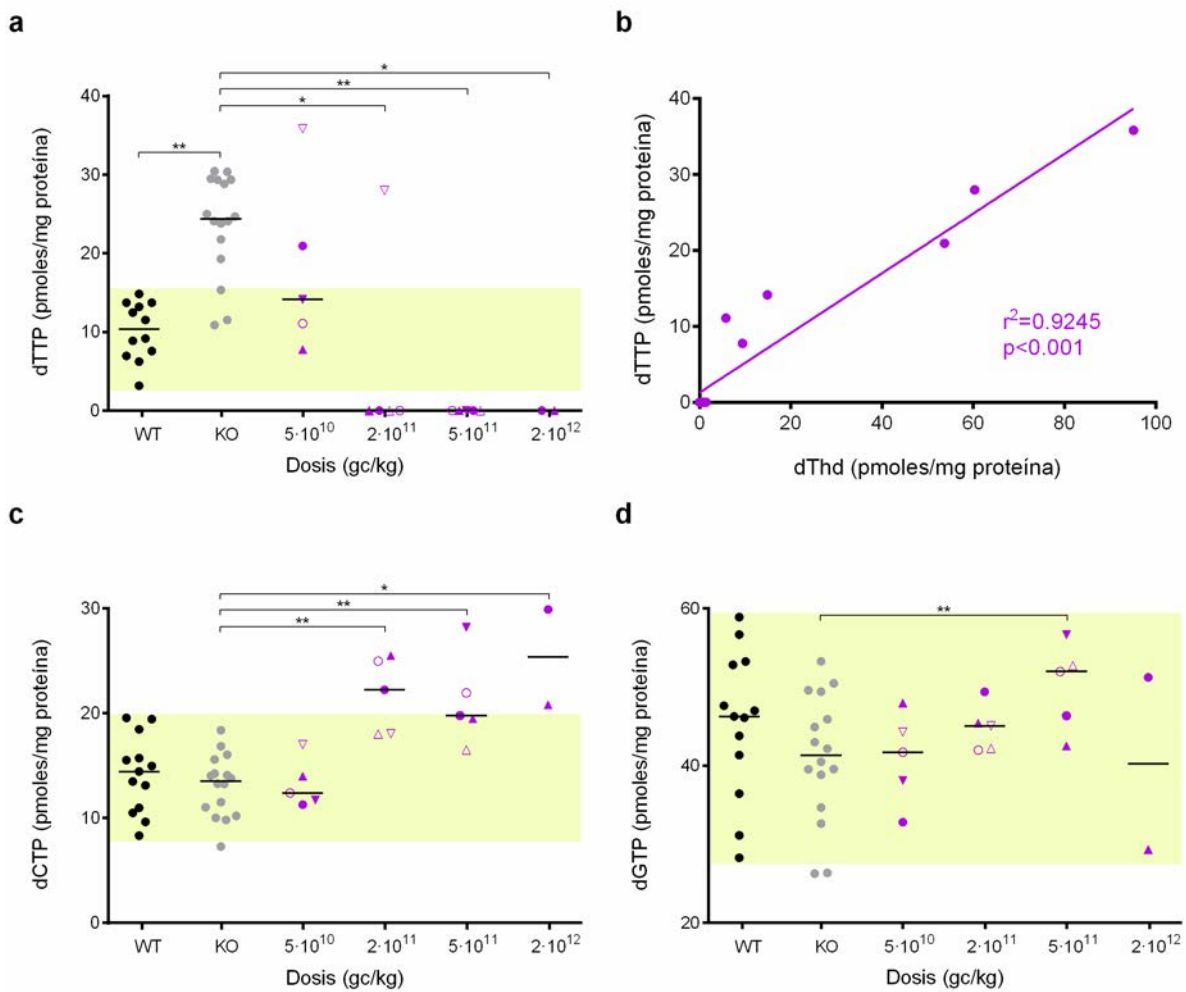


**Figura 5.40. Concentración de dNTPs mitocondriales en hígado 34 semanas post-tratamiento.** El área representada en amarillo corresponde al rango de concentración de los animales WT. Las líneas horizontales representan la mediana. a) Concentración de dTTP. b) Concentración de dCTP. c) Concentración de dGTP.

El cambio en el protocolo de determinación ha comportado una disminución en la sensibilidad de detección a causa de una mayor interferencia de la matriz de la muestra con los nuevos reactivos

utilizados. Este hecho es especialmente relevante en la determinación de dTTP debido a la baja concentración que presentan la mayor parte de los animales tratados. En este caso en concreto el límite de detección corresponde a 0.8 pmoles dTTP/mg proteína y valores inferiores a 0.8 aparecen representados como 0. A pesar de esto, el nuevo protocolo utilizado ha permitido detectar, por primera vez, diferencias en los niveles de dTTP entre los grupos KO y WT (KO=23.6 ± 6.4 pmoles/mg proteína (n=16); WT=10.1 ± 3.7 pmoles/mg proteína (n=12); p<0.01, test de Mann-Whitney) (Figura 5.40a). Sin embargo, no se ha observado reducción en la concentración de dCTP en los animales KO (KO=13.1 ± 2.9 pmoles/mg proteína; WT=14.2 ± 3.7 pmoles/mg proteína) (Figura 5.40b). Tampoco se observan diferencias en la concentración de dGTP mitocondrial en hígado entre KO y WT (KO=41.1 ± 8.1 pmoles/mg proteína; WT=45.4 ± 9.3 pmoles/mg proteína) (Figura 5.40c).

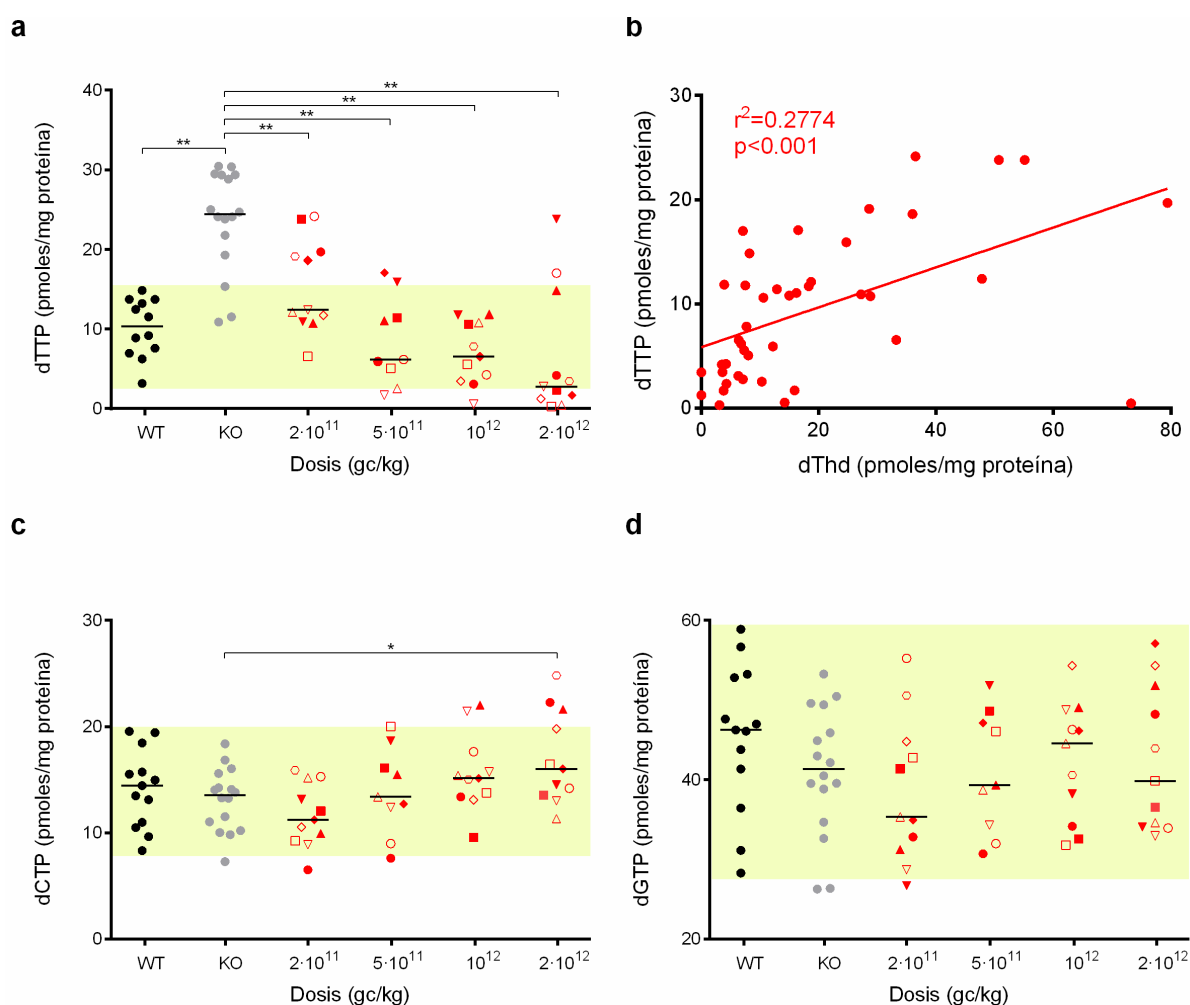
Los datos representados en la Figura 5.40 muestran que, de forma general, el tratamiento con AAVs permite reducir la concentración de dTTP y aumentar la concentración de dCTP mitocondrial en hígado. Por el contrario, el aporte de actividad TP no tiene un efecto claro sobre los niveles de dGTP. No obstante, para poder estudiar mejor cuáles son las consecuencias del uso de cada uno de los AAVs testados en la modulación de la concentración de los dNTPs mitocondriales hepáticos, a continuación, se muestran los resultados desglosados para cada vector.



**Figura 5.41. Vector TBG: Concentración de dNTPs mitocondriales en hígado.** El área sombreada en amarillo corresponde al rango de concentración en animales WT. Las barras horizontales representan la mediana. \*=*p*<0.05 y \*\*=*p*<0.01 respecto a KO (test de Mann-Whitney). a) Concentración de dTTP. b) Correlación de Pearson entre la concentración de dTTP y la concentración de dThd en hígado 34 semanas después del tratamiento. c) Concentración de dCTP. d) Concentración de dGTP.



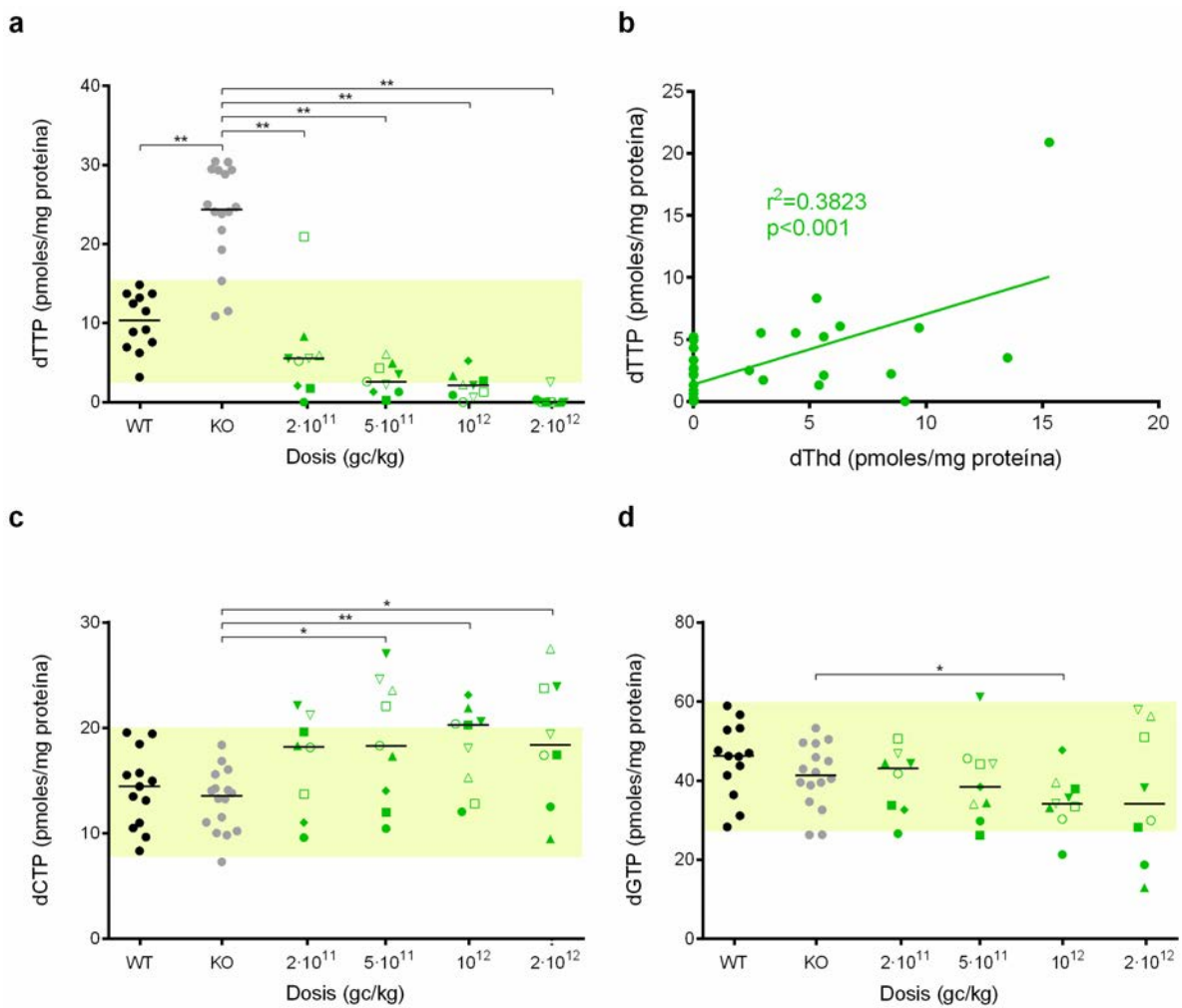
El 88.2% de los animales tratados con el vector TBG muestra reducción de la concentración de dTTP mitocondrial en hígado. En el caso de la administración de dosis iguales o superiores a  $2 \cdot 10^{11}$  gc/kg se produce una caída drástica de la concentración y los valores determinados se sitúan incluso por debajo de nuestro límite de detección (que corresponde a 0.8 pmoles dTTP/mg proteína) (Figura 5.41a). Tal y como muestra la Figura 5.41b, existe una fuerte correlación entre la concentración de dThd en hígado y la concentración de dTTP mitocondrial en este tejido, sin embargo, no se observa correlación entre la concentración de dTTP y la dosis administrada ( $p=0.1184$ , correlación de Pearson). La disminución de dTTP va acompañada de un aumento de hasta 1.6 veces en la concentración de dCTP, en comparación con los animales WT. Los valores de dCTP correlacionan con los de dTTP y la dosis administrada ( $p<0.05$  en ambos casos, correlación de Pearson). También existe correlación entre la concentración de dCTP y la concentración de dGTP ( $p<0.05$ , Pearson), la cual aumenta significativamente tras la administración de dosis de  $5 \cdot 10^{11}$  gc/kg (Figura 5.41d).



**Figura 5.42. Vector PGK: Concentración de dNTPs mitocondriales en hígado.** El área sombreada en amarillo corresponde al rango de concentración en animales WT. Las barras horizontales representan la mediana.  $*$ = $p<0.05$  y  $**$ = $p<0.01$  respecto a KO (test de Mann-Whitney). a) Concentración de dTTP. b) Correlación de Pearson entre la concentración de dTTP y la concentración de dThd en hígado 34 semanas después del tratamiento. c) Concentración de dCTP. d) Concentración de dGTP.

En concordancia a lo observado con el resto de variables estudiadas, y a pesar de que el uso del vector PGK también produce un efecto sobre el desequilibrio de dNTPs mitocondriales, éstos son más atenuados que los generados por los vectores que contienen promotores específicos de tejido. Concretamente, 34 semanas después del tratamiento, el 78.6% de los animales administrados con el

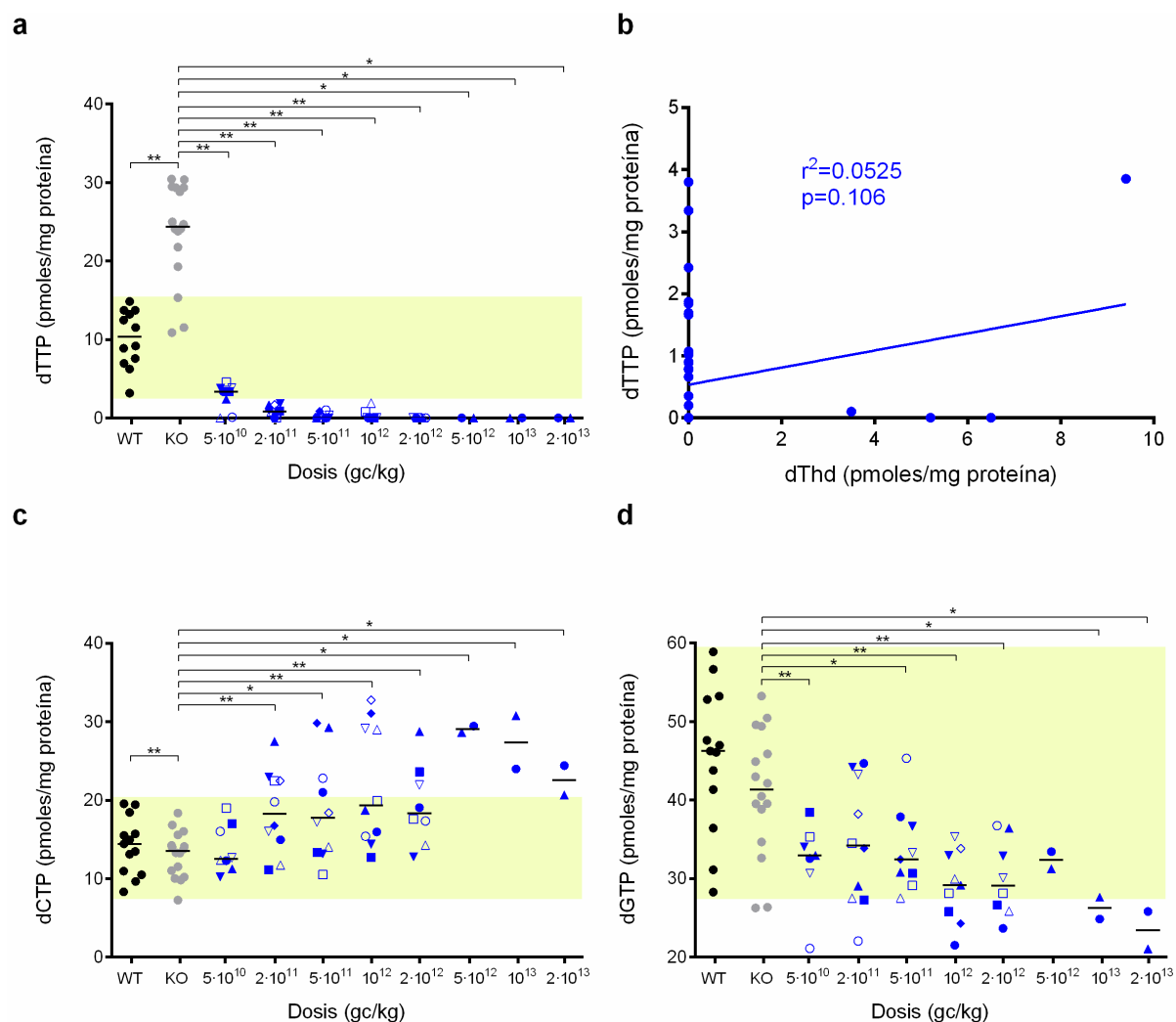
vector PGK presenta valores de dTTP situados dentro del rango WT. Sin embargo, aunque el 16.7% presentan concentraciones inferiores, sólo el 7% se sitúan por debajo del límite de detección (Figura 5.42a). En este caso, la concentración de dTTP correlaciona con la concentración de dThd en hígado (Figura 5.42b) y con la dosis administrada ( $p < 0.01$ , correlación de Pearson). Paralelamente, se observa un aumento en la concentración de dCTP a la dosis más alta testada (Figura 5.42c). A pesar de que también existe correlación entre dosis y concentración de dCTP ( $p < 0.01$ , Pearson), no se establece una dependencia clara entre el aumento de dCTP y la disminución de dTTP ( $p = 0.2478$ , Pearson). Aunque no existe significancia estadística, puede observarse también una tendencia de aumento en la concentración de dGTP a dosis de entre  $2 \cdot 10^{11}$  y  $10^{12}$  gc/kg (Figura 5.42d). Esta variable correlaciona significativamente con la concentración de dCTP ( $p < 0.0001$ , Pearson).



**Figura 5.43. Vector HLP: Concentración de dNTPs mitocondriales en hígado.** El área sombreada en amarillo corresponde al rango de concentración en animales WT. Las barras horizontales representan la mediana. \*= $p < 0.05$  y \*\*= $p < 0.01$  respecto a KO (test de Mann-Whitney). a) Concentración de dTTP. b) Correlación de Pearson entre la concentración de dTTP y la concentración de dThd en hígado 34 semanas después del tratamiento. c) Concentración de dCTP. d) Concentración de dGTP.

Tras la administración del vector HLP sólo el animal en el cual se observaba pérdida del efecto terapéutico debido a dilución del transgén no reduce la concentración de dTTP mitocondrial en hígado (Figura 5.43a). Igual que para el vector PGK, la concentración de dTTP correlaciona positivamente con la concentración de dThd en hígado (Figura 5.43b) y con la dosis administrada ( $p < 0.01$ , Pearson) pero no con la concentración de dCTP ( $p = 0.7528$ ), la cual se sitúa en valores que son, en promedio, hasta 1.3 veces superiores a los de los animales WT (Figura 5.43c). A diferencia de lo que ocurre tras el

tratamiento con los AAV TBG o PGK, los valores de dGTP mitocondrial tienen tendencia a disminuir, sin embargo, la bajada sólo resulta significativa en el caso de los animales que recibieron una dosis de  $10^{12}$  gc/kg. Esta disminución correlaciona negativamente con la concentración de dCTP ( $p < 0.0001$ , Pearson).

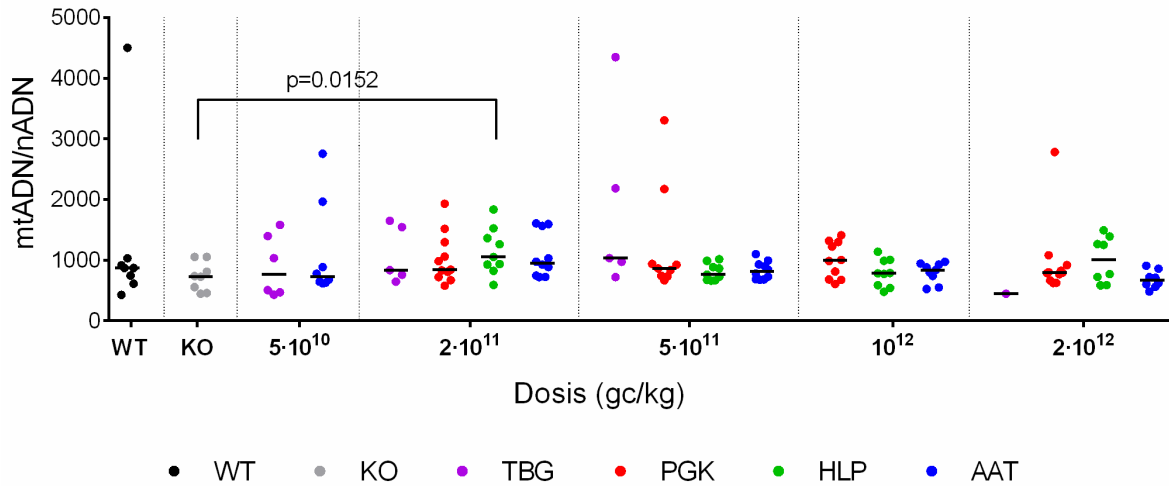


**Figura 5.44. Vector AAT: Concentración de dNTPs mitocondriales en hígado.** El área sombreada en amarillo corresponde al rango de concentración en animales WT. Las barras horizontales representan la mediana.  $*=p < 0.05$  y  $**=p < 0.01$  respecto a KO (test de Mann-Whitney). a) Concentración de dTTP. b) Correlación de Pearson entre la concentración de dTTP y la concentración de dThd en hígado 34 semanas después del tratamiento. c) Concentración de dCTP. d) Concentración de dGTP.

La concentración de dTTP mitocondrial disminuye significativamente tras la administración de una dosis igual o superior a  $5 \cdot 10^{10}$  gc/kg del vector AAT en el 100% de los ratones tratados y alcanza, en la mayoría de los casos, valores inferiores al mínimo cuantificable (Figura 5.44a). Dada la elevada potencia de este vector tanto en la reducción de la concentración de dThd como de dTTP mitocondrial en hígado, incluso a las dosis más bajas, no se observa correlación entre estas dos variables (Figura 5.44b) así como tampoco entre la concentración de dTTP y la dosis administrada. El tratamiento con dosis de entre  $2 \cdot 10^{11}$  y  $2 \cdot 10^{13}$  gc/kg del vector AAT produce un aumento de la concentración de dCTP, la cual llega a presentar valores que suponen un incremento de hasta 1.5 veces los de los animales WT. Sin embargo, a pesar de la disminución de dTTP observada en los animales tratados con una dosis de  $5 \cdot 10^{10}$  gc/kg, no se observa aumento de la concentración de dCTP en este caso (Figura 5.44c). Así pues, aunque el aumento en los niveles de dCTP correlaciona con la dosis administrada ( $p = 0.0465$ , Pearson),

no lo hace con la concentración de dTTP ( $p=0.0788$ , Pearson). Curiosamente, por lo que refiere al pool mitocondrial de dGTP, los efectos producidos por el vector AAT coinciden con los observados tras el tratamiento con el vector HLP y se observa una disminución clara y significativa que correlaciona con la dosis administrada ( $p=0.0125$ , Pearson).

#### 5.4.5. Número de copias de mtADN en hígado.

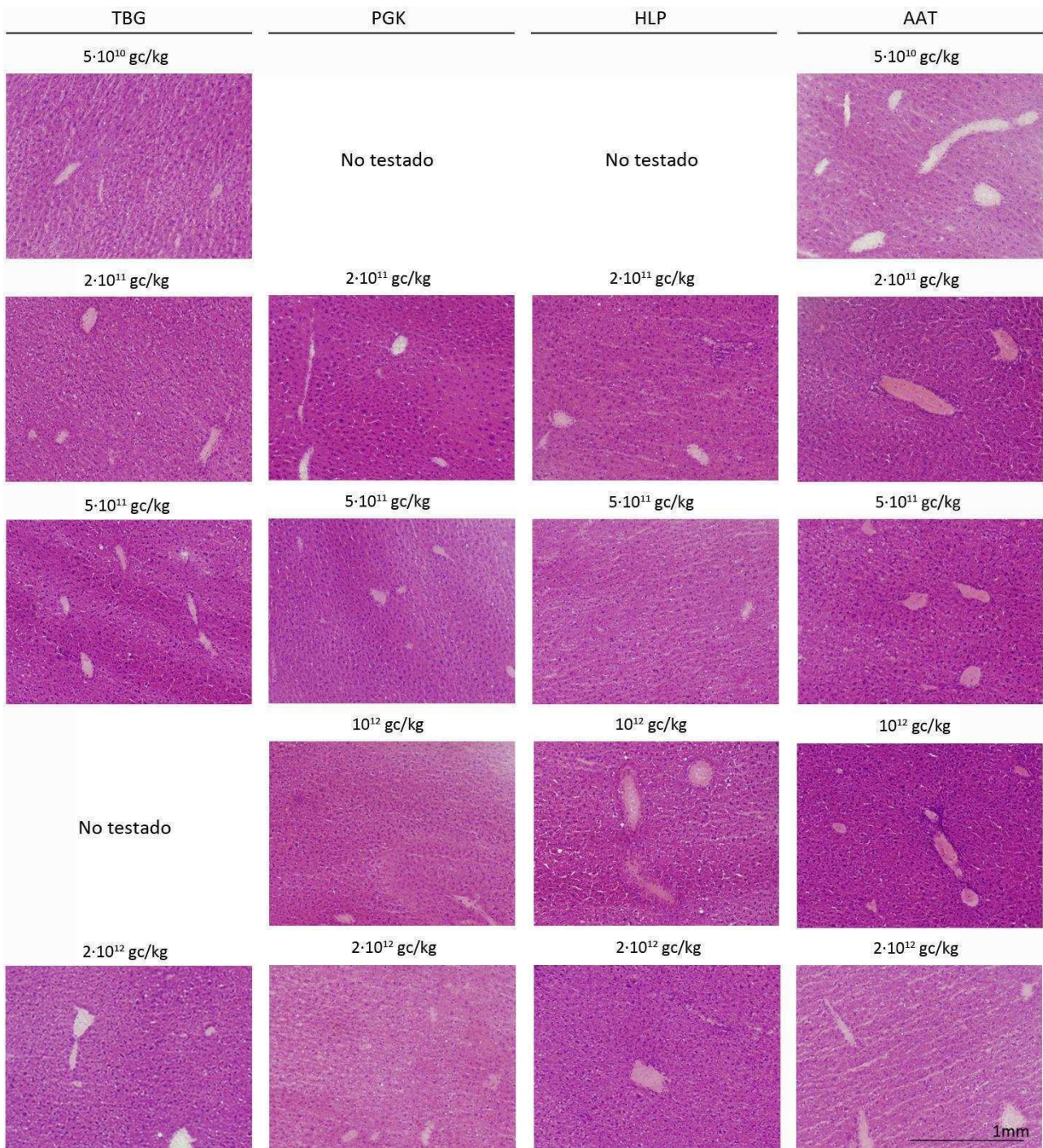


**Figura 5.45.** Representación gráfica de la ratio mtADN/nADN en hígado 34 semanas después del tratamiento para los diferentes vectores y dosis utilizadas. Las líneas horizontales representan la mediana.  $p=0.0152$  (test de Mann-Whitney).

Tal y como puede observarse en la *Figura 5.45*, sólo el grupo tratado con  $2 \cdot 10^{11}$  gc/kg del vector HLP presenta aumento significativo, respecto al grupo KO, en cuanto al número de copias de ADN mitocondrial en hígado 34 semanas después del tratamiento. En el resto de casos, pese a que algunos de los animales tratados con los diferentes vectores y dosis muestran una ratio mtADN/nADN ligeramente más elevada que la del grupo KO sin tratar, el incremento producido no es estadísticamente significativo. Tampoco se observan diferencias en los valores de mtADN/nADN entre los grupos KO y WT en este tejido.

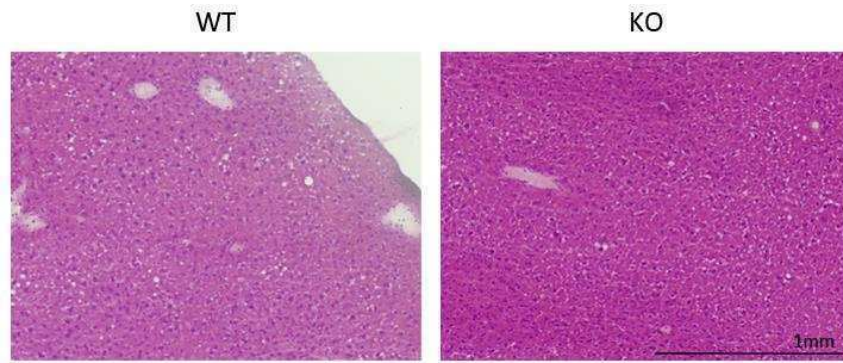
#### 5.4.6. Caracterización histológica del hígado.

Con el fin de detectar el desarrollo de posibles tumores y/o otros signos de daño hepático relacionados con el tratamiento de AAVs, se ha realizado un estudio histológico del hígado mediante tinción con hematoxilina-eosina.

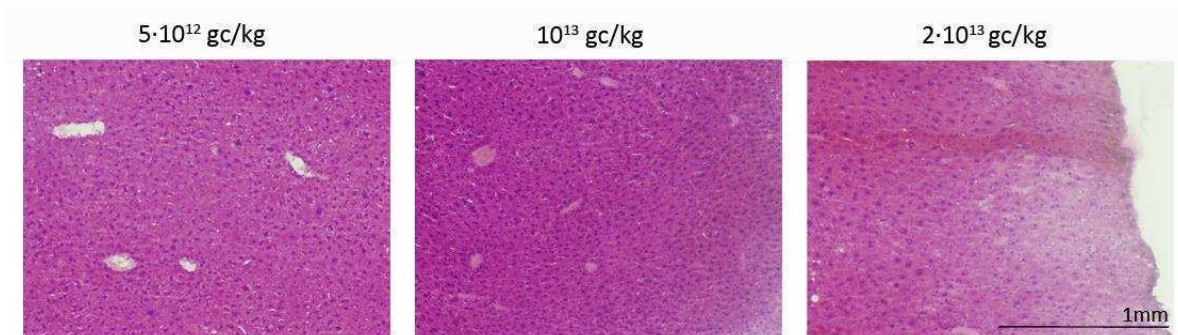


**Figura 5.46. Tinción hematoxilina-eosina en hígado 34 semanas después del tratamiento.** Se muestra un animal representativo de cada dosis (5·10<sup>10</sup>, 2·10<sup>11</sup>, 5·10<sup>11</sup>, 10<sup>12</sup> y 2·10<sup>12</sup> gc/kg) para cada vector (TBG, PGK, HLP y AAT).

Tal y como puede verse en la *Figura 5.46*, no existen diferencias morfológicas en hígado entre animales tratados con los diferentes vectores a las dosis comunes testadas (5·10<sup>10</sup>, 2·10<sup>11</sup>, 5·10<sup>11</sup>, 10<sup>12</sup> y 2·10<sup>12</sup> gc/kg). Tampoco se observan diferencias entre los ratones que han recibido tratamiento con AAVs y los WT o KO no tratados (*Figura 5.47*) ni se ha detectado aumento de infiltrados celulares indicativos de inflamación, aumento de angiogénesis o aumento de la incidencia de tumores en hígado en los ratones administrados con dosis superiores a 2·10<sup>12</sup> gc/kg del vector AAT (*Figura 5.48*).



**Figura 5.47.** Tinción hematoxilina-eosina en hígado de un animal WT y un KO no tratado. Se muestra un animal representativo en cada caso.



**Figura 5.48.** Tinción hematoxilina-eosina en hígado de animales tratados con dosis altas del vector AAT 34 semanas después del tratamiento. Se muestra un animal representativo de las dosis  $5 \cdot 10^{12}$ ,  $10^{13}$  y  $2 \cdot 10^{13}$  gc/kg del vector AAT.



## 6. DISCUSIÓN





El MNGIE es una enfermedad devastadora que produce una grave afectación de la función muscular, neuronal y gastrointestinal y cuya esperanza de vida se sitúa en torno a los 37 años<sup>1</sup>. Está causada por mutaciones en el gen nuclear *TYMP*, que codifica la TP. Esta enzima cataliza el primer paso del catabolismo de los nucleósidos dThd y dUrd. En pacientes de MNGIE, en los que la TP no es funcional, se produce una acumulación sistémica de nucleósidos que ejerce un efecto tóxico sobre la replicación y el mantenimiento del mtADN<sup>220</sup>. Por esta razón, las terapias desarrolladas hasta el momento se focalizan en lograr un aclaramiento permanente de las concentraciones de dThd y dUrd.

Pese a que se han propuesto varias aproximaciones terapéuticas basadas tanto en la eliminación de los metabolitos tóxicos<sup>56,82,83</sup> como en el reemplazo enzimático<sup>84-89,92-94,98-100</sup>, sólo el AHSCT<sup>88,89,101</sup> y, más recientemente, el OLT<sup>93,94</sup>, han resultado ser efectivos en la corrección bioquímica a largo plazo. No obstante, no hay que olvidar que en ambos casos se trata de intervenciones agresivas e invasivas sujetas a la disponibilidad de donantes compatibles. Además, el tipo de complicaciones asociadas a estos procedimientos se ven incrementadas en los pacientes de MNGIE debido al estado crítico en el que generalmente se encuentran en el momento del tratamiento.

La sintomatología característica de la enfermedad suele aparecer de forma más evidente después de que el número de moléculas defectivas de mtADN sobrepase un determinado umbral. Por esta razón, y porque ciertos defectos como las mutaciones puntuales somáticas adquiridas o las deleciones múltiples difícilmente serán reversibles tras la normalización de la concentración de nucleósidos, es muy importante iniciar el tratamiento lo antes posible. Sin embargo, a pesar de esta evidencia, existe cierta reticencia por parte de algunos pacientes en cuanto a someterse a una intervención de la envergadura del AHSCT o el OLT cuando aún no se encuentran en estadios avanzados de la patología, ya que la tasa de mortalidad asociada a estos procedimientos oscila entre el 10% y el 40%<sup>91,221</sup>.

La terapia génica resulta una herramienta atractiva como alternativa terapéutica para el tratamiento del MNGIE. Para demostrar su eficacia, en nuestro laboratorio se desarrolló una primera estrategia basada en uso de vectores LV de tercera generación dirigidos al tejido hematopoyético. Esta aproximación fue efectiva desde el punto de vista terapéutico en el modelo murino de la enfermedad<sup>98,99</sup>. No obstante, debido al riesgo de transactivación oncogénica asociado al uso de LV y al riesgo inherente al procedimiento de mieloablación requerido para la realización del trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos *per se*, diseñamos una segunda aproximación basada en el uso de rAAVs<sup>100</sup>. Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que es posible corregir el déficit de TP y normalizar las concentraciones de nucleósidos de forma sistémica mediante el uso de rAAVs de serotipo 8 inyectados por vía intravenosa, que el uso de promotores específicos de hígado resulta mucho más eficiente que el uso de promotores constitutivos y que, de entre todas las construcciones testadas, el AAV-AAT es el que permite obtener mejores resultados a dosis más bajas. No hemos observado efectos adversos o signos evidentes de toxicidad asociados al uso de rAAVs.

### **6.1. Elección del hígado como principal diana terapéutica y diseño de rAAVs.**

La morfología y características propias del hígado hacen de este órgano una diana terapéutica atractiva para el uso de la terapia génica basada en rAAVs, tanto a nivel de facilidad de transducción como a nivel de tolerancia inmunológica<sup>141-143</sup>. Además, una de las principales funciones de este tejido es la de detoxificación de sustancias y metabolitos de la circulación sistémica y éste es, fundamentalmente, el objetivo primordial perseguido por las diferentes estrategias terapéuticas propuestas para el

tratamiento del MNGIE. Adicionalmente, el hígado constituye uno de los tejidos más ricos en actividad TP de manera natural en humanos<sup>20</sup>.

Para llevar a cabo la transducción de los hepatocitos escogimos el AAV8. Las principales razones que nos llevaron a decantarnos por la elección de este serotipo fueron:

- La elevada tasa de transducción del AAV8 en hígado tras inyección intravenosa periférica, que se produce gracias al rápido desensamble de las proteínas de la cápside y al rápido reanillamiento de los genomas víricos para formar moléculas de dsADN<sup>222,223</sup>.
- La baja seroprevalencia de Abs anti-AAV8 en la especie humana (38%) en comparación con la de otros serotipos que presentan eficiencias de transducción similares en este órgano<sup>202</sup>.
- La menor activación de la respuesta inmune mediada por células T citotóxicas asociada al AAV8 debido a su limitada capacidad para transducir macrófagos o células dendríticas presentadoras de antígenos<sup>224</sup> y a la corta persistencia de las proteínas de la capsida en la célula hospedadora<sup>225,226</sup>.
- La efectividad terapéutica y la ausencia de efectos adversos graves observadas en ensayos clínicos previos en otras enfermedades<sup>154</sup>.

Para demostrar la efectividad de la terapia génica basada en AAV8 para el tratamiento del MNGIE, en un primer lugar realizamos un estudio con el vector AAV-TBG, el cual fue construido por el grupo del Dr. Massimo Zeviani (MRC-Mitochondrial Biology Unit, Cambridge, UK) en colaboración con nuestro grupo de investigación. Este vector expresa el cADN del gen *TYMP* bajo la acción del promotor específico de hígado TBG. Además, cuenta con el elemento de regulación post-transcripcional WPRE, el cual permite aumentar la vida media del mRNA transcrito. Los resultados obtenidos con el uso de este vector demostraron que era posible restituir el déficit de TP y corregir las alteraciones bioquímicas en ratones doble KO *Tymp*<sup>-/-</sup>*Upp1*<sup>-/-100</sup>.

En vista de esto y en base a las evidencias que demuestran que el serotipo 8 permite transducir eficientemente otros tejidos<sup>227,228</sup>, decidimos testar cuales eran los efectos producidos por un promotor de expresión constitutiva. Por este motivo llevamos a cabo la construcción del vector AAV-PGK, que expresa el transgén *TYMP* bajo la acción del promotor PGK (disponible en nuestro laboratorio). En este caso fue necesario incorporar también una secuencia no codificante (intrón 3 del gen *TK1*) para aumentar el tamaño del vector y asegurar su correcta encapsidación. Nuestra hipótesis inicial al plantear este estudio proponía que, si realmente lográbamos expresar el transgén en un mayor número de tejidos, podríamos reducir la dosis terapéutica. Sin embargo, a las dosis utilizadas, únicamente logramos expresión del transgén en hígado.

Considerando los resultados obtenidos, decidimos centrarnos en testar dos vectores adicionales que contienen promotores alternativos específicos de hepatocitos. Concretamente, estudiamos el efecto de promotores derivados de la alfa-1-antitripsina humana en un vector de configuración de ssADN, AAV-AAT, y en un vector “*self-complementary*”, scAAV-HLP, ya que, según resultados publicados, la conformación de dsAAV resulta en una expresión más rápida y potente del transgén<sup>229,230</sup>. Cabe destacar que, aunque en ambos casos encontramos la región promotora de la  $\alpha$ -1-antitripsina humana precedida de una región potenciadora derivada de la apolipoproteína E (apoE) humana, la secuencia de ambos promotores no es exactamente la misma debido a la limitación de tamaño de encapsidación de

los scAAVs. El promotor HLP (del inglés “*hybrid liver-specific promoter*”), proporcionado por el grupo del Dr. C Nathwani (University College London Cancer Institute, Londres), es un híbrido sintético de 251 pb formado por 34 pb pertenecientes al núcleo de la secuencia de la región potenciadora apoE más 217 pb del promotor modificado de la  $\alpha$ -1-antitripsina humana<sup>216</sup>. Por el contrario, el tamaño del promotor del vector AAV-AAT, proporcionado por el Dr. Federico Mingozzi (Genethon, Francia), es de 728 pb. Además, en el caso del vector AAV-AAT encontramos una secuencia intrónica de la subunidad  $\beta$ 2 del gen de la hemoglobina humana (441 pb) y la señal de poliadenilación de la subunidad  $\beta$ 2 del gen de la hemoglobina bovina (769 pb). Debido también a la capacidad de clonación, el vector scAAV-HLP no presenta intrones y la señal de poliadenilación corresponde a la de la hormona de crecimiento bovina (212 pb).

## 6.2. Eficiencia de transducción hepática de los diferentes AAV8 tras administración intravenosa periférica.

Para evaluar la eficiencia de transducción de cada una de las construcciones testadas, determinamos el número de copias de *TYMP* por célula diploide en el hígado de los animales tratados mediante qPCR.

Los resultados obtenidos mostraron una fuerte correlación entre la dosis administrada y la tasa de transducción en todos los casos. Además, coincidiendo con lo observado previamente en otros estudios<sup>223</sup>, no observamos saturación en cuanto a la capacidad de transducción del AAV8 en hígado. No obstante, el número de copias determinado fue muy superior al publicado por otros autores<sup>216,223,231</sup>. Aunque no podemos asegurar con exactitud cuál es la razón que explica unos valores tan altos de número de copias, creemos que la causa más probable sería una cuantificación errónea de los calibradores utilizados. Aun así, hemos decidido considerar los resultados obtenidos porque, dado que la metodología y los plásmidos calibradores han sido los mismos para los 4 vectores testados, nos permiten tener una visión comparativa de la eficiencia de transducción de las diferentes construcciones. Dicho esto, el número de copias resultó bastante consistente entre los grupos de animales tratados con los diferentes vectores para una misma dosis. De hecho, únicamente pudimos observar diferencias significativas atribuibles al uso de una u otra construcción en las dosis de  $5 \cdot 10^{10}$  y  $5 \cdot 10^{11}$  gc/kg. No obstante, pudimos detectar ciertas tendencias que podrían estar relacionadas con el método de producción y purificación empleado para la obtención de las diferentes preparaciones y con la configuración génica de cada uno de los AAVs testados.

Uno de los factores más evidentes que pueden influir en el número de copias de transgén determinado es el título vírico de las diferentes producciones, a partir del cual calculamos, posteriormente, el volumen de inyección necesario para administrar las diferentes dosis. Precisamente por esta razón decidimos retitular cada uno de los lotes utilizando un único método común.

Tras valorar las diferentes aproximaciones descritas para la titulación de AAVs, elegimos un protocolo basado en la cuantificación de dsADN mediante métodos fluororimétricos que utilizan agentes intercalantes del ADN. Entre las razones principales que nos llevaron a elegir finalmente esta metodología se encuentran la facilidad, sencillez, rapidez y robustez de la técnica. Además, a diferencia de otras tecnologías como pueden ser las basadas en qPCR o *dot blot*, el método de titulación por *picogreen* descrito por Piedra y colaboradores<sup>191</sup> no está influenciado por la naturaleza de los extremos ITR (ssADN versus dsADN) y permite cuantificar el porcentaje total de ADN no encapsidado. Los resultados obtenidos manifestaron la importancia del método de titulación empleado en la determinación del título final establecido y revelaron la presencia de casi un 50% de ADN no

encapsidado en la producción del AAV-TBG. Este hecho podría explicar la diferencia entre los títulos obtenidos mediante qPCR/dot-blot y el método de cuantificación por picogreen para esta preparación ya que, el título vírico proporcionado por el centro en el cual se llevó a cabo la producción (basado en la cuantificación de ADN total encapsidado y no encapsidado) era 3.5 veces superior al resultado de retitulación.

Tal y como se ha descrito en el *apartado 4.3.1*, todas las producciones se realizaron mediante triple transfección transitoria en células 293T. No obstante, los vectores AAV-TBG y AAV-AAT fueron purificados mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio y los vectores AAV-PGK y scAAV-HLP mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad de iodixanol.

A la dosis común más baja testada ( $2 \cdot 10^{11}$  gc/kg) el número de copias determinado para las construcciones AAV-PGK y scAAV-HLP fue ligeramente superior al de los vectores AAV-TBG y AAV-AAT. Además, a pesar de que las diferencias entre vectores se minimizaban a dosis altas, el número de copias por célula aportado por el vector AAV-PGK resultaba superior al resto en las diferentes dosis de estudio. Este hecho podría deberse a los efectos citotóxicos de residuos de CsCl en las preparaciones víricas TBG y AAT, las cuales presentan, por lo general, mayor cantidad de impurezas que las purificadas por gradiente de densidad con iodixanol<sup>183</sup>. No obstante, no llegan a observarse diferencias significativas en cuanto a la capacidad infectiva de los vectores producidos por ambos métodos.

En el caso del vector scAAV-HLP, la administración de dosis iguales o superiores a  $5 \cdot 10^{11}$  gc/kg disminuyó la eficiencia de transducción en comparación con el vector AAV-PGK, producido en las mismas condiciones. Aunque desconocemos la causa de este hecho, creemos que podría atribuirse, en parte, al desencadenamiento de una mayor respuesta inmunitaria innata vía TLR9 por parte del vector con conformación autocomplementaria<sup>157</sup>. No obstante, no hemos evaluado la respuesta inmune en ninguno de los grupos de estudio. De forma similar, la eficiencia de transducción del vector AAV-TBG resultó ligeramente inferior a la del vector AAV-AAT. Esta diferencia podría deberse a la gran proporción de ADN libre de la preparación TBG, que a su vez puede ir acompañado de un aumento en la cantidad de cápsides vacías. Estas cápsides vacías podrían competir por los receptores celulares del hospedador disminuyendo la eficiencia de transducción<sup>169</sup>. Para reducir al máximo estas diferencias y poder centrarnos únicamente en los efectos producidos por los *cassettes* de expresión, sería necesario realizar todas las producciones víricas en paralelo utilizando la misma metodología de producción y purificación en cada una de ellas.

La dispersión observada en el número de copias de transgén por célula dentro un mismo grupo de ratones tratados con el mismo vector y dosis pueden deberse al hecho de que la cuantificación se realizó a partir de una pequeña cantidad de tejido no homogeneizado previamente. Esto puede contribuir también al hecho de que las diferencias sean más evidentes a dosis más bajas ya que, tal y como mostraron las imágenes obtenidas al realizar inmunohistoquímica en hígado para la detección de la proteína TP, la administración de dosis más altas da lugar a una distribución más homogénea del vector en el tejido diana y permite transducir prácticamente todo el hígado.

Finalmente, dado el tropismo descrito para el serotipo 8, intentamos determinar también la eficiencia de transducción en otros tejidos no hepáticos, concretamente en cerebro, músculo esquelético e intestino delgado. Sin embargo, pese a los esfuerzos realizados tanto en la optimización del método de extracción de ADN (kit comercial *versus* fenol-clorofomo *versus* Hirt) como en la detección del transgén (PCR *versus* qPCR), sólo fuimos capaces de obtener resultados positivos en cerebro en dos

animales tratados con el vector AAV-AAT. Teniendo en cuenta estos resultados, podríamos pensar que las dosis administradas no son suficientes para lograr ampliar la biodistribución del AAV8 cuando éste se inyecta por vía intravenosa periférica. En concordancia con esto, los resultados publicados por Chen y colaboradores<sup>232</sup> tras la inyección de  $7.5 \cdot 10^{12}$  gc/kg del vector AAV8-TBG-hLDLR utilizando la misma vía de administración muestran que, aunque es posible detectar el transgén introducido en prácticamente todos los órganos, la eficiencia de transducción en hígado es de hasta entre 100 y 1000 veces la del resto de tejidos. Esta misma evidencia ha sido también descrita por Wang y colaboradores<sup>233</sup>. A pesar de esto, y aunque las dosis administradas en los estudios mencionados son superiores a las dosis comunes utilizadas en esta tesis, el aumento de actividad TP en cerebro, gastrocnemius e intestino delgado de algunos de los animales tratados con los vectores scAAV-HLP y AAV-AAT confirma la expresión de la enzima en estos tejidos. Esto indica que la falta de detección del gen terapéutico *TYMP* en tejidos no hepáticos se debe a la baja sensibilidad de la metodología utilizada para la detección del ADN introducido y manifiesta que la determinación de la actividad TP es una herramienta más sensible y eficaz a la hora de determinar la biodistribución de los rAAVs administrados.

### 6.3. Restitución de actividad TP en el modelo murino de MNGIE.

El modelo murino de la enfermedad de MNGIE es un doble KO de los genes *Tymp* y *Upp1* ya que, a diferencia de lo que ocurre en humanos, dónde el catabolismo de dThd y dUrd se lleva a cabo únicamente mediante la acción de la enzima timidina fosforilasa, en ratones existe una enzima alternativa denominada uridina fosforilasa (UP) que es capaz de catalizar también la misma reacción. A pesar de que existen dos isoformas, UP1 y UP2, la UP1 es la isoforma mayoritaria.

La eliminación de estos dos genes permitió obtener un modelo animal cuyos rasgos fenotípicos destacables son la acumulación de nucleósidos y la ausencia de actividad TP<sup>68,78</sup>, factores bioquímicos característicos de la enfermedad de MNGIE que permiten el diagnóstico de pacientes<sup>55</sup>. Al margen de esto, no hemos sido capaces de detectar otros rasgos clínicos típicos como son la leucoencefalopatía, la pérdida de peso, la neuropatía periférica o la afectación del músculo esquelético. Estas diferencias suponen una limitación a la hora de determinar de qué forma podría contribuir el tratamiento propuesto a la mejoría del estado clínico de los pacientes. No obstante, las evidencias de mejora de la sintomatología descritas previamente en otros pacientes tratados con AHST<sup>88,89,101</sup> o OLT<sup>93,94</sup> en los que se ha detectado reducción de la concentración de nucleósidos, inducen a una mantener una visión optimista.

La administración de una única inyección por vía intravenosa de los diferentes vectores AAV8 descritos permitió un aumento en los niveles de actividad TP en hígado. Este parámetro correlacionó fuertemente con el número de copias de transgén en hígado, con la cantidad de proteína y con la dosis utilizada. No obstante, pudimos observar diferencias entre los grupos de animales en función del vector y la dosis administrada. Concretamente, los valores de actividad TP determinados en hígado de animales tratados con vectores que expresaban el cADN de *TYMP* bajo la acción de promotores específicos de tejido (TBG, HLP y AAT), fueron entre 13 y 34 veces superiores a los alcanzados con el vector de expresión constitutiva (PGK), el cuál únicamente permitió obtener valores iguales o superiores a los de los animales WT en el 23.8% de los casos. Por el contrario, entre el 90% y el 100% de los ratones tratados con dosis iguales o superiores a  $2 \cdot 10^{11}$  gc/kg de los vectores TBG, HLP y AAT restituyeron los niveles normales de actividad TP en hígado. Además, los niveles de actividad TP a dosis

superiores a  $2 \cdot 10^{12}$  gc/kg del vector AAT llegaron a ser hasta 60 veces superiores a los determinados en animales WT. Estos valores tan elevados de actividad TP podrían suponer un problema a la hora de trasladar la estrategia propuesta a la práctica clínica para proceder al tratamiento de pacientes, ya que la sobreexpresión de la enzima podría comportar el desencadenamiento de respuestas inmunitarias más graves contra la proteína sintetizada. No obstante, hay que tener en cuenta que la eficiencia de transducción del AAV8 en hígado murino es 20 veces superior a la del hígado humano in vivo<sup>234,235</sup>. Por esta razón, y aunque estudios recientes han demostrado que es posible aplicar ciertas estrategias como, por ejemplo, la incubación de la preparación vírica con albúmina sérica humana antes de ser inyectada para aumentar la eficiencia de transducción<sup>236</sup>, es probable que el tratamiento en humanos requiera de dosis más elevadas para lograr el efecto observado en ratones doble KO.

Aunque es evidente la superioridad en términos de eficacia y eficiencia de los vectores de expresión dirigida, también pudimos observar diferencias entre ellos. Los vectores TBG y AAT resultaron más eficientes que el vector HLP por lo que refiere al aporte de actividad TP en el tejido hepático. A la dosis más alta común administrada ( $2 \cdot 10^{12}$  gc/kg), los niveles de actividad TP de los vectores TBG y AAT fueron prácticamente idénticos (2148 y 2538 nmoles Thy/h·mg proteína, respectivamente) y 2.4 veces más elevados a los conseguidos con el vector HLP (972 nmoles Thy/h·mg proteína). Debido a que no se observaron diferencias significativas en el número de copias determinado para estos vectores a la dosis más alta común testada, no podemos atribuir la diferencia de actividad TP a una menor estabilidad del vector sAAV-HLP. Además, los datos de actividad TP/copia, indican que éstas diferencias se atribuyen a la potencia de los diferentes vectores ya que, mientras que la actividad por copia de los vectores TBG y AAT fue de entre 200-300 nmoles Thy/h·mg proteína·copia, la potencia del promotor HLP fue de 66 nmoles Thy/h·mg proteína·copia. A pesar de las diferencias observadas, la evolución de la potencia del promotor en función de la dosis administrada mostró un mismo patrón para los vectores TBG, HLP y AAT. Coincidiendo con lo publicado en otros estudios preclínicos<sup>216,231</sup>, pudimos observar que, aunque la actividad TP/copia aumenta a las dosis más bajas, ésta llega a un valor máximo y a partir de aquí decae a medida que aumenta la dosis administrada. Tal y como se ha hipotetizado en los ejemplos mencionados, esto podría deberse a la saturación de la maquinaria involucrada en la expresión del transgén o al fenómeno epigenético conocido como RIGS (del inglés "*repeat-induced gene silencing*"). Adicionalmente, y a pesar de que los efectos del tratamiento con los vectores AAV-TBG y AAV-AAT fueron muy similares a dosis superiores a  $2 \cdot 10^{11}$  gc/kg, a la dosis de  $5 \cdot 10^{10}$  gc/kg (testada únicamente con estas dos construcciones), el vector AAV-AAT resultó ser más efectivo.

Al margen del hígado, estudiamos también el efecto en el aporte de actividad TP en los principales tejidos afectados en los pacientes de MNGIE: cerebro, músculo esquelético e intestino delgado. Los resultados obtenidos mostraron que el promotor TBG restringía su expresión al hígado, ya que únicamente detectamos un animal con valores de actividad TP anormalmente elevados en músculo esquelético. Sin embargo, en el caso de los vectores HLP y, principalmente, AAT, se produjo actividad TP en el resto de tejidos analizados. Concretamente en cerebro, el vector AAT fue capaz de proporcionar una actividad TP igual o superior a la de los animales WT (10 nmoles Thy/h·mg proteína) en el 50% de los animales tratados, de forma dependiente de la dosis. De manera similar, el 52% de los animales tratados con el vector AAT presentó un aumento de la actividad TP en músculo esquelético. Al igual que en humanos, el músculo esquelético es un tejido con muy baja actividad TP en animales WT (1.4 nmoles Thy/h·mg proteína) y existe cierto solapamiento entre los valores de actividad de animales WT y doble KO no tratados. Aun así, el aumento de actividad TP en músculo fue anormalmente alto en 3 de los 52 animales tratados con el vector AAT. Paralelamente, aunque no se

llegaron a alcanzar valores de WT en ningún caso, también pudimos detectar un aumento de la actividad TP en intestino delgado de forma dependiente de la dosis.

Pese que *a priori* consideramos que la expresión del promotor AAT utilizado era específica y estaba restringida al hígado, éste presentó actividad residual en otros órganos. Esta observación concuerda con otras publicadas previamente en las que se describe que, aunque la transcripción endógena de  $\alpha$ -1-antitripsina se da de manera más abundante en hígado, también se produce en otros tejidos como el riñón, el tracto gastrointestinal (estómago e intestino delgado), el páncreas, el cerebro, las glándulas adrenales, los testículos, los monocitos y los macrófagos específicos de tejido<sup>237-239</sup>. Este hecho podría tener posibles efectos adversos a nivel clínico ya que, una de las principales ventajas del hígado como diana terapéutica es el ambiente tolerogénico proporcionado por este órgano sobre todo frente al producto del transgén introducido. La transducción y expresión del transgén en otros tejidos como por ejemplo el músculo esquelético, puede desencadenar una mayor activación del sistema inmunitario, tal y como se ha podido observar en ensayos clínicos basados en el uso de AAV para el tratamiento de otras enfermedades<sup>240</sup>. No obstante, la respuesta inmunitaria puede variar en función de la vía de administración y, aunque es posible que tras una inyección local de rAAV en músculo esquelético aumente la expresión de moléculas MHC de clase I presentadoras de antígenos debido a un incremento de la producción de interferón causado por células inflamatorias, esto puede no ser así tras una inyección intravenosa ya que, por lo general, la expresión de MHC de clase I en células musculares es baja<sup>241</sup>. Otros ensayos clínicos realizados en pacientes con déficit de  $\alpha$ -1-antitripsina o de lipoproteína lipasa mediante inyección intramuscular con AAV1, han revelado que, al margen de la activación de una respuesta celular mediada por células T citotóxicas, también puede desencadenarse la activación de una respuesta mediada por células T reguladoras que inducen mecanismos de tolerancia y ayudan a mantener una expresión sostenida del transgén a más largo plazo<sup>242,243</sup>.

Sorprendentemente, no observamos aumento de la actividad TP en cerebro, músculo esquelético o intestino delgado en ninguno de los animales tratados con el vector PGK a pesar de tratarse de un promotor de expresión constitutiva. Dado que únicamente valoramos la actividad TP 34 semanas después de la administración y que no estudiamos la respuesta inmune en los animales tratados, desconocemos si este hecho se debe a una baja potencia del promotor PGK en los tejidos estudiados o a una decaída en los niveles de expresión del transgén debido a la inducción de una respuesta inmunológica de carácter sistémico. No obstante, dado que el número de copias determinado en hígado para este vector es superior al resto, y que pudimos detectar actividad TP en estos tejidos en ratones tratados con los vectores HLP y AAT, la primera opción parecería la más probable.

A diferencia del hígado, la actividad TP determinada en cerebro, músculo esquelético e intestino delgado no correlacionó con la cantidad de proteína en ningún caso. Esto podría explicarse por el tropismo preferencial del AAV8 por el tejido hepático. Teniendo en cuenta los niveles de transducción de este serotipo en hígado en comparación con el resto de órganos<sup>232,233</sup> y, dado que tanto la determinación de la actividad TP como la detección de la enzima mediante WB se han realizado a partir de pequeños trozos de tejido, es normal que exista mayor correlación en un tejido con una tasa de transducción más elevada, ya que ésta será también más uniforme y homogénea. Por lo tanto, el hecho de que hayamos sido capaces de detectar actividad TP y no proteína en tejidos no hepáticos podría explicarse por la cantidad de muestra requerida para cada una de las técnicas (150 mg en el caso de la actividad *versus* 20 mg en el caso del WB) puesto que, si la transducción se da con una eficiencia muy



baja y de forma heterogénea, cuanto más pequeña sea la porción de tejido analizado, más difícil será tener una muestra representativa del nivel de transducción real del tejido.

#### 6.4. Reducción de la concentración de nucleósidos en el modelo doble KO.

En pacientes de MNGIE típicos, la concentración de dThd y dUrd en plasma es entre 100 y 500 veces superior a la de los individuos sanos (2-25  $\mu\text{M}$  frente a menos de 0.05  $\mu\text{M}$  en personas no afectas<sup>55,56</sup>). Por el contrario, los ratones doble KO presentan concentraciones de nucleósidos en plasma que son entre 3 y 4 veces las de los ratones WT (dThd KO=9.4  $\mu\text{M}$ ; dThd WT=2.9  $\mu\text{M}$ ). Esto, sumado a la corta esperanza de vida de los roedores en comparación a la de la especie humana, podría ser uno de los factores contribuyentes a la ausencia de la presentación de un fenotipo clínico más acusado en el modelo murino de la enfermedad. De hecho, los resultados publicados por García-Díaz y colaboradores mostraron que el tratamiento crónico de ratones doble KO con sobrecarga de nucleósidos aumenta la concentración sistémica de dThd y dUrd y permite acentuar algunos de los rasgos clínicos propios de la enfermedad en el modelo murino *Tymp<sup>-/-</sup>Upp1<sup>-/-</sup>* a edades avanzadas<sup>80</sup>. Los resultados obtenidos tras la administración de los diferentes rAAVs mostraron que los animales que presentaban aumento en la actividad TP en hígado, reducían la concentración de nucleósidos en plasma hasta valores iguales o inferiores a los de los animales WT. No obstante, pudimos observar diferencias en cuanto a la efectividad y al tiempo necesario para lograr efecto terapéutico en función del vector utilizado en cada caso.

Tras la administración del vector TBG, una semana fue suficiente para normalizar la concentración de nucleósidos en plasma en el 83.3% de los animales tratados con una dosis de  $2 \cdot 10^{11}$  gc/kg. A esta misma dosis, el 100% de los animales tratados con el vector AAT redujo la concentración de nucleósidos hasta concentraciones incluso inferiores a las de los animales WT en el mismo periodo de tiempo. Sin embargo, en los animales tratados con el vector HLP sólo el 55.6% normalizó la concentración de dThd y dUrd en plasma tras la administración de  $2 \cdot 10^{11}$  gc/kg al cabo de una semana. Estos resultados entran en contradicción con los descritos en otros ensayos en los que se ha podido observar que el uso de vectores con conformación autocomplementaria induce a una expresión más rápida y potente del transgén<sup>229</sup>. No obstante, según datos recientes publicados por Bell y colaboradores, el efecto positivo del uso de scAAV frente a ssAAV puede depender del transgén y de la dosis utilizada<sup>155</sup>. Otra posible explicación podría ser el desarrollo de una mayor respuesta inmunitaria frente a los vectores scAAV o el hecho de que los elementos que componen el *cassette* de expresión de los vectores HLP y AAT no sean exactamente los mismos en ambos casos ya que, debido a la limitación de tamaño del genoma de los scAAV, se ha utilizado una versión reducida del promotor y no ha sido posible incorporar secuencias intrónicas. En cualquier caso, el efecto terapéutico se produjo en el 100% de los animales tratados con el vector HLP a esta misma dosis 3 semanas más tarde. Por el contrario, los animales que recibieron una dosis de  $2 \cdot 10^{11}$  gc/kg del vector PGK no consiguieron normalizar la concentración de nucleósidos en plasma en dicho periodo temporal y fueron necesarias 4 semanas y  $5 \cdot 10^{11}$  gc/kg para lograr un efecto terapéutico en el 100% de los animales administrados.

De forma similar a lo que observamos al evaluar la actividad TP en hígado, a pesar de que el comportamiento de los vectores TBG y AAT era similar a dosis altas, pudimos ver diferencias significativas en cuanto a la efectividad en la reducción de la concentración de dThd cuando administramos una dosis de  $5 \cdot 10^{10}$  gc/kg. Concretamente, mientras que el 100% de los animales tratados con el vector AAT logró normalizar la concentración de nucleósidos en plasma en una semana

y mantuvo los efectos hasta el final del tratamiento, esto sólo ocurrió en el 50% de los ratones tratados con el vector TBG.

Para estudiar si la reducción en la concentración de nucleósidos se producía también a largo plazo en los diferentes tejidos estudiados y si existía cierta dependencia entre los niveles de dThd y dUrd y la actividad proporcionada para un mismo tejido, decidimos determinar la concentración de nucleósidos también en hígado, cerebro, músculo esquelético e intestino delgado.

Por lo general, la concentración de nucleósidos en hígado mostró un reflejo de lo observado previamente en plasma. Los animales doble KO no tratados presentaron valores de dThd de hasta 5 veces los de los animales WT. Sin embargo, estas concentraciones se redujeron hasta niveles de WT e incluso inferiores en la mayoría de los casos después del tratamiento con AAVs. Además, observamos correlación entre la concentración de nucleósidos en hígado y la actividad TP en este tejido para los vectores TBG, HLP y AAT. Más concretamente, los resultados obtenidos con el vector TBG mostraron normalización de dThd y dUrd en el 78.9% de los casos (coincidiendo exactamente con lo observado en plasma). El porcentaje aumentó hasta el 100% tras la administración de los vectores HLP y AAT. El uso del vector de expresión constitutiva permitió normalizar el exceso de nucleósidos en el 71.4% de los animales tratados. A partir de estos datos observamos que para lograr un efecto terapéutico a nivel de reducción de la concentración de los metabolitos tóxicos no es necesario restituir completamente la actividad TP propia del tejido en condiciones normales ya que, en todos los casos, pudimos observar que animales que no lograban alcanzar niveles WT de actividad TP en hígado reducían la concentración de dThd y dUrd. Este hecho concuerda con lo observado en portadores heterocigotos humanos, los cuales no presentan acumulación detectable de nucleósidos ni síntomas de la enfermedad a pesar de que la actividad TP representa únicamente entre el 30% y el 50% de la actividad TP típica de individuos sanos<sup>55</sup>.

Tras 34 semanas de tratamiento con los vectores AAV pudimos ver que, salvo en casos puntuales, se producía también una disminución de la concentración de nucleósidos en cerebro hasta valores iguales o inferiores a los del rango WT independientemente de que se hubiera producido o no un aumento en la actividad TP en este órgano, gracias a la actividad TP proporcionada por el hígado. De hecho, en los animales tratados con los vectores TBG y PGK observamos correlación entre la cantidad de dThd en cerebro y la actividad TP hepática. No obstante, la reducción observada era menos acusada que en el tejido diana en todos los casos. Esto mismo ocurría en músculo esquelético, donde también se produjo correlación entre el nivel de reducción de nucleósidos y el incremento de actividad TP en hígado en los animales tratados con los vectores AAV-TBG, AAV-PGK y AAV-AAT. En los ratones administrados con el vector AAT, la concentración de nucleósidos en cerebro y músculo correlacionó también con el incremento de actividad TP propia de cada tejido.

El efecto terapéutico en intestino delgado resultó menos evidente ya que, a pesar de los elevados niveles de actividad TP conseguidos en hígado, sólo el 15.8% de los animales tratados con el vector TBG fue capaz de normalizar los niveles de nucleósidos en este órgano. El porcentaje de éxito se redujo hasta el 9.5% en el caso del vector PGK. Los vectores HLP y AAT, en cambio, lograron un efecto terapéutico en aproximadamente el 50% de los ratones (45.7 y 53.8% respectivamente), lo que supone una diferencia significativa en comparación a los vectores TBG y PGK. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente tras el tratamiento de ratones doble KO con vectores LV ya que, el aporte de actividad TP en progenitores hematopoyéticos también permitió reducir la concentración de dThd

y dUrd en plasma, hígado, cerebro y músculo esquelético pero no en intestino delgado<sup>98</sup>. Así pues, resulta evidente que la eficacia del tratamiento en este tejido se ve drásticamente reducida y que, dado que el intestino delgado es uno de los órganos más afectados en MNGIE en humanos, esto supone una limitación para el tratamiento de pacientes.

Si comparamos la diferencia de concentración de dThd existente entre animales doble KO no tratados y animales WT en cada caso vemos que, mientras que en cerebro y músculo esquelético el incremento en los ratones MNGIE es de 2.3 y 2.7 veces respectivamente, el intestino delgado presenta una acumulación de 4.4 veces la de los animales WT. Este hecho podría deberse en parte a la absorción de nucleósidos procedentes de la dieta, lo que contribuiría a un mayor aumento de la concentración de dThd y dUrd en el lumen intestinal dificultando el aclarado de los mismos. No obstante, para poder entender cuál es la razón que realmente limita el aclarado de los metabolitos tóxicos a nivel intestinal, resultaría interesante estudiar la expresión y distribución de los transportadores de nucleósidos en éste tejido.

En cualquier caso, a excepción del intestino delgado, pudimos observar que el aporte de actividad TP al tejido hepático es suficiente para lograr reducir la concentración de nucleósidos a nivel sistémico. Esto coincide con resultados preclínicos observados previamente en otras enfermedades causadas por la acumulación de metabolitos tóxicos como, por ejemplo, la encefalopatía etilmalónica<sup>244</sup>.

### **6.5. Efecto del tratamiento sobre el pool de dNTPs mitocondriales.**

Las deficiencias en la replicación y el mantenimiento del mtADN que presentan los pacientes de MNGIE se deben a un desbalance en el pool de dNTPs mitocondriales originado como consecuencia de la acumulación sistémica de dThd y dUrd. En los tejidos quiescentes cuyas mitocondrias utilizan la vía de salvamento como fuente principal de dNTPs, el exceso de dThd se traduce en un aumento de dTTP. Al mismo tiempo, dado que el primer paso de fosforilación del nucleósido se produce a través de la enzima TK2 y ésta es común a la fosforilación de dCtd, se establece una inhibición competitiva que comporta una disminución del pool de dCTP mitocondrial<sup>66-70</sup>. Este desequilibrio afecta a la correcta replicación del mtADN y provoca depleción, deleciones múltiples y mutaciones puntuales somáticas que comprometen la función mitocondrial. Por esta razón, con el fin de evaluar si la reducción sistémica de la concentración de nucleósidos lograda tras la administración de los diferentes vectores puede tener un efecto preventivo sobre los daños ocasionados en el mtADN, hemos estudiado el pool de los diferentes dNTPs mitocondriales y el número de copias de mtADN en hígado.

Tal y como se ha comentado anteriormente en el *apartado 5.4.4*, el método utilizado para la medida de dNTPs presenta ciertas limitaciones, sobre todo por lo que refiere a la sensibilidad de detección de concentraciones bajas de dTTP (límite de detección 0.8 pmoles/mg proteína) y dATP (imposible de determinar) y a la dispersión de los resultados obtenidos. No obstante, a pesar de que en muchos casos los valores se sitúan por debajo de nuestro límite de detección, la técnica nos permite tener una visión comparativa del efecto producido por los diferentes rAAVs en el pool de dNTP mitocondriales.

Los cambios realizados en el protocolo de determinación de nucleótidos nos permitieron observar, por primera vez, un incremento significativo de dTTP mitocondrial hepático en los animales doble KO sin tratar, en comparación con WT no tratados de la misma edad. Sin embargo, no fuimos capaces de detectar depleción en los niveles de dCTP. Aunque desconocemos la causa de estas diferencias,

pensamos que quizás el método antiguo podía estar interferido por la incorporación inespecífica de ribonucleótidos.

Tras la administración de los diferentes vectores pudimos observar que la reducción de la concentración de dThd implicaba una disminución drástica de la concentración de dTTP mitocondrial. De hecho, observamos correlación positiva entre la concentración de dThd y dTTP mitocondrial en hígado en todos los casos a excepción de los animales tratados con el vector AAT, debido a la sobrerreducción provocada incluso a las dosis más bajas. Al margen de esto, pudimos comprobar que la disminución de la concentración de dTTP ocasionaba un aumento del pool de dCTP.

Aunque resulta necesario corroborar también cuales son los efectos en la concentración de dNTPs mitocondriales en el resto de tejidos afectados, los resultados en hígado manifestaron que la reducción de la concentración de nucleósidos ejerce un efecto directo sobre la modulación del pool de dNTPs mitocondriales y que es posible revertir, al menos bioquímicamente, la causa patogénica de la enfermedad. Sin embargo, en vista de los valores obtenidos, es inevitable la creación de cierta preocupación en relación a cuáles pueden ser los efectos de la sobrerreducción de dTTP ya que, en caso de que esto ocurriera, podríamos establecer un nuevo desbalance del pool de dNTPs en sentido inverso.

Si queremos evitar que esto suceda es indispensable ajustar adecuadamente la dosis administrada en futuros ensayos clínicos. Para ello, es importante tener en cuenta que la diferencia de concentración de dThd y dUrd existente entre pacientes de MNGIE e individuos sanos y entre ratones doble KO y WT oscilan entre 100-500 veces y entre 4-5 veces, respectivamente. Por otro lado, tal y como se ha discutido anteriormente, la eficiencia de transducción del AAV8 en hígado murino es 20 veces superior a la del hígado humano *in vivo*<sup>234,235</sup>. Así pues, dado que el margen terapéutico en humanos es mucho más amplio y que resultará necesario administrar dosis más elevadas para lograr el efecto observado en ratones doble KO, resulta difícil pensar que pueda llegarse a producir una reducción tan drástica de la concentración de dThd y dTTP mitocondrial.

Al margen de lo expuesto, los datos obtenidos también mostraron que había una afectación a nivel de concentración de dGTP mitocondrial. Desconocemos cuál puede ser la causa de este efecto ya que, mientras que en el caso del vector TBG se produjo una tendencia de aumento que correlacionaba positivamente con la concentración de dCTP, los vectores HLP y AAT provocaron una reducción significativa de la concentración de dGTP en comparación a los animales doble KO no tratados, que correlacionó negativamente con la concentración de dCTP y la dosis administrada en ambos casos. Aunque es difícil explicar la base del mecanismo de regulación subyacente y, aunque la dispersión de los resultados obtenidos tampoco permite obtener conclusiones claras, resulta evidente que existe una relación entre el pool de dTTP y el pool de dGTP mitocondrial.

Estudios paralelos no publicados realizados en el laboratorio, mostraron que el tratamiento de animales doble KO con sobrecarga de dThd y dUrd a largo plazo produce un aumento más acusado de la concentración de dTTP mitocondrial. Paralelamente, el tratamiento se asocia a una depleción más evidente en la concentración de dCTP y a un aumento en los niveles de dGTP. Este efecto concordaría con el producido por el tratamiento con los vectores AAT y HLP. Por este motivo creemos que las diferencias sobre el pool de dGTP mitocondrial producidas por los diferentes vectores podrían estar relacionadas con el efecto que éstos tienen a nivel sistémico ya que, mientras que en el caso de los vectores TBG y PGK la actividad TP se restringió sólo al hígado, los vectores HLP y AAT dieron lugar a

expresión de la proteína terapéutica en otros tejidos. Para comprobarlo, sería necesario determinar de qué manera afecta el tratamiento con los diferentes AAVs no sólo al pool de dNTPs mitocondriales en hígado sino también en otros tejidos.

A pesar de la modulación del pool de dNTPs mitocondriales, no hemos observado un aumento en el número de copias de mtADN en hígado. No obstante, el ratón doble KO no tratado no presenta depleción del mtADN en este tejido y el número de copias determinado no difiere del de los animales WT. Esto indica que el ratón doble KO no es un buen modelo para evaluar esta variable ya que, dada la falta de fenotipo del modelo murino, no podemos determinar cuál es el efecto producido por el tratamiento en relación a este parámetro. Aun así, podría suceder que aunque las diferencias en las concentraciones de dNTPs mitocondriales del ratón MNGIE respecto a animales WT no fueran suficientes para provocar un defecto en la replicación del mtADN, éste pudiera producirse como consecuencia de los efectos del tratamiento. No obstante, no sólo no vimos ningún tipo de respuesta positiva, sino que tampoco observamos una disminución del número de copias de mtADN asociada a la sobrerreducción de la concentración de dTTP. Sin embargo, sería de esperar que en pacientes de MNGIE la restauración del equilibrio del pool de dNTPs mitocondriales supusiera un aumento en el número de copias de mtADN en hígado, que es uno de los tejidos especialmente afectados por el fenómeno de depleción<sup>73</sup>.

## **6.6. Valoración de los posibles efectos adversos derivados del uso de AAVs.**

Con el fin de detectar posibles anomalías o efectos adversos asociados al uso de vectores AAV, realizamos un seguimiento del peso y la actividad ALT en plasma a lo largo de todo el tratamiento.

Contrariamente a lo que ocurre en pacientes de MNGIE, el modelo murino de la enfermedad no presenta alteración de la función gastrointestinal y no existen diferencias de peso entre doble KO y WT no tratados<sup>68,78</sup>. Por lo que refiere al peso y a la curva de crecimiento, no observamos diferencias entre los animales tratados y los animales doble KO sin tratar. Tampoco detectamos manifestaciones externas asociadas a la afectación del bienestar de los animales (cambios en el pelaje, desarrollo de cifosis o aparición de signos evidentes de estrés, tales como estereotipias o conductas anómalas).

El aumento en los niveles de transaminasas en plasma forma parte del conjunto de síntomas asociados a evidencias de lesión hepatocelular. Aunque en la práctica clínica suelen evaluarse los valores de aspartato-aminotransferasa y ALT, la ALT es más específica de daño hepático<sup>245</sup>.

Tras la administración de los diferentes vectores, podría producirse una afectación de la función hepática debido, principalmente, a la gran carga viral dirigida a este órgano o al desarrollo de una respuesta inmunitaria contra la cápside, el ADN introducido o el producto del transgén. Sin embargo, sólo el 7.1% del total de animales tratados con dosis iguales o inferiores a  $2 \cdot 10^{12}$  gc/kg con los vectores TBG, HLP y AAT presentaron valores de ALT anormalmente altos de forma puntual en algún momento después de la administración. Los valores de ALT retornaron a nivel basal en todos los casos al final del tiempo de monitorización. Por el contrario, en animales tratados con el vector AAV-AAT a dosis más altas pudimos ver que el porcentaje de animales con aumento de ALT ascendía al 66.7%. Esto refleja la importancia de ajustar correctamente la dosis administrada en caso de desarrollar posteriores ensayos clínicos en humanos ya que, aunque en ensayos clínicos realizados para el tratamiento de otras enfermedades se ha observado que el aumento de los niveles de transaminasas puede solventarse administrando temporalmente dosis elevadas de esteroides sin dejar secuelas

adicionales<sup>154</sup>, el compromiso de la función hepática es un síntoma presente en algunos pacientes de MNGIE<sup>246</sup>. Por esta razón, en casos de pacientes con enfermedad hepática desarrollada, el tratamiento con AAV8 no sería recomendable y la mejor opción sería el OLT.

El análisis histológico del hígado mediante tinción por hematoxilina-eosina, no reveló ningún tipo de alteración morfológica en los ratones tratados a las diferentes dosis. Tampoco detectamos infiltrados celulares indicativos de inflamación ni aumento en la incidencia de tumores, ni en hígado ni en ningún otro órgano a nivel macroscópico. En relación a esto, cabe destacar que, aunque existen varios ejemplos de estudios preclínicos en los que se ha observado que el tratamiento con AAV está relacionado con un aumento en la incidencia de HCC<sup>144,147,150–152,247</sup>, esto ocurre mayoritariamente cuando se inyectan dosis elevadas de vector en ratones neonatos en los que el hígado tiene una mayor tasa replicativa. Además de la edad, se ha demostrado que el uso de unas u otras secuencias promotoras también es un factor importante a tener en cuenta debido a la capacidad de transactivación génica de cada una de ellas en caso de integración cromosómica. Concretamente, el uso de ciertos promotores comúnmente utilizados tales como CMV (promotor de citomegalovirus), CBA (promotor de la  $\beta$ -actina de pollo) o TBG, presentan un peor pronóstico que el uso del promotor AAT<sup>152</sup>. De hecho, en cuanto al uso de la combinación ApoE/AAT en ratones adultos, sólo un estudio ha constatado aumento de la incidencia de HCC tras la administración intravenosa de  $2 \cdot 10^{10}$  gc/ratón (equivalente a  $8 \cdot 10^{11}$  gc/kg suponiendo un peso medio por ratón de 25 g) de un AAV de serotipo 8 codificante para el factor IX de coagulación con la mutación Padua<sup>149</sup>. Teniendo en cuenta estos datos, sería interesante realizar estudios a más largo plazo para poder detectar si el uso del promotor TBG aumenta la incidencia de HCC en comparación al promotor AAT.

### 6.7. Perspectivas del uso de la terapia génica en pacientes de MNGIE.

A pesar de las limitaciones del modelo murino utilizado para comprobar la eficacia de la terapia génica basada en el uso de rAAV8 para el tratamiento del MNGIE, la caracterización de los animales tratados 34 semanas después de la inyección nos ha permitido observar que el tratamiento con los diferentes vectores propuestos en animales doble KO *Tymp<sup>-/-</sup>Upp1<sup>-/-</sup>* produce un aporte de actividad TP en hígado y que, gracias a esto, es posible reducir la concentración sistémica de nucleósidos y modular el pool de dNTPs mitocondriales en hígado. Además, salvo en el caso de dos animales, los efectos de la terapia con los diferentes vectores y dosis se han mantenido, al menos, durante 8 meses. No obstante, la efectividad del tratamiento debe ser confirmada en pacientes en ensayos clínicos.

El uso de la terapia génica basada en AAV dirigidos al hígado resulta en una alternativa atractiva y prometedora que permitiría superar la mayoría de las limitaciones del AHST: dificultad de encontrar donantes histocompatibles, riesgos de toxicidad asociados al régimen de acondicionamiento o al uso de drogas inmunosupresoras o la enfermedad del injerto contra el huésped. Además, esta aproximación podría suponer también una reducción de los costes asociados a la enfermedad a nivel económico y social, ya que mientras que la inyección intravenosa de AAV8 es un proceso no invasivo que podría comportar una hospitalización de aproximadamente 48 horas, el AHST o el OLT requieren hospitalizaciones más largas en áreas mucho más restringidas, controladas y especializadas. Adicionalmente, la demostración de la eficacia y la seguridad de esta opción terapéutica para el tratamiento del MNGIE podría animar al desarrollo de estrategias similares para otras enfermedades monogénicas causadas por la acumulación sistémica de metabolitos tóxicos y podría ayudar a la

divulgación y el conocimiento de una enfermedad que, hoy en día, sigue siendo aún una gran desconocida para muchos clínicos.

Al margen de las ventajas expuestas, también existen ciertas limitaciones que deben tenerse en cuenta a la hora de llevar esta estrategia a la práctica clínica. Entre ellas, una de las principales dudas que se nos plantea es cuánto tiempo se mantendrían los efectos terapéuticos en pacientes en caso de que el tratamiento resultara eficaz, si sería necesaria o no una segunda administración y cuáles podrían ser los principales efectos adversos derivados si así fuera. La experiencia ganada a través de los diferentes ensayos clínicos desarrollados hasta la fecha ha demostrado que la transducción del hígado con AAV de serotipo 8 resulta en una expresión del transgén a largo plazo también en la especie humana. De hecho, estudios realizados en pacientes de hemofilia B han descrito que es posible mantener la eficacia terapéutica al menos durante 4 años<sup>154</sup>. No obstante, dada la capacidad no integrativa de los vectores AAV y la esperanza de vida humana, el efecto terapéutico podría verse diluido con el paso del tiempo. Por este motivo, y a pesar de que en hepatocitos adultos la tasa de regeneración en condiciones normales es baja<sup>141</sup>, es necesario pensar en una posible solución futura.

Tal y como se ha comentado anteriormente, la administración de un determinado serotipo de AAV comporta un aumento en el título de anticuerpos dirigidos contra la cápside vírica y contra el producto del transgén<sup>201</sup> y la activación de la respuesta inmune mediada por células T citotóxicas<sup>248</sup>. Por este motivo no resultaría posible la readministración de los pacientes con el mismo vector. Además, hay que tener en cuenta que, debido a la homología y conservación que presentan las proteínas que conforman la cápside de los diferentes serotipos, existe reactividad cruzada entre ellos<sup>202</sup> y, por lo tanto, tampoco sería conveniente la inyección de serotipos estrechamente relacionados.

Una posible estrategia delante de esta situación sería la administración del constructo en cápsides de serotipo 5, el cual ha demostrado ser eficaz en la transducción de hepatocitos<sup>249</sup>. La prevalencia de anticuerpos anti-AAV5 preexistentes en la especie humana es similar a la del AAV8 (40%)<sup>202</sup> y estudios preclínicos realizados en primates no humanos han demostrado que la preexistencia de anticuerpos anti-AAV8 no afecta a la posterior administración de AAV5 por inyección intravenosa periférica<sup>226</sup>, probablemente a causa de la mayor divergencia filogenética del AAV5<sup>250</sup>. Cabe destacar que este serotipo se ha utilizado ya en ensayos clínicos dirigidos al hígado en pacientes de porfiria, hemofilia A y hemofilia B<sup>251-253</sup>. Alternativamente podría utilizarse también el serotipo 3 (y sus derivados AAV3B, AAV3-ST y rAAV-LK03), ya que estudios recientes muestran que éste resulta hasta 8 veces más eficiente que el AAV8 en la transducción de hepatocitos humanos<sup>234,235,254</sup>. No obstante, dado que hasta ahora se había prestado poca atención a este serotipo a causa de los bajos niveles de transducción en hígado de ratón en comparación con el AAV8, no existen demasiados datos acerca de la efectividad y seroprevalencia preexistente del AAV3 en la especie humana<sup>255,256</sup>. Por estos motivos, resulta imprescindible la previa demostración de la efectividad, la biodistribución y la toxicidad de estos posibles serotipos alternativos a nivel preclínico.

Estudios realizados por McIntosh y colaboradores han demostrado que la administración simultánea de  $2 \cdot 10^{12}$  gc/kg de un vector AAV8 con anticuerpo anti-CD4 no deplecionante y ciclosporina A permite reducir hasta 20 veces el título resultante de anticuerpos anti-AAV8. La atenuación de la respuesta inmunitaria ha permitido realizar una segunda inyección utilizando el mismo serotipo de manera exitosa<sup>257</sup>. Más recientemente, Velázquez y colaboradores han demostrado que es posible inducir una depleción de entre el 85% y el 93% de los niveles preexistentes de anticuerpos anti-AAV9 tras 8

semanas de tratamiento con rapamicina y prednisolona<sup>258</sup>. Estos datos abren la puerta al desarrollo de nuevas estrategias que permiten superar los obstáculos que pone el sistema inmunitario ante la aplicación de la terapia génica en la práctica clínica. Por un lado, nos ayudan a estar un paso más cerca de poder conseguir terapias más efectivas a largo plazo. Por otro lado, hace de éstas aproximaciones herramientas de amplio espectro no necesariamente restringidas a pacientes con títulos bajos de nAbs preexistentes. No obstante, estos resultados son aún muy preliminares y necesitan ser corroborados en ensayos clínicos.

Otro de los aspectos a tener en cuenta a la hora de trasladar la terapia propuesta a posteriores ensayos clínicos en humanos es la influencia del sexo en la determinación de una mayor o menor eficacia terapéutica. Según estudios preclínicos realizados en ratón, los niveles elevados de andrógenos permiten una mayor unión de las proteínas nucleares del hospedador a los ITR de serotipo 2 y aumentan la capacidad de transducción y los niveles de expresión del transgén en hígado en el sexo masculino<sup>259</sup>. No obstante, no se han observado diferencias en la eficiencia de transducción entre ambos sexos en estudios realizados en primates no humanos o en ensayos clínicos realizados en pacientes de otras enfermedades, por lo que el sexo no sería, *a priori*, una variable importante a tener en cuenta en este caso a la hora de desarrollar ensayos clínicos en humanos. De hecho, únicamente existen dos criterios de inclusión o exclusión relacionados con el sexo que deberían tenerse en cuenta. En primer lugar, no podrían formar parte del ensayo clínico mujeres embarazadas, en período de lactancia o con alta probabilidad de quedar embarazadas durante el período de estudio. En segundo lugar, también deberían excluirse del estudio aquellos hombres que no estuvieran dispuestos a proporcionar muestras de semen, ya que esto permitiría estudiar el riesgo de transmisión del transgén a la línea germinal.

Por lo que refiere al riesgo de desarrollo de carcinoma hepatocelular, no existen evidencias claras ya que, aunque algunos estudios preclínicos han relacionado la infección con AAV con una mayor incidencia de HCC<sup>144-151</sup>, se ha visto que esto depende de una combinación de factores de entre los cuales la edad es uno de los más importantes debido a una mayor probabilidad de integración del genoma del vector en células con tasas de proliferación elevada<sup>152</sup>. Por esta razón no resultaría conveniente el tratamiento de pacientes de edad inferior a 15 años, ya que es en este momento cuando el hígado adquiere el estado de madurez<sup>260</sup>. Afortunadamente, los ensayos clínicos desarrollados hasta el momento no se han caracterizado por el aumento de HCC en ningún caso e incluso existen ciertos estudios que muestran que la infección con AAV, lejos de aumentar la incidencia de desarrollo de carcinomas, puede prevenir la manifestación de ciertos cánceres como por ejemplo el cáncer de cérvix producido como consecuencia de una infección con el virus del papiloma humano<sup>261-263</sup>. Además, particularmente en pacientes de MNGIE, la expresión de la enzima TP supone un mecanismo de seguridad adicional ya que, en caso de desarrollo de un proceso de oncogénesis insercional debido al uso de AAV, las células que expresen TP derivarán forzosamente de células transducidas y serán las únicas susceptibles de ser eliminadas con el uso del profármaco capecitabina, el cual es transformado en 5-fluorouracilo mediante la enzima TP e inhibe de forma selectiva la proliferación celular<sup>212</sup>.

Dado la baja incidencia del MNGIE, resulta difícil encontrar fuentes de financiación que permitan llevar esta aproximación a la práctica clínica ya que los beneficios económicos derivados de las enfermedades ultra-raras no suelen ser un atractivo para inversores o compañías farmacéuticas debido al bajo retorno económico del producto final en comparación con la de otros medicamentos desarrollados



para enfermedades más prevalentes. Aun así, para aumentar al máximo estas posibilidades, es indispensable el desarrollo de estrategias que permitan la exclusividad de explotación de la invención. En relación a esto, cabe destacar que hemos logrado obtener la designación de medicamento huérfano para el vector AAV-TBG (primer AAV testado para el tratamiento del MNGIE), por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) y por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA). Además, disponemos también de un *“Protocol Assistance”* de la EMA y actualmente estamos intentando encontrar diferentes fuentes de financiación que nos permitan llevar a cabo el desarrollo de un ensayo clínico de fase I y II en pacientes de MNGIE. Por el momento hemos solicitado un proyecto dentro del marco europeo *Horizon 2020* y estamos pendientes de la resolución de la convocatoria, que esperamos sea positiva. En caso contrario, creemos que es importante seguir luchando por conseguir financiación para realizar ensayos clínicos que permitan demostrar la efectividad de la terapia en humanos, la cual probablemente tendría una buena aceptación entre los pacientes ya que, debido a la agresividad y la limitación de tratamientos existentes actualmente, los afectos de MNGIE suelen mostrar una actitud bastante abierta y receptiva en cuanto a la investigación de terapias alternativas.

## **7. CONCLUSIONES**



- 1- La administración intravenosa de los diferentes vectores rAAV8 desarrollados da lugar a la expresión de TP funcional y permite corregir el desequilibrio bioquímico en el modelo murino de la enfermedad de MNGIE. Además, el efecto terapéutico se mantiene al menos durante 8 meses y no produce efectos adversos destacables.
- 2- La restitución enzimática en hígado es suficiente para lograr una reducción generalizada de la concentración de dThd y dUrd ya que, a pesar de que la actividad TP en cerebro y músculo esquelético ha resultado ser nula o muy baja en la mayor parte de los animales tratados, también se ha observado reducción de la concentración de nucleósidos en estos tejidos.
- 3- La modulación del pool de nucleósidos tiene un efecto directo sobre el pool de dNTPs mitocondriales. Concretamente, la disminución de los niveles de dThd y dUrd comporta una reducción en la concentración de dTTP y un aumento discreto de la concentración de dCTP mitocondrial en hígado.
- 4- El uso de los promotores específicos de hepatocitos TBG, HLP y AAT resulta más eficaz que el uso del promotor constitutivo PGK cuando se utilizan vectores rAAV de serotipo 8 inyectados por vía intravenosa.
- 5- La conformación "*self-complementary*" en el vector HLP no supone una ganancia en términos de eficacia ni eficiencia en comparación al uso del vector con conformación de ssAAV AAT. Tampoco se produce una reducción del tiempo necesario para la producción del efecto terapéutico asociado al uso del dsAAV.
- 6- Aunque sería necesario realizar estudios adicionales de seguridad, los resultados obtenidos indican que la versión optimizada AAV-AAT debería ser la opción considerada en futuros ensayos clínicos.
- 7- Estos resultados confirman la viabilidad del uso de la terapia génica como tratamiento del MNGIE y su potencial aplicación en humanos una vez comprobadas su seguridad y eficacia a largo plazo en ensayos clínicos.



## **8. BIBLIOGRAFÍA**



1. Garone, C. et al. Clinical and genetic spectrum of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain* **134**, 3326–3332 (2011).
2. Hirano, M. et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): a disease of two genomes. *Neurologist* **10**, 8–17 (2004).
3. Hirano, M. et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy syndrome maps to chromosome 22q13.32-qter. *Am. J. Hum. Genet.* **63**, 526–533 (1998).
4. Hirano, M. et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): clinical, biochemical, and genetic features of an autosomal recessive mitochondrial disorder. *Neurology* **44**, 721–727 (1994).
5. Nishino, I. et al. MNGIE: from nuclear DNA to mitochondrial DNA. *Neuromuscul. Disord.* **11**, 7–10 (2001).
6. Gamez, J. et al. Phenotypic variability in a Spanish family with MNGIE. *Neurology* **59**, 455–457 (2002).
7. Marti, R. et al. Late-onset MNGIE due to partial loss of thymidine phosphorylase activity. *Ann. Neurol.* **58**, 649–652 (2005).
8. Massa, R. et al. Late-onset MNGIE without peripheral neuropathy due to incomplete loss of thymidine phosphorylase activity. *Neuromuscul. Disord.* **19**, 837–840 (2009).
9. Schüpbach, W. M. M. et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy in three siblings: Clinical, genetic and neuroradiological features. *J. Neurol.* **254**, 146–153 (2007).
10. Okamura, K. et al. Congenital oculoskeletal myopathy with abnormal muscle and liver mitochondria. *J. Neurol. Sci.* **27**, 79–91 (1976).
11. Simon, L. T. et al. Polyneuropathy, ophthalmoplegia, leukoencephalopathy, and intestinal pseudo-obstruction: POLIP syndrome. *Ann. Neurol.* **28**, 349–360 (1990).
12. Ionasescu, V. Oculogastrointestinal muscular dystrophy. *Am. J. Med. Genet.* **15**, 103–112 (1983).
13. Rowland, LP. Progressive external ophthalmoplegia. *Handbook of clinical neurology*. Vikens PJ, Bruyn GW, Klawans HL, editors. Elsevier; 1992. p. 287–329.
14. Needham, M. et al. Mitochondrial disease mimicking Charcot-Marie Tooth disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **78**, 99–100 (2007).
15. Filosto, M. et al. Pitfalls in diagnosing mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *J. Inherit. Metab. Dis.* **34**, 1199–1203 (2011).
16. Nishino, I. et al. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* **283**, 689–692 (1999).
17. Hagiwara, K. et al. Organization and chromosomal localization of the human platelet-derived endothelial cell growth factor gene. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2125–2132 (1991).
18. Matsukawa, K. et al. Tissue distribution of human gliostatin/platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) and its drug-induced expression. *Biochim. Biophys. Acta.* **1314**, 71–82 (1996).



19. Yoshimura, A. et al. Purification and tissue distribution of human thymidine phosphorylase; high expression in lymphocytes, reticulocytes and tumors. *Biochim. Biophys. Acta.* **1034**, 107–113 (1990).
20. Valentino, M. L. et al. Thymidine and deoxyuridine accumulate in tissues of patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *FEBS Lett.* **581**, 3410–3414 (2007).
21. Desgranges, C. et al. Catabolism of thymidine in human blood platelets: purification and properties of thymidine phosphorylase. *Biochim. Biophys. Acta* **654**, 211–218 (1981).
22. Brown, N. S. et al. Thymidine phosphorylase, 2-deoxy-D-ribose and angiogenesis. *Biochem. J.* **334**, 1–8 (1998).
23. Moghaddam, A. et al. Thymidine phosphorylase is angiogenic and promotes tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 998–1002 (1995).
24. Stenson, P. D. et al. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum Genet.* **133**, 1-9 (2014).
25. Barlı, Z. et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): Case report with a new mutation. *Eur. J. Pediatr.* **169**, 1375–1378 (2010).
26. Bedlack, R. S. et al. MNGIE neuropathy: five cases mimicking chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Muscle Nerve.* **29**, 364–368 (2004).
27. Blazquez, A. et al. Increased muscle nucleoside levels associated with a novel frameshift mutation in the thymidine phosphorylase gene in a Spanish patient with MNGIE. *Neuromuscul. Disord.* **15**, 775–778 (2005).
28. Cardaioli, E. et al. A new thymidine phosphorylase mutation causing elongation of the protein underlies mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *J. Neurol.* **259**, 172–174 (2012).
29. Carod-Artal, F. J. et al. Cognitive dysfunction and hypogonadotropic hypogonadism in a Brazilian patient with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy and a novel ECGF1 mutation. *Eur. J. Neurol.* **14**, 581–585 (2007).
30. Demaria, F. et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy presenting as anorexia nervosa. *J. Adolesc. Heal.* **59**, 729–731 (2016).
31. Gamez, J. et al. A novel thymidine phosphorylase mutation in a Spanish MNGIE patient. *J. Neurol. Sci.* **228**, 35–39 (2005).
32. Kalkan, I. et al. Spontaneous abdominal esophageal perforation in a patient with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Acta Clin. Belg.* **70**, 44–45 (2015).
33. Kintarak, J. et al. A novel ECGF1 mutation in a Thai patient with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *Clin. Neurol. Neurosurg.* **109**, 613–616 (2007).
34. Kocaefe, Y. et al. Four novel thymidine phosphorylase gene mutations in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy syndrome (MNGIE) patients. *Eur. J. Hum. Genet.* **11**, 102–104 (2003).

35. Laforce, R. et al. A novel TYMP mutation in a French Canadian patient with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **111**, 691–694 (2009).
36. Monroy, N. et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) in two Mexican brothers harboring a novel mutation in the ECGF1 gene. *Eur. J. Med. Genet.* **51**, 245–250 (2008).
37. Nalini, A. et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy in an Indian family with possible manifesting carriers of heterozygous TYMP mutation. *J. Neurol. Sci.* **309**, 131–135 (2011).
38. Vinciguerra, C. et al. Eye movement changes in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *J. Neurol. Sci.* **350**, 107–109 (2015).
39. Wang, H. et al. A novel thymidine phosphorylase mutation in a Chinese MNGIE patient. *Acta Neurol. Belg.* **228**, 1–9 (2016).
40. Wang, J. et al. Nutrition Therapy for Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalopathy with Homozygous Mutation of the TYMP Gene. *Clin. Nutr. Res.* **4**, 132–136 (2015).
41. Prasun, P. et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE)-like phenotype in a patient with a novel heterozygous POLG mutation. *J. Neurol.* **261**, 1818–1819 (2014).
42. Tang, S. et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE)-like phenotype: an expanded clinical spectrum of POLG1 mutations. *J. Neurol.* **259**, 862–868 (2012).
43. Horváth, R. et al. Heteroplasmic mutation in the anticodon-stem of mitochondrial tRNA Val causing MNGIE-like gastrointestinal dysmotility and cachexia. *J. Neurol.* **256**, 810–815 (2009).
44. Lehnhardt, F. G. et al. Altered cerebral glucose metabolism in a family with clinical features resembling mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy syndrome in association with multiple mitochondrial DNA deletions. *Arch. Neurol.* **65**, 407–411 (2008).
45. Shaibani, A. et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy due to mutations in RRM2B. *Arch. Neurol.* **66**, 1028–1032 (2009).
46. Van Goethem, G. et al. Novel POLG mutations in progressive external ophthalmoplegia mimicking mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Eur. J. Hum. Genet.* **11**, 547–549 (2003).
47. Vissing, J. et al. Multiple mtDNA deletions with features of MNGIE. *Neurology* **59**, 926–929 (2002).
48. Mathews, C. K. DNA precursor metabolism and genomic stability. *FASEB J.* **20**, 1300–1314 (2006).
49. Nelson, D. L. et al. Nucleotides and nucleic acids.. *Lehninger principles of biochemistry (4<sup>th</sup> edition)*. W.H. Freeman, editor. 2004. p. 275.
50. Arnér, E. S. J. et al. Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacol. Ther.* **67**, 155–186 (1995).
51. Reichard, P. Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Ann. Rev. Biochem* **57**, 349–374 (1988).

52. Pontarin, G. et al. p53R2-dependent ribonucleotide reduction provides deoxyribonucleotides in quiescent human fibroblasts in the absence of induced DNA damage. *J. Biol. Chem.* **282**, 16820–16828 (2007).
53. Håkansson, P. et al. Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 7834–7841 (2006).
54. King, M.W. The Medical Biochemistry Page. <https://themedicalbiochemistrypage.org/nucleotide-metabolism.php#thymine>. Consultado el 28 de marzo de 2017.
55. Martí, R. et al. Definitive Diagnosis of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy by biochemical assays. *Clin. Chem.* **50**, 120–124 (2004).
56. Spinazzola, A. et al. Altered thymidine metabolism due to defects of thymidine phosphorylase. *J. Biol. Chem.* **277**, 4128–4133 (2002).
57. Young, J. D. et al. The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol. Aspects Med.* **34**, 529–547 (2013).
58. Lai, Y. et al. Mitochondrial expression of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) results in enhanced mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *J. Biol. Chem.* **279**, 4490–4497 (2004).
59. Lee, E. W. et al. Identification of the mitochondrial targeting signal of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1): implications for interspecies differences in mitochondrial toxicity of fialuridine. *J. Biol. Chem.* **281**, 16700–16706 (2006).
60. DiMauro, S. et al. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* **348**, 2656–2668 (2003).
61. Tyynismaa, H. et al. Thymidine kinase 2 mutations in autosomal recessive progressive external ophthalmoplegia with multiple mitochondrial DNA deletions. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 66–75 (2012).
62. Bourdon, A. et al. Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat. Genet.* **39**, 776–780 (2007).
63. Ronchi, D. et al. Next-generation sequencing reveals DGUOK mutations in adult patients with mitochondrial DNA multiple deletions. *Brain* **135**, 3404–3415 (2012).
64. Copeland, W. C. Defects in mitochondrial DNA replication and human disease. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **47**, 64–74 (2012).
65. Cámara, Y. et al. Feeding the deoxyribonucleoside salvage pathway to rescue mitochondrial DNA. *Drug Discov. Today* **18**, 950–957 (2013).
66. Ferraro, P. et al. Mitochondrial deoxynucleotide pools in quiescent fibroblasts: A possible model for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *J. Biol. Chem.* **280**, 24472–24480 (2005).
67. González-Vioque, E. et al. Limited dCTP availability accounts for mitochondrial DNA depletion in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *PLoS Genet.* **7**, e1002035 (2011).
68. López, L. C. et al. Unbalanced deoxynucleotide pools cause mitochondrial DNA instability in

- thymidine phosphorylase-deficient mice. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 714–722 (2009).
69. Pontarin, G. et al. Mitochondrial DNA depletion and thymidine phosphate pool dynamics in a cellular model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *J. Biol. Chem.* **281**, 22720–22728 (2006).
  70. Song, S. et al. Deoxyribonucleotide pool imbalance stimulates deletions in HeLa cell mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.* **278**, 43893–43896 (2003).
  71. Giordano, C. et al. Gastrointestinal dysmotility in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy is caused by mitochondrial DNA depletion. *Am. J. Pathol.* **173**, 1120–1128 (2008).
  72. Giordano, C. et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: Evidence of mitochondrial DNA depletion in the small intestine. *Gastroenterology* **130**, 893–901 (2006).
  73. Nishigaki, Y. et al. ND5 is a hot-spot for multiple atypical mitochondrial DNA deletions in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 91–101 (2004).
  74. Nishigaki, Y. et al. Site-specific somatic mitochondrial DNA point mutations in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *J. Clin. Invest.* **111**, 1913–1921 (2003).
  75. Hirano, M. et al. Thymidine phosphorylase mutations cause instability of mitochondrial DNA. *Gene* **354**, 152–156 (2005).
  76. Saada, A. et al. Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat. Genet.* **29**, 342–344 (2001).
  77. Mandel, H. et al. The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* **29**, 337–341 (2001).
  78. Haraguchi, M. et al. Targeted deletion of both thymidine phosphorylase and uridine phosphorylase and consequent disorders in mice. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 5212–5221 (2002).
  79. el Kouni, M. H. et al. Differences in activities and substrate specificity of human and murine pyrimidine nucleoside phosphorylases: implications for chemotherapy with 5-fluoropyrimidines. *Cancer Res.* **53**, 3687–3693 (1993).
  80. Garcia-Diaz, B. et al. Deoxynucleoside stress exacerbates the phenotype of a mouse model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy. *Brain* **137**, 1337–1349 (2014).
  81. Cabrera-Pérez, R. et al. Prospective therapeutic approaches in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *Expert Opin. Orphan Drugs* **3**, 1167–1182 (2015).
  82. Ariaudo, C. et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy treated with peritoneal dialysis and bone marrow transplantation. *J. Nephrol.* **28**, 125–127 (2014).
  83. Yavuz, H. et al. Treatment of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy with dialysis. *Arch. Neurol.* **64**, 435–438 (2007).
  84. Lara, M. C. et al. Infusion of platelets transiently reduces nucleoside overload in MNGIE. *Neurology* **67**, 1461–1463 (2006).
  85. Moran, N. F. et al. Carrier erythrocyte entrapped thymidine phosphorylase therapy for MNGIE. *Neurology* **71**, 686–688 (2008).

86. Bax, B. E. et al. Clinical and biochemical improvements in a patient with MNGIE following enzyme replacement. *Neurology* **81**, 1269–1271 (2013).
87. Chapman, T. P. et al. Unexplained gastrointestinal symptoms: Think mitochondrial disease. *Dig. Liver Dis.* **46**, 1–8 (2014).
88. Hirano, M. et al. Allogeneic stem cell transplantation corrects biochemical derangements in MNGIE. *Neurology* **67**, 1458–1460 (2006).
89. Halter, J. P. et al. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain* **138**, 2847–2858 (2015).
90. Halter, J. et al. Allogeneic hematopoietic SCT as treatment option for patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): a consensus conference proposal for a standardized approach. *Bone Marrow Transpl.* **46**, 330–337 (2011).
91. O’Mahony, C. A. et al. The future of liver transplantation. *Text Hear. Inst J.* **39**, 874–875 (2012).
92. Boschetti, E. et al. Liver as a source for thymidine phosphorylase replacement in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *PLoS One* **9**, 10–15 (2014).
93. De Giorgio, R. et al. Liver transplantation for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Ann. Neurol.* **80**, 448–455 (2016).
94. D’Angelo, R. et al. Liver transplant reverses biochemical imbalance in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Mitochondrion* **34**, 101–102 (2017).
95. Cámara, Y. et al. Administration of deoxyribonucleosides or inhibition of their catabolism as a pharmacological approach for mitochondrial DNA depletion syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 2459–2467 (2014).
96. De Vocht, C. et al. Polymeric nanoreactors for enzyme replacement therapy of MNGIE. *J. Control. Release.* **148**, e19-20 (2010).
97. De Vocht, C. et al. Assessment of stability, toxicity and immunogenicity of new polymeric nanoreactors for use in enzyme replacement therapy of MNGIE. *J. Control. Release* **137**, 246–254 (2009).
98. Torres-Torronteras, J. et al. Hematopoietic gene therapy restores thymidine phosphorylase activity in a cell culture and a murine model of MNGIE. *Gene Ther.* **18**, 795–806 (2011).
99. Torres-Torronteras, J. et al. Long-term restoration of thymidine phosphorylase function and nucleoside homeostasis using hematopoietic gene therapy in a murine model of MNGIE. *Hum. Gene Ther.* 1–13 (2016).
100. Torres-Torronteras, J. et al. Gene therapy using a liver-targeted AAV vector restores nucleoside and nucleotide homeostasis in a murine model of MNGIE. *Mol. Ther.* **22**, 1–7 (2014).
101. Sicurelli, F. et al. Clinical and biochemical improvement following HSCT in a patient with MNGIE: 1-year follow-up. *J. Neurol.* **259**, 1985–1987 (2012).
102. Rosenberg, S. A. et al. Gene transfer into humans — Immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N. Engl. J. Med.* **323**, 570–578 (1990).
103. Blaese, R. M. et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after

- 4 years. *Science* **270**, 475–480 (1995).
104. Sons, W. The journal of gene medicine. <http://abedia.com/wiley/indications.php>. Consultado el 19 de febrero de 2017.
105. Wirth, T. et al. History of gene therapy. *Gene* **525**, 162–169 (2013).
106. Mingozzi, F. et al. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 341–355 (2011).
107. Ramamoorth, M. et al. Non viral vectors in gene therapy- an overview. *J. Clin. Diagn. Res.* **9**, GE01-GE06 (2015).
108. Seow, Y. et al. Biological gene delivery vehicles: Beyond viral vectors. *Mol. Ther.* **17**, 767–777 (2009).
109. Yin, H. et al. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 541–555 (2014).
110. Foldvari, M. et al. Non-viral gene therapy: Gains and challenges of non-invasive administration methods. *J. Control. Release* **240**, 165–190 (2016).
111. Kotterman, M. A. et al. Viral vectors for gene therapy: translational and clinical outlook. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **17**, 63–89 (2015).
112. Tatsis, N. et al. Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol. Ther.* **10**, 616–629 (2004).
113. Sons, W. The journal of gene medicine. <http://abedia.com/wiley/vectors.php>. Consultado el 19 de febrero de 2017.
114. Alba, R. et al. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther.* **12**, S18-S27 (2005).
115. Stilwell, J. L. et al. Role of viral vectors and virion shells in cellular gene expression. *Mol. Ther.* **9**, 337–346 (2004).
116. Stolberg, S. G. The biotech death of Jesse Gelsinger. *N. Y. Times Mag.* 136–140, 149–150 (1999).
117. Hacein-Bey-Abina, S. et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**, 415–419 (2003).
118. Manservigi, R. et al. HSV recombinant vectors for gene therapy. *Open Virol. J.* **4**, 123–156 (2010).
119. Breitbach, C. J. et al. Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature* **477**, 99–102 (2011).
120. Cartier, B. J. *Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies*. Nancy Smyth Templeton, editors. CRC Press Taylor & Francis Group; 2015. p.85–132.
121. Calcedo, R. et al. Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J Infect Dis* **199**, 381–390 (2009).
122. Grieger, J. C. et al. Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications. *Methods in Enzymology* **507**, 229-254 (2012).
123. Muzyczka, N. Adeno-associated viral (AAV) vectors. *A Guid. to Hum. gene Ther.* **416**, 87–102 (2010).

124. Jason, A. K. et al. DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *EMBO J.* **20**, 3282–3291 (2001).
125. Sonntag, F. et al. A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 10220–10225 (2010).
126. Sonntag, F. et al. The assembly-activating protein promotes capsid assembly of different adeno-associated virus serotypes. *J. Virol.* **85**, 12686–12697 (2011).
127. Earley, L. F. et al. Adeno-associated virus (AAV) assembly-activating protein is not an essential requirement for capsid assembly of AAV serotypes 4, 5, and 11. *J. Virol.* **91**, e01980–16 (2017).
128. Nonnenmacher, M. et al. Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther.* **19**, 649–658 (2012).
129. Pillay, S. et al. An essential receptor for adeno-associated virus infection. *Nature* **530**, 108–112 (2016).
130. Summerford, C. et al. AAVR: A multi-serotype receptor for AAV. *Mol. Ther.* **24**, 663–666 (2016).
131. Sonntag, F. et al. A. Adeno-associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus. *J. Virol.* **80**, 11040–11054 (2006).
132. Girod, A. et al. The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. *J. Gen. Virol.* **83**, 973–978 (2002).
133. Stahnke, S. et al. Intrinsic phospholipase A2 activity of adeno-associated virus is involved in endosomal escape of incoming particles. *Virology* **409**, 77–83 (2011).
134. McCarty, D. M. Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol. Ther.* **16**, 1648–1656 (2008).
135. Weitzman, M. D. et al. Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Biochemistry* **91**, 5808–5812 (1994).
136. Hüser, D. et al. High prevalence of infectious adeno-associated virus (AAV) in human peripheral blood mononuclear cells indicative of T lymphocytes as sites of AAV persistence. *J. Virol.* **91**, e02137–16 (2017).
137. Wu, Z. et al. Adeno-associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy. *Mol. Ther.* **14**, 316–327 (2006).
138. Srivastava, A. In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr. Opin. Virol.* **21**, 75–80 (2016).
139. Zincarelli, C. et al. Analysis of AAV serotypes 1–9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol. Ther.* **16**, 1073–1080 (2008).
140. Klein, R. L. et al. AAV8, 9, Rh10, Rh43 vector gene transfer in the rat brain: effects of serotype, promoter and purification method. *Mol. Ther.* **16**, 89–96 (2008).
141. Kattenhorn, L. M. et al. Adeno-Associated Virus Gene Therapy for Liver Disease. *Hum. Gene Ther.* **27**, 947–961 (2016).
142. Limmer, A. et al. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+

- T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat. Med.* **6**, 1348-1354 (2000).
143. Horst, A. K. et al. Modulation of liver tolerance by conventional and nonconventional antigen-presenting cells and regulatory immune cells. *Cell. Mol. Immunol.* **13**, 277–292 (2016).
  144. Donsante, A. et al. Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther.* **8**, 1343–1346 (2001).
  145. Donsante, A. et al. AAV Vector Integration Sites in Mouse Hepatocellular Carcinoma. *Science.* **317**, 477 (2007).
  146. Luk, J. M. et al. DLK1-DIO3 genomic imprinted microRNA cluster at 14q32.2 defines a stemlike subtype of hepatocellular carcinoma associated with poor survival. *J. Biol. Chem.* **286**, 30706–30713 (2011).
  147. Wang, P. R. et al. Induction of hepatocellular carcinoma by in vivo gene targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 11264–11269 (2012).
  148. Zhong, L. et al. Recombinant adeno-associated virus integration sites in murine liver after ornithine transcarbamylase gene correction. *Hum. Gene Ther.* **24**, 520-525 (2013).
  149. Kao, C. Y. et al. Incorporation of the factor IX Padua mutation into FIX-triple improves clotting activity in vitro and in vivo. *Thromb. Haemost.* **110**, 244–256 (2013).
  150. Rosas, L. E. et al. Patterns of scAAV vector insertion associated with oncogenic events in a mouse model for genotoxicity. *Mol. Ther.* **20**, 2098–2110 (2012).
  151. Walia, J. S. et al. Long-term correction of sandhoff disease following intravenous delivery of rAAV9 to mouse neonates. *Mol. Ther.* **23**, 414–422 (2015).
  152. Chandler, R. J. et al. Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy. *J. Clin. Invest.* **125**, 870–880 (2015).
  153. Nault, J. C. et al. Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat. Genet.* **47**, 1–15 (2015).
  154. Nathwani, A. C. et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1994-2004 (2014).
  155. Bell, P. et al. Effects of self-complementarity, codon optimization, transgene, and dose on liver transduction with AAV8. *Hum. Gene Ther. Methods.* **27**, 228-237 (2016).
  156. Wang, Y. et al. Limitations of encapsidation of recombinant self-complementary adeno-associated viral genomes in different serotype capsids and their quantitation. *Hum. Gene Ther. Methods* **23**, 225–233 (2012).
  157. Martino, A. T. et al. The genome of self-complementary adeno-associated viral vectors increases Toll-like receptor 9-dependent innate immune responses in the liver. *Blood* **117**, 6459–6468 (2011).
  158. McLaughlin, S. K. et al. Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J. Virol.* **62**, 1963–1973 (1988).
  159. Yan, Z. et al. Hybrid adeno-associated virus bearing nonhomologous inverted terminal repeats enhances dual-vector reconstruction of minigenes in vivo. *Hum. Gene Ther.* **18**, 81-87 (2007).



160. Li, J. et al. Protein trans-splicing as a means for viral vector-mediated in vivo gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **19**, 958–964 (2008).
161. Muller, O. et al. Improved cardiac gene transfer by transcriptional and transductional targeting of adeno-associated viral vectors. *Cardiovasc. Res.* **70**, 70–78 (2006).
162. Wu, Z. et al. Optimization of self-complementary AAV vectors for liver-directed expression results in sustained correction of hemophilia B at low vector dose. *Mol. Ther.* **16**, 280–289 (2008).
163. Powell, S. K. et al. Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy. *Discov. Med.* **19**, 49-57 (2015).
164. Brown, B. D. et al. Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state. *Nat. Biotechnol.* **25**, 4–5 (2007).
165. Kotterman, M. A. et al. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 445–451 (2014).
166. Zhong, L. et al. Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: Point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 7827-7832 (2008).
167. Martino, A. T. et al. Engineered AAV vector minimizes in vivo targeting of transduced hepatocytes by capsid-specific CD8+ T cells. *Blood* **121**, 2224–2233 (2013).
168. Lochrie, M. A. et al. Mutations on the external surfaces of adeno-associated virus type 2 capsids that affect transduction and neutralization. *J. Virol.* **80**, 821–834 (2006).
169. Mingozzi, F. et al. Overcoming preexisting humoral immunity to AAV using capsid decoys. *Sci. Transl. Med.* **17**, 194–192 (2013).
170. Münch, R. C. et al. Displaying high-affinity ligands on adeno-associated viral vectors enables tumor cell-specific and safe gene transfer. *Mol. Ther.* **21**, 109–118 (2013).
171. Bü Ning, H. et al. Engineering the AAV capsid to optimize vector–host-interactions. *Curr. Opin. Pharmacol.* **24**, 94–104 (2015).
172. Robert, M. A. et al. Manufacturing of recombinant adeno-associated viruses using mammalian expression platforms. *Biotechnol. J.* **12**, 1600193 (2017).
173. Xiao, X. et al. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J. Virol.* **72**, 2224–2232 (1998).
174. Collaco, R. F. et al. A helper virus-free packaging system for recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene* **238**, 397–405 (1999).
175. Clark, K. R. et al. Cell lines for the production of recombinant adeno-associated virus. *Hum. Gene Ther.* **6**, 1329–1341 (1995).
176. Farson, D. et al. Development and characterization of a cell line for large-scale, serum-free production of recombinant adeno-associated viral vectors. *J. Gene Med.* **6**, 1369–1381 (2004).
177. Martin, J. et al. Generation and characterization of adeno-associated virus producer cell lines for research and preclinical vector production. *Hum. Gene Ther. Methods* **24**, 253–269 (2013).

178. Emmerling, V. V. et al. Rational plasmid design and bioprocess optimization to enhance recombinant adeno-associated virus (AAV) productivity in mammalian cells. *Biotechnol. J.* **11**, 290–297 (2016).
179. Ling, C. et al. Strategies to generate high-titer, high-potency recombinant AAV3 serotype vectors. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **3**, 16029 (2016).
180. Schnödt, M. et al. DNA minicircle technology improves purity of adeno-associated viral vector preparations. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* **5**, e355 (2016).
181. Strobel, B. et al. Comparative analysis of cesium chloride-and iodixanol-based purification of recombinant adeno-associated viral vectors for preclinical applications. *Hum. Gene Ther. Methods* **26**, 147–157 (2015).
182. Wright, J. F. et al. Identification of factors that contribute to recombinant AAV2 particle aggregation and methods to prevent its occurrence during vector purification and formulation. *Mol. Ther.* **12**, 171-178 (2005).
183. Zolotukhin, S. et al. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther.* **6**, 973–985 (1999).
184. Ayuso, E. et al. High AAV vector purity results in serotype- and tissue-independent enhancement of transduction efficiency. *Gene Ther.* **17**, 503–510 (2009).
185. Sommer, J. M. et al. Quantification of adeno-associated virus particles and empty capsids by optical density measurement. *Mol. Ther.* **7**, 122–128 (2003).
186. Grimm, D. et al. Titration of AAV-2 particles via a novel capsid ELISA: packaging of genomes can limit production of recombinant AAV-2. *Gene Ther.* **6**, 1322–1330 (1999).
187. Fagone, P. et al. Systemic errors in quantitative PCR titration of self-complementary AAV vectors and improved alternative methods. *Hum. Gene Ther. Methods* **23**, 1–7 (2012).
188. Wang, F. et al. A reliable and feasible qPCR strategy for titrating AAV vectors. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* **19**, 187–193 (2013).
189. D’Costa S. et al. Practical utilization of recombinant AAV vector reference standards: focus on vector genomes titration by free ITR qPCR. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **5**, 16019 (2016).
190. Lock, M. et al. Absolute determination of single-stranded and self-complementary adeno-associated viral vector genome titers by droplet digital PCR. *Hum. Gene Ther. Methods.* **25**, 115–125 (2014).
191. Piedra, J. et al. Development of a rapid, robust, and universal picogreen-based method to titer adeno-associated vectors. *Hum. Gene Ther. Method.s* **26**, 35–42 (2015).
192. Mingozzi, F. et al. Immune responses to AAV vectors: Overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* **122**, 23–36 (2013).
193. Rogers, G. L. et al. Innate immune responses to AAV vectors. *Front. Microbiol.* **2**, 1–10 (2011).
194. Hemmi, H. et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740–745 (2000).
195. Wu, T. et al. Self-complementary AAVs induce more potent transgene product-specific immune responses compared to a single-stranded genome. *Mol. Ther.* **20**, 572–579 (2012).

196. Lu, Y. et al. Distinct immune responses to transgene products from rAAV1 and rAAV8 vectors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **106**, 17158–17162 (2009).
197. Hösel, M. et al. Toll-like receptor 2-mediated innate immune response in human nonparenchymal liver cells toward adeno-associated viral vectors. *Hepatology* **55**, 287–297 (2012).
198. Zaiss, A. K. et al. Complement is an essential component of the immune response to adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* **82**, 2727–2740 (2008).
199. Faust, S. M. et al. CpG-depleted adeno-associated virus vectors evade immune detection. *J. Clin. Invest.* **123**, 2994–3001 (2013).
200. Wang, L. et al. Impact of pre-existing immunity on gene transfer to nonhuman primate liver with adeno-associated virus 8 vectors. *Hum. Gene Ther.* **22**, 1389–1401 (2011).
201. Calcedo, R. et al. Humoral immune response to AAV. *Front. Immunol.* **4**, Article 341 (2013).
202. Boutin, S. et al. Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum. Gene Ther.* **21**, 704–712 (2010).
203. Manno, C. S. et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med.* **12**, 342–347 (2006).
204. Carter, B. et al. A Phase I study of an adeno-associated virus-CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Hum. Gene Ther.* **7**, 1145–1159 (1996).
205. U.S. National Institutes of Health. ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/>. Consultado el 30 de marzo de 2017.
206. Brookhouser, N. et al. May I cut in? Gene editing approaches in human induced pluripotent stem cells. *Cells* **6**, E5 (2017).
207. Tebas, P. et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* **370**, 901–910 (2014).
208. Mussolino, C. et al. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res.* **39**, 9283–9293 (2011).
209. Ding, Q. et al. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell.* **12**, 393–394 (2013).
210. Cong, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* **339**, 819–822 (2013).
211. Ran, F. A. et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell.* **154**, 1380–1389 (2013).
212. López-Estévez, S. et al. Thymidine phosphorylase is both a therapeutic and a suicide gene in a murine model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Gene Ther.* **21**, 673–681 (2014).
213. Sambrook, J. et al. Appendixes: Phenol-Chloroform extractions. *Molecular cloning (A laboratory manual)*. 3th book. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. p. E3-E4.

214. Hirt, B. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* **26**, 365–369 (1967).
215. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
216. McIntosh, J. et al. Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant. *Blood* **121**, 3335–3344 (2013).
217. Cao, D. et al. Abnormalities in uridine homeostatic regulation and pyrimidine nucleotide metabolism as a consequence of the deletion of the uridine phosphorylase gene. *J. Biol. Chem.* **280**, 21169–21175 (2005).
218. Sherman, P. A. et al. Enzymatic assay for deoxyribonucleoside triphosphates using synthetic oligonucleotides as template primers. *Anal. Biochem.* **180**, 222–226 (1989).
219. Ferraro, P. et al. Quantitation of cellular deoxynucleoside triphosphates. *Nucleic Acids Research.* **38**, e85 (2010).
220. Martí, R. et al. Alteration of nucleotide metabolism: a new mechanism for mitochondrial disorders. *Clin. Chem. Lab. Med.* **41**, 845–851 (2003).
221. Filosto, M. et al. Course and management of allogeneic stem cell transplantation in patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *J. Neurol.* **259**, 2699–2706 (2012).
222. Thomas, C. E. et al. Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* **78**, 3110–3122 (2004).
223. Davidoff, A. M. et al. Comparison of the ability of adeno-associated viral vectors pseudotyped with serotype 2, 5, and 8 capsid proteins to mediate efficient transduction of the liver in murine and nonhuman primate models. *Mol. Ther.* **11**, 875–888 (2005).
224. Vandenberghe, L. H. et al. Heparin binding directs activation of T cells against adeno-associated virus serotype 2 capsid. *Nat. Med.* **12**, 967–971 (2006).
225. Hsieh, M.Y. et al. Persistence of AAV capsid in transduced cells. *Mol. Ther.* **11**, S5–S6 (2005).
226. Nathwani, A. C. et al. Safe and efficient transduction of the liver after peripheral vein infusion of self-complementary AAV vector results in stable therapeutic expression of human FIX in nonhuman primates. *Blood* **109**, 1414–1421 (2007).
227. Nakai, H. et al. Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *J. Virol.* **79**, 214–224 (2005).
228. Wang, Z. et al. Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat. Biotechnol.* **23**, 321–328 (2005).
229. Wang, Z. et al. Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther.* **10**, 2105–2111 (2003).
230. Nathwani, A. C. et al. Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. *Blood* **107**, 2653–2661 (2006).
231. Nathwani, A. C. et al. Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-

- complementary AAV vector encoding human FIX pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins. *Mol. Ther.* **19**, 876–885 (2011).
232. Chen, S. J. et al. Biodistribution of AAV8 vectors expressing human low-density lipoprotein receptor in a mouse model of homozygous familial hypercholesterolemia. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* **160**, 154–160 (2013).
233. Wang, L. et al. Systematic evaluation of AAV vectors for liver directed gene transfer in murine models. *Mol. Ther.* **18**, 118–125 (2010).
234. Lisowski, L. et al. Selection and evaluation of clinically relevant AAV variants in a xenograft liver model. *Nature.* **506**, 382–386 (2014).
235. Vercauteren, K. et al. Superior in vivo transduction of human hepatocytes using engineered AAV3 capsid. *Mol. Ther.* **24**, 1042–1049 (2016).
236. Wang, M. et al. Direct interaction of human serum proteins with AAV virions to enhance AAV transduction: Immediate impact on clinical applications. *Gene Ther.* **24**, 49–59 (2017).
237. Kelsey, G. D. et al. Species- and tissue-specific expression of human  $\alpha$ 1-antitrypsin in transgenic mice. *Genes & Development.* **1**, 161–171 (1987).
238. Sifers, R. N. et al. Tissue specific expression of the human alpha-1-antitrypsin gene in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* **15**, 1459–1475 (1987).
239. Carlson, J. A. et al. Multiple tissues express alpha1-antitrypsin in transgenic mice and man. *J. Clin. Invest.* **82**, 26–36 (1988).
240. Brantly, M. L. et al. Sustained transgene expression despite T lymphocyte responses in a clinical trial of rAAV1-AAT gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **106**, 16363–16368 (2009).
241. Ertl, H. C. J. et al. Impact of AAV capsid-specific T-cell responses on design and outcome of clinical gene transfer trials with recombinant adeno-associated viral vectors: an evolving controversy. *Hum. Gene Ther.* **28**, 328–337 (2017).
242. Mueller, C. et al. Human Treg responses allow sustained recombinant adeno-associated virus-mediated transgene expression. *J. Clin. Investig.* **123**, 5310–5318 (2013).
243. Ferreira, V. et al. Immune responses to intramuscular administration of alipogene tiparvovec (AAV1-LPL S447X) in a Phase II clinical trial of lipoprotein lipase deficiency gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **25**, 180–188 (2014).
244. Di Meo, I. et al. Effective AAV-mediated gene therapy in a mouse model of ethylmalonic encephalopathy. *EMBO Mol. Med.* **4**, 1008–1014 (2012).
245. Giannini, E. G. et al. Liver Enzyme Alteration: A Guide for Clinicians. *Can. Med. Assoc. J.* **172**, 367–379 (2005).
246. Finkenstedt, A. et al. MNGIE syndrome: liver cirrhosis should be ruled out prior to bone marrow transplantation. *JIMD Rep* **10**, 41–44 (2013).
247. Bell, P. et al. Analysis of tumors arising in male B6C3F1 mice with and without AAV Vector delivery to liver. *Mol. Ther.* **14**, 34–44 (2006).
248. Mingozzi, F. et al. CD8+ T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat. Med.* **13**, 419–422 (2007).

249. Pañeda, A. et al. Safety and liver transduction efficacy of rAAV5- cohPBGD in nonhuman primates: A potential therapy for acute intermittent porphyria. *Hum. Gene Ther.* **24**, 1007–1017 (2013).
250. Gao, G. et al. Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J. Virol.* **78**, 6381–6388 (2004).
251. D’Avola, D. et al. Phase I open label liver-directed gene therapy clinical trial for acute intermittent porphyria. *J. Hepatol.* **65**, 776–783 (2016).
252. Pasi, J. et al. Interim results of an open-label, Phase 1/2 study of BMN 270, an AAV5-FVIII gene transfer in severe hemophilia A. *Haemophilia* **22**, 151–152 (2016).
253. Miesbach, W. et al. Updated results from a dose escalating study in adult patients with haemophilia B treated with AMT-060 (AAV5-hFIX) gene therapy. *Haemophilia* **22**, 151–152 (2016).
254. Li, S. et al. Efficient and targeted transduction of nonhuman primate liver with systemically delivered optimized AAV3B Vectors. *Mol. Ther.* **23**, 1867-1876 (2015).
255. van der Marel, S. et al. Neutralizing antibodies against adeno-associated viruses in inflammatory bowel disease patients: Implications for gene therapy. *Inflamm. Bowel Dis.* **17**, 2436–2442 (2011).
256. Ling, C. et al. Short report prevalence of neutralizing antibodies against liver-tropic adeno-associated virus serotype vectors in 100 healthy Chinese and its potential relation to body constitutions. *J. Integr. Med.* **13**, 341-346 (2015).
257. McIntosh, J. H. et al. Successful attenuation of humoral immunity to viral capsid and transgenic protein following AAV-mediated gene transfer with a non-depleting CD4 antibody and cyclosporine. *Gene Ther.* **19**, 78–85 (2012).
258. Velázquez, V. M. et al. Effective depletion of pre-existing anti-AAV antibodies requires broad immune targeting. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **4**, 159-168 (2017).
259. Davidoff, A. M. et al. Sex significantly influences transduction of murine liver by recombinant adeno-associated viral vectors through an androgen-dependent pathway. *Blood.* **102**, 480-488 (2003).
260. Wolf, D. C. Evaluation of the size, shape and consistency of the liver. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. Kenneth, H. W., Hall, W. D., Hurst, J. W. editors. (Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia); 1990.
261. Srivastava, A. et al. AAV Infection: Protection from Cancer. *Hum. Gene Ther.* **28**, 323–327 (2017).
262. Hermonat, P. L. Adeno-associated virus inhibits human papillomavirus type 16: a viral interaction implicated in cervical cancer. *Cancer Res.* **54**, 2278–2281 (1994).
263. Raj, K. et al. Virus-mediated killing of cells that lack p53 activity. *Nature* **412**, 914–917 (2001).



## 9. ANEXO





# Gene Therapy Using a Liver-targeted AAV Vector Restores Nucleoside and Nucleotide Homeostasis in a Murine Model of MNGIE

Javier Torres-Torronteras<sup>1,2</sup>, Carlo Viscomi<sup>3,4</sup>, Raquel Cabrera-Pérez<sup>1,2</sup>, Yolanda Cámara<sup>1,2</sup>, Ivano Di Meo<sup>3</sup>, Jordi Barquinero<sup>5</sup>, Alberto Auricchio<sup>6</sup>, Giuseppe Pizzorno<sup>7</sup>, Michio Hirano<sup>8</sup>, Massimo Zeviani<sup>3,4</sup> and Ramon Martí<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Mitochondrial Disorders Unit, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; <sup>3</sup>Molecular Neurogenetics Unit, IRCCS Foundation Neurological Institute "C, Besta", Milan, Italy; <sup>4</sup>MRC-Mitochondrial Biology Unit, Cambridge, UK; <sup>5</sup>Gene and Cell Therapy Unit, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>6</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine and Division of Medical Genetics, Department of Pediatrics, "Federico II" University, Naples, Italy; <sup>7</sup>Human Health and Environment Program, Desert Research Institute, Las Vegas, Nevada, USA; <sup>8</sup>Department of Neurology, Columbia University Medical Center, New York, USA

Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) is an autosomal recessive disorder caused by mutations in *TYMP*, encoding thymidine phosphorylase (TP). TP deficiency results in systemic accumulation of thymidine and deoxyuridine, which interferes with mitochondrial DNA (mtDNA) replication and leads to mitochondrial dysfunction. To date, the only treatment available for MNGIE patients is allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, which is associated with high morbidity and mortality. Here, we report that AAV2/8-mediated transfer of the human *TYMP* coding sequence (hcTYMP) under the control of a liver-specific promoter prevents the biochemical imbalances in a murine model of MNGIE. hcTYMP expression was restricted to liver, and a dose as low as  $2 \times 10^{11}$  genome copies/kg led to a permanent reduction in systemic nucleoside levels to normal values in about 50% of treated mice. Higher doses resulted in reductions to normal or slightly below normal levels in virtually all mice treated. The nucleoside reduction achieved by this treatment prevented deoxycytidine triphosphate (dCTP) depletion, which is the limiting factor affecting mtDNA replication in this disease. These results demonstrate that the use of AAV to direct *TYMP* expression in liver is feasible as a potentially safe gene therapy strategy for MNGIE.

Received 25 October 2013; accepted 14 January 2014; advance online publication 25 February 2014. doi:10.1038/mt.2014.6

## INTRODUCTION

Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) is a genetic disorder whose main clinical features are severe gastrointestinal dysmotility, progressive external ophthalmoplegia, and peripheral neuropathy. Patients with this condition usually die of complications of their gastrointestinal problems and

their critical nutritional status, with an average age at death of 37 years.<sup>1</sup> MNGIE is inherited as an autosomal recessive trait, and is caused by mutations in the nuclear gene *TYMP*, encoding thymidine phosphorylase (TP).<sup>2</sup> This enzyme catalyzes the first step of thymidine (dThd) and deoxyuridine (dUrd) catabolism. As a consequence of TP dysfunction, MNGIE patients accumulate dThd and dUrd systemically,<sup>3</sup> which ultimately results in imbalances in the mitochondrial pool of deoxyribonucleoside triphosphates (dNTP). More precisely, increased deoxythymidine triphosphate (dTTP) and decreased dCTP levels in mitochondria due to dThd excess have been observed *in vitro* and *in vivo*. This dNTP imbalance interferes with mitochondrial DNA (mtDNA) replication and results in depletion, multiple deletions, and point mutations, which in turn cause mitochondrial dysfunction.<sup>4-6</sup>

Several therapeutic strategies attempted for MNGIE have focused on removing the systemic dThd and dUrd excess,<sup>7-10</sup> but the only treatment that has achieved a sustained reduction in these nucleosides to undetectable or nearly undetectable levels and an improvement in the long-term clinical outcome is allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.<sup>11</sup> The TP enzyme present in donor-derived platelets and white blood cells acts as a powerful clearing agent that eliminates toxic nucleosides from the patients' blood and ultimately results in full clearance of these water-soluble compounds from tissues. However, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation has serious limitations, including the difficulty of obtaining suitable donors, the toxicity of the conditioning regimen, and the risk of graft failure and graft-versus-host disease. In addition, MNGIE patients are generally in poor medical condition at the time of the diagnosis. As a consequence of all these factors, this treatment is associated with high morbidity and mortality rates in these patients.<sup>12</sup>

A murine model of MNGIE, the *Tymp/Upp1* double knockout (KO), has been generated and characterized.<sup>5</sup> This model recapitulates the biochemical imbalances and, in older animals, some molecular features of the disease. Nonetheless, certain differences in

Correspondence: Ramon Martí, Mitochondrial Disorders Unit, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Universitat Autònoma de Barcelona, Pg. Vall d'Hebron 119, 08035 Barcelona, Spain. E-mail: ramon.marti@vhir.org

deoxyribonucleoside metabolism between humans and mice should be noted. Three enzymes (TP, uridine phosphorylase 1 and uridine phosphorylase 2) initiate dThd and dUrd catabolism in mice, but uridine phosphorylase 2 is not knocked out in this model. In humans, this role is played entirely by TP. In addition, the normal dThd and dUrd plasma levels are higher in mice (1–4  $\mu\text{mol/l}$ ) than in humans (below 0.05  $\mu\text{mol/l}$ ). These differences, together with the short life span of mice compared to humans, are probably accounting for the lack of MNGIE-like clinical features in this murine model.

We previously demonstrated, in this animal model, that gene therapy using a lentiviral vector and targeting hematopoietic stem cells is a feasible approach<sup>13</sup>; however, lentiviral vectors are integrative and thus a potential cause of insertional oncogenesis. Here, we used an adeno-associated virus (AAV) vector as an alternative. As compared to lentiviral vectors, AAV vectors have a safer profile as they are mainly found in episomal form inside the host cell, which minimizes the risk of insertional oncogenesis.<sup>14</sup> Our results demonstrate that AAV-mediated liver-targeted *TYMP* expression normalizes nucleoside and mitochondrial nucleotide metabolism

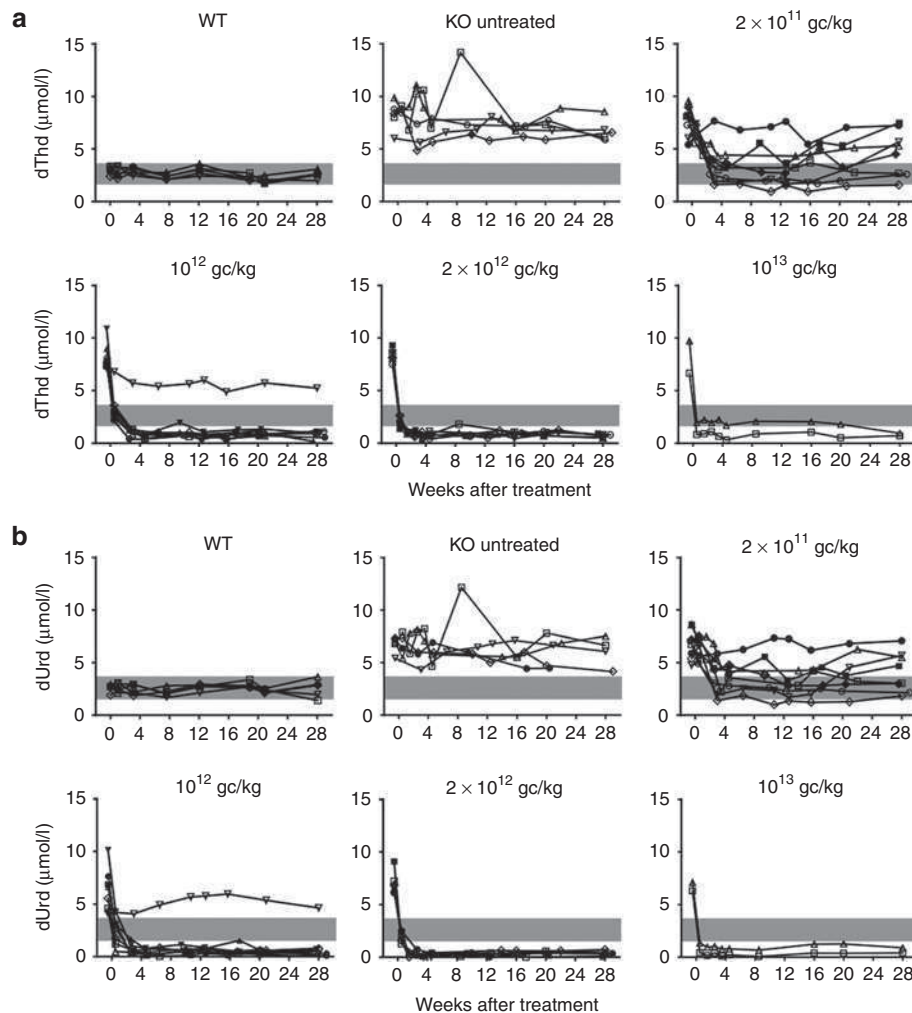
in the MNGIE animal model and constitutes a promising strategy to be tested in clinical studies.

## RESULTS

### Effect of the treatment on nucleoside levels

We generated an AAV2/8 vector (Supplementary Figure S1) containing the human *TYMP* coding sequence (hcTYMP) under the control of the liver-specific thyroxine-binding globulin promoter (TBG). Eight- to 12-week-old male *Tymp/Upp1* double KO mice (animal model of MNGIE) were treated with a single intravenous injection of AAV2/8-TBG-hcTYMP. Four groups of animals were established, receiving four different doses:  $2 \times 10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ , and  $10^{13}$  genome copies (gc)/kg. In order to facilitate matching the results of each mouse among different figures, the same symbol identifies a particular mouse, within each category (wt, KO,  $2 \times 10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ , and  $10^{13}$  gc/kg) in Figures 1–4 and Supplementary Figure S2.

Blood samples were collected periodically over 28 weeks to measure nucleoside levels (Figure 1). At 3.5 weeks after AAV



**Figure 1** Plasma dThd and dUrd concentrations. Plasma dThd (panel a) and dUrd (panel b) in mice treated with different AAV-TBG-hcTYMP doses (indicated within each plot) during the monitoring period. Grey areas indicate the concentration range in wild-type (wt) mice. In order to facilitate matching the results of each mouse among different figures, the same symbol identifies a particular mouse, within each category (wt, KO,  $2 \times 10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ , and  $10^{13}$  gc/kg) in Figures 1–4 and Supplementary Figure S2.

administration, plasma dThd concentration had decreased to wild-type (wt) values in six of eight (75%) animals treated with the lowest dose ( $2 \times 10^{11}$  gc/kg), and three of them (37.5%) maintained these low levels over the 28 weeks of monitoring. Higher doses led to a reduction in plasma dThd below wt levels by 0.5 weeks after treatment in all but one animal (17 of 18), and the reduction was maintained over the entire time monitored. Only one mouse treated with  $10^{12}$  gc/kg did not respond to the treatment (Figure 1a). Similar results were obtained for plasma dUrd levels (Figure 1b).

Eight months after the treatment (end of the study), a subgroup of mice was killed and tissues were collected for analysis. Nucleosides were measured in liver and three additional tissues affected in MNGIE patients (brain, skeletal muscle, and small intestine). In mice with reduced circulating dThd and dUrd concentrations after treatment (Figure 1 and Supplementary Figure S2), concomitant reductions were found in liver, brain, and skeletal muscle (Figure 2), demonstrating that TP activity in the liver efficiently clears dThd and dUrd from their entire distribution volume. Especially pronounced was the reduction in liver of animals receiving the higher AAV doses (undetectable dThd and dUrd in most cases), likely due to high local TP activity in the target tissue. In contrast, dThd and dUrd levels determined in small intestine were virtually unchanged in treated animals.

### Transgenic *TYMP* expression was targeted to the liver

Human TP protein was undetectable by western blot analysis in liver in all untreated wt and KO mice analyzed (Figure 3a). Low but detectable levels were found in four of the six mice treated with the lowest AAV dose, and high levels were seen in all mice but one belonging to the groups receiving higher doses (Figure 3a). The only mouse lacking TP protein was the same animal that did not show a nucleoside reduction in plasma and tissues (see above). Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis of *hcTYMP* copy number confirmed effective transduction in a dose-dependent manner. In the group of mice treated with the

lowest vector dose, *hcTYMP* copy number was undetectable in animals that did not show a nucleoside reduction in blood collected at completion of the study (Figure 3b and Supplementary Figure S2). Similarly, in AAV-treated animals, liver TP activity increased in a dose-dependent manner (Figure 3c). For the lowest dose ( $2 \times 10^{11}$  gc/kg), two animals reached normal TP activity, and the same animals also showed reduced nucleosides in blood and tissues (Figures 1 and 2; Supplementary Figure S2). Negligible or absent TP activities were found in tissues other than liver in treated mice (Figure 4), indicating highly specific hepatic transgene expression. In treated animals, AAV dose strongly correlated with *hcTYMP* copy number ( $P < 0.001$ ), TP activity ( $P < 0.001$ ), and TP protein ( $P = 0.001$ ) levels in liver.

Immunostaining of hepatic tissue further confirmed that TP protein was present in liver (Figure 5). The protein showed a patchy distribution and the comparison with the nuclei staining indicated cytoplasmic localization, as expected for TP protein. The number of stained hepatocytes was consistent with the copy number results and the AAV dose.

Hepatotoxicity was not detected in any of the animals, as assessed by monitoring plasma alanine aminotransferase activity, and no differences in weight were observed between treated mice and untreated KO or wt animals (Supplementary Figure S3).

### AAV treatment prevents dCTP depletion

In MNGIE, dThd excess results in changes in the mitochondrial dNTP pools. We investigated whether the nucleoside decrease occurring in mice treated with the therapeutic vector (AAV2/8-TBG-*hcTYMP*) prevented mitochondrial dNTP imbalances in liver (Figure 6). Although the average dTTP value was slightly higher in KO mice than in wt mice, the difference did not reach statistical significance, in contrast to the results from a previous report.<sup>5</sup> This is likely because our values had a rather wide variability. dCTP was significantly reduced in KO mice. At the end of the study, dCTP concentration was increased in treated mice

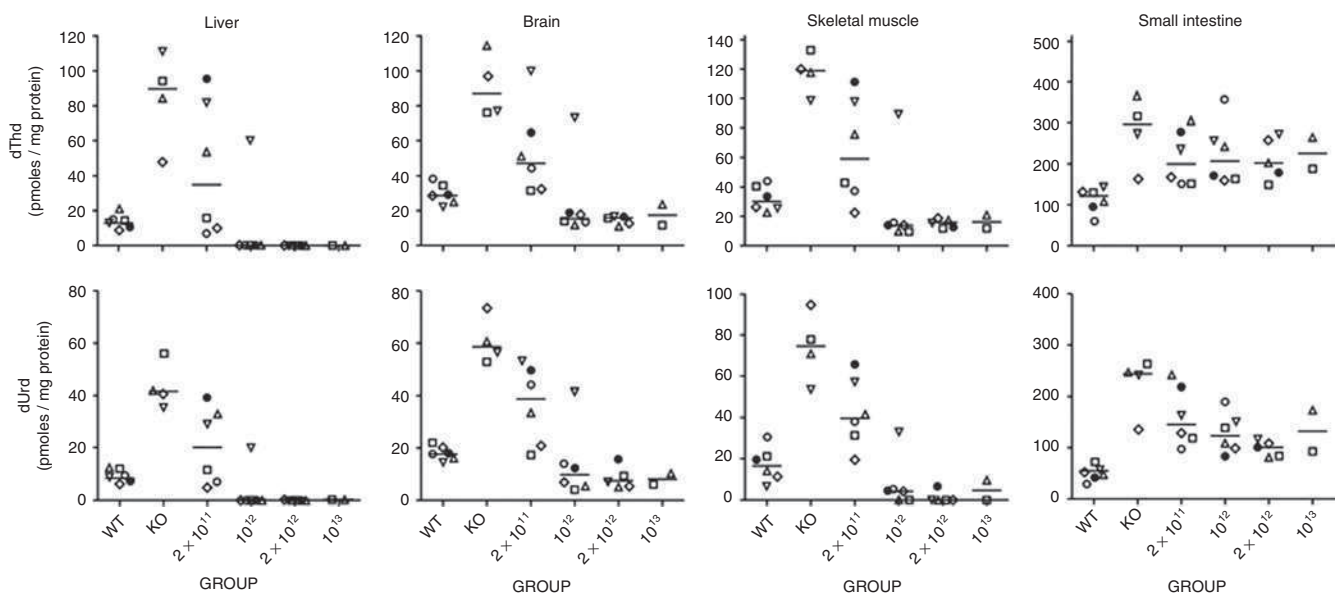
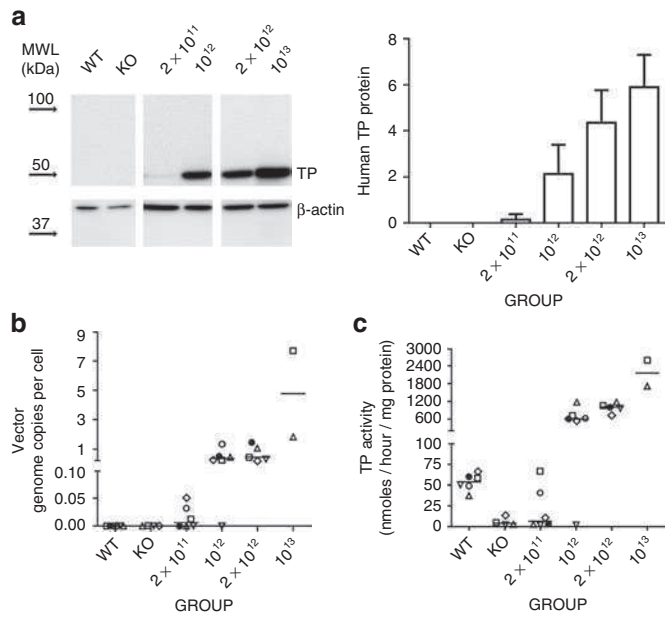


Figure 2 Nucleoside reduction in different tissues. dThd and dUrd concentration in liver, brain, skeletal muscle, and small intestine extracts at the end of the study (34 weeks after the treatment). Horizontal lines represent the median.



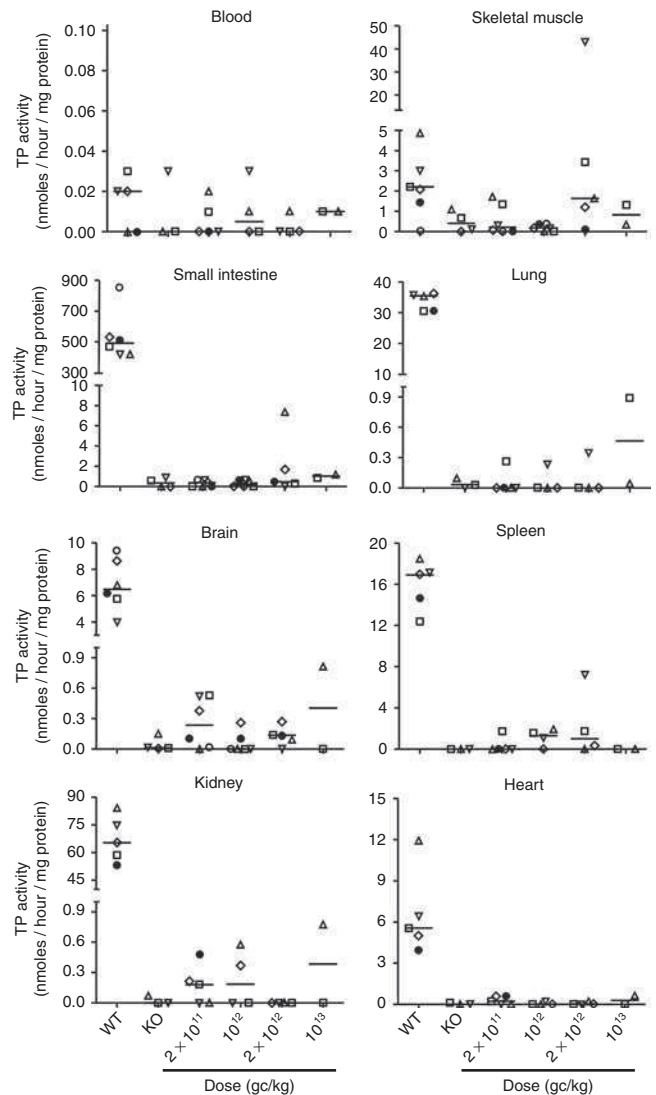
**Figure 3** Liver-specific thymidine phosphorylase (TP) restoration. **(a)** Representative western blot showing human TP and  $\beta$ -actin in liver homogenates (left panel) and densitometric analysis (right panel). Total amount of protein was quantified by densitometry and referred to a calibrator (see Materials and Methods). Arrows represent mobility of the molecular weight ladder. Bars represent mean ( $\pm$ SD) of relative human TP protein. Groups and doses (gc/kg) are indicated on the x-axis. **(b)** Adeno-associated virus genome copies per cell in liver DNA extracts measured by qPCR using a human TYMP cDNA-specific probe and referred to the single copy mouse gene, angiogenin-1. Horizontal lines represent the median. **(c)** TP activity measured in liver extracts. Horizontal lines represent the median.

and positively correlated with the dose ( $P < 0.05$ , Spearman's correlation test). A similar increase was observed in the deoxyguanosine triphosphate pool. In contrast, the treatment did not have an impact on dTTP levels.

## DISCUSSION

AAV vectors have been extensively used in gene therapy clinical trials. The recent success of AAV-mediated gene transfer in hemophilia B has shown that the use of a liver-specific AAV vector provides sustained therapeutic levels of coagulation factor IX in humans.<sup>15</sup> The effective AAV-mediated expression of the gene of interest in liver indicates a potential strategy for treatment of genetic metabolic disorders caused by systemic accumulation of toxic metabolites. The feasibility of this approach in ethylmalonic encephalopathy was shown in a preclinical study.<sup>16</sup> This strategy is particularly appropriate for MNGIE, which is caused by systemic accumulation of dThd and dUrd. The molecular defect (TP deficiency) does not need to be corrected in a specific target tissue; instead, the enzyme can exert the catabolic role inside the cell because dThd and dUrd are small water-soluble molecules that readily diffuse across plasma membranes through equilibrative transporters.<sup>17</sup> Our previous results have shown that *TYMP* expression does not require strict regulation, and correction of a limited number of cells suffices to clear the systemic overload of nucleosides.<sup>13</sup>

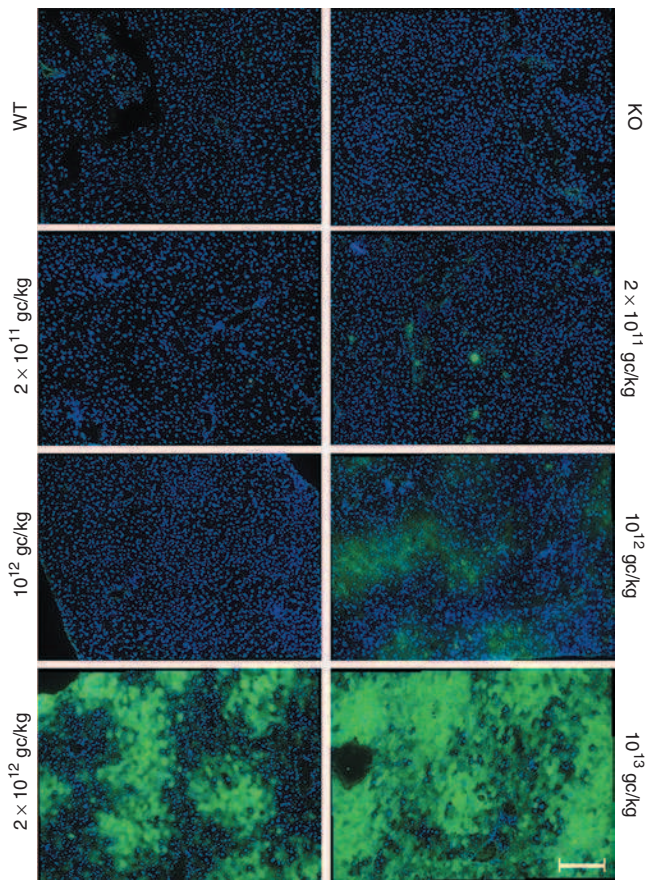
The results reported here with an AAV vector *in vivo* improve our previous results obtained with an *ex vivo* approach using



**Figure 4** Thymidine phosphorylase (TP) activity in tissues other than liver. TP activity measured in blood cells, skeletal muscle, small intestine, lung, brain, spleen, kidney, and heart extracts of wild-type mice, nontreated KO mice, and treated KO mice 34 weeks after vector administration.

lentiviral vectors targeted to the hematopoietic tissue. The use of an integrative vector was necessary to achieve permanent correction because of the high turnover of the hematopoietic cells. Although integrative vectors have been successfully used for clinical purposes, the risk of cancer by insertional mutagenesis, evidenced in some clinical trials, still constitutes a serious concern.<sup>18,19</sup> Among the advantages of AAV vectors are their ability to transduce several tissues and cell types and the fact that they predominantly remain as episomes.<sup>20-22</sup> Although a small percentage can integrate in the host genome, there is no evidence of AAV-induced malignancy.<sup>23,24</sup> The vector used in the present study was designed to correct the enzyme deficiency in liver, since AAV2/8 tropism enables liver transduction among other target tissues<sup>25</sup> and the TBG promoter used ensures liver-specific expression.<sup>26</sup> In our study, a relatively low dose of vectors ( $2 \times 10^{11}$  gc/kg) led to stable transduction in about half of treated mice, with a concomitant reduction in nucleoside levels to normal values in blood

and tissues that was sustained over time. Higher doses resulted in over-reduction: nucleoside levels were lowered to values slightly



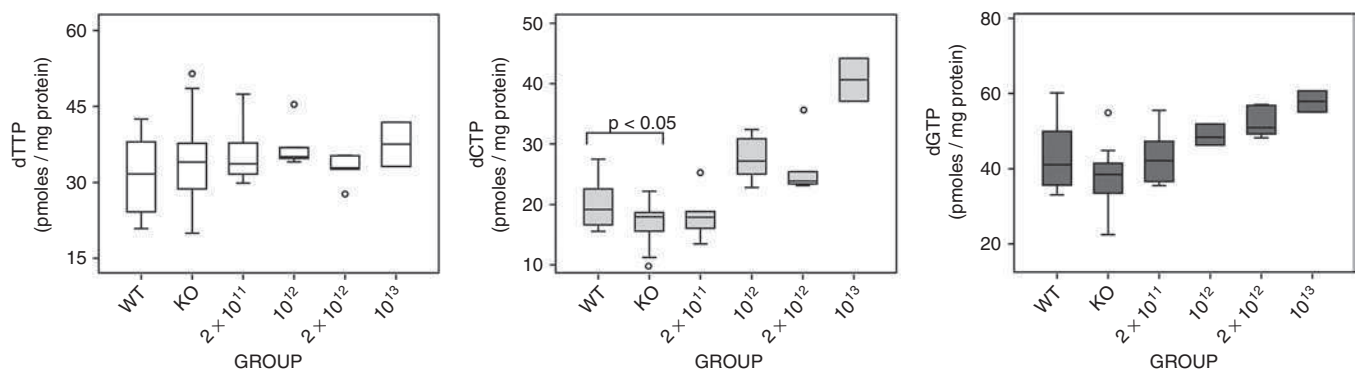
**Figure 5 Liver immunostaining.** Immunofluorescence of liver from wild-type (wt) mice, nontreated KO mice, and KO mice treated with  $2 \times 10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ , and  $10^{13}$  gc/kg. Liver cryosections were stained with an antibody against human thymidine phosphorylase (TP) (green). Each picture shows nine fields arranged in one image of a representative mouse (original magnification per field,  $\times 20$ ). For the  $2 \times 10^{11}$  and  $10^{12}$  gc/kg doses, one mouse with low TP activity (left) and one mouse with high TP activity (right) are shown. Scale bar = 200  $\mu$ m. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue).

below wt levels. hcTYMP copy number per cell and TP activity in liver correlated with the AAV dose. Therefore, very low AAV doses are effective in reducing nucleoside levels, and these doses could be reduced even further if the final therapeutic vector included additional improvements such as codon optimization or a self-complementary configuration.<sup>27</sup> This is of particular importance for patients because low doses minimize any potential risk that may be associated with the treatment.

In contrast to the clear nucleoside reduction observed in liver, skeletal muscle, and brain, dThd and dUrd in small intestine did not reach wt levels in treated animals, and only a slight nonsignificant tendency to reduced nucleosides was observed. Absorption of nucleosides from the diet may be contributing to high concentrations of these compounds in transit through the epithelial cells in the intestinal lumen, which may be more difficult to clear than other tissues. This important point needs further investigation, as the gastrointestinal dysfunction is one of the hallmarks of the disease. Therefore, ensuring the effective nucleoside clearance in this organ may be needed. This animal model is not appropriate to answer this question because it does not recapitulate the gastrointestinal symptoms observed in MNGIE patients.<sup>5</sup> However, the use of alternate promoters or AAV serotypes targeting TYMP expression also in the intestine in the animal model may be helpful to find out whether these approaches are more effective reducing nucleosides in this target tissue.

Interestingly, the reduction in nucleoside levels reached a sustained nadir at doses of  $10^{12}$  gc/kg and higher (range of plasma dThd concentrations 0.2–2.3  $\mu$ mol/l, regardless of AAV dose) suggesting that there may be some type of biochemical mechanism preventing a further decrease in dThd concentration below a certain level *in vivo*. Similar sustained nadirs were observed for dThd and dUrd content in brain and skeletal muscle. However, nucleoside levels were undetectable in liver of mice treated with higher doses ( $10^{12}$  and above), suggesting that the mechanism would be outweighed by the high local TP activities reached in this organ. It is important to note, however, that the animals showed no sign of hepatic toxicity during or at the end of the study.

In MNGIE, dThd excess leads to mitochondrial dNTP imbalance, namely dTTP excess and dCTP depletion.<sup>5,6</sup> The nucleoside decrease achieved by AAV treatment prevented dCTP depletion.



**Figure 6 dNTPs in liver.** Mitochondrial dNTP content in liver of wild-type (wt) mice ( $n = 16$ ), nontreated KO mice ( $n = 14$ ), and KO mice treated with  $2 \times 10^{11}$  ( $n = 6$ ),  $10^{12}$  ( $n = 6$ ),  $2 \times 10^{12}$  ( $n = 5$ ), and  $10^{13}$  gc/kg ( $n = 2$ ). Box plots represent the median (horizontal line), the interquartile range (box), the maximum and minimum (whiskers), and outliers (open circles). Statistical comparisons between wt and KO mice were performed with the Student *t*-test.

Because dThd concentrations were over-reduced in mice treated with the highest doses, a potential adverse effect would be induction of dTTP depletion, but this was not observed in our experiments, indicating that additional mechanisms may be activated to prevent dTTP over-reduction. Regulatory steps in dTTP synthesis, such as the TK2-deoxynucleotidase substrate cycle or thymidylate synthase upregulation, could be involved. However, the treatment induced an unexpected increase in mitochondrial deoxyguanosine triphosphate, paralleling dCTP increases. The reasons for this increase are unknown. Long-term study of these animals will clarify whether this deoxyguanosine triphosphate excess has any negative consequences. Overall, our results indicate that the treatment developed in this study makes it possible to influence the mitochondrial dNTP pool *in vivo*. Dose adjustment would likely allow us to modulate the effect to achieve a final desired balance of dTTP and dCTP.

Although the MNGIE mouse model only recapitulates the biochemical imbalances of the disease and some molecular features in very old animals, it is the best tool available to investigate therapy approaches for MNGIE, by enabling detailed study of the biochemical effects of these approaches. Our results clearly demonstrate that it is feasible to prevent the biochemical disturbances observed in MNGIE with a strategy based on AAV-mediated transfer of liver-targeted *hcTYMP* expression. We propose that this approach should be translated to clinical trials for patients who are not eligible for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

## Materials and methods

**Vector construction, production, and titration.** *hcTYMP* was PCR amplified, cloned into the Pcr2.1 TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA), sequence verified, and finally cloned into the single *EagI* restriction site of the AAV2/8-TBG vector. The virus was produced by the AAV Vector Core of the Telethon Institute of Genetics and Medicine by triple transfection of 293 cells, and was purified by CsCl gradients.<sup>28</sup> Physical titers of the viral preparations (genome copies/ml) were determined by real-time qPCR<sup>29</sup> (Applied Biosystems, Foster City, CA) and dot-blot analysis. The titers obtained with both methods were reasonably consistent (qPCR:  $1.6 \times 10^{13}$  genome copies (gc)/ml; dot-blot analysis:  $2.0 \times 10^{13}$  gc/ml). The mean of the two values was used for dosing the animals.

**Animal procedures.** All animal procedures were performed in accordance with protocols approved by our institutional review board and committee on animal care and use. Eight- to 12-week-old male *Tymp/Upp1* KO mice<sup>5</sup> were treated with a single intravenous injection (tail vein) of AAV2/8-TBG-*hcTYMP*. Four groups of animals were treated with four different doses:  $2 \times 10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ , and  $10^{13}$  genome copies (gc)/kg. Blood samples (ethylene diamine tetraacetic acid) were collected from the saphenous vein 1 week before treatment and every 2–4 weeks after treatment, from 0.5 weeks until 28 weeks after treatment.

**TP activity and nucleoside determination.** Plasma dThd and dUrd concentrations were analyzed by HPLC-UV, as previously described.<sup>13</sup> TP activity and tissue nucleoside concentrations were measured in mice 34 weeks after treatment or in nontreated age-matched mice. After killing the mice by cervical dislocation, tissues were collected and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis. Frozen samples were homogenized in lysis buffer (50 mmol/l Tris-HCl, pH 7.2; 10 ml/l Triton X-100; 2 mmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride; 0.2 ml/l 2-mercaptoethanol) in a Potter homogenizer. The homogenates were centrifuged at 20,000 x g for 30 minutes at  $4^\circ\text{C}$ , and supernatants were separated

into two aliquots. One aliquot was used as described elsewhere for protein determination<sup>30</sup> and TP activity determination.<sup>31</sup> The other aliquot was frozen until used to measure nucleosides by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. To prevent *in vitro* degradation of dThd and dUrd during the homogenization procedure, for samples with TP activities above 100 nmol/hour/mg prot (*i.e.*, all liver samples of mice treated with doses equal or above  $10^{12}$  gc/kg but one) and for all small intestine samples, a second piece of tissue was homogenized in the presence of the 100  $\mu\text{mol/l}$  5-bromouracil (TP inhibitor) for the determination of these nucleosides. Unfrozen supernatants were centrifuged at 20,000 x g for 10 minutes at  $4^\circ\text{C}$  to eliminate any remaining particles, and clean supernatants were deproteinized by ultrafiltration (10 kDa Amicon Ultra filters; Merck Millipore, Billerica, MA) at 14,000 x g and  $4^\circ\text{C}$  for 30 minutes. Five microliters of deproteinized homogenate were injected into an Acquity UPLC-MS/MS apparatus (Acquity UPLC-Xevo TQ Mass Spectrometer; Waters, Milford, MA) using an Acquity UPLC BEH C18 column (100 x 2.1 mm, 130 Å pore, 1.7  $\mu\text{m}$  particle, Waters). The components of the sample were resolved at 0.5 ml/minute through a binary gradient-elution using a saline buffer (20 mmol/l ammonium acetate, pH 5.6) and acetonitrile as follows: 0 to 1.1 minutes, isocratic 100% saline buffer; 1.1 to 5 minutes, gradient from 0 to 13.6% acetonitrile; 5 to 5.1 minutes, gradient from 13.6 to 100% acetonitrile; 5.1 to 6.1 minutes, isocratic 100% acetonitrile; 6.1 to 7.2 minutes, isocratic 100% saline buffer. Eluate components were detected by multiple reaction monitoring, with positive electrospray for dThd (transition mass 242.8 to 127.1, cone voltage 10 V, collision energy 12 eV) and dUrd (transition mass 228.8-113.08, cone voltage 8 V, collision energy 12 eV). Calibration curves made with aqueous standards were processed in parallel, and concentrations were obtained from interpolation of the peak areas.

**Western blot.** Liver protein was extracted in TP activity lysis buffer supplemented with a protease inhibitor cocktail (100  $\mu\text{mol/l}$  4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride, 15 nmol/l aprotinin, 6.5  $\mu\text{mol/l}$  bestatin, 50  $\mu\text{mol/l}$  ethylene diamine tetraacetic acid, 700 nmol/l E-64, 50 nmol/l leupeptin; Sigma-Aldrich, St Louis, MO). In all, 10  $\mu\text{g}$  of protein extracts were electrophoresed on a 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel, transferred to a polyvinylidene difluoride membrane, and probed with an anti-TP rabbit polyclonal antibody (Abcam, Cambridge, UK) and an anti- $\beta$ -actin mouse monoclonal antibody (Sigma-Aldrich), and then with peroxidase conjugated goat anti-rabbit immunoglobulins (Dako, Glostrup, Denmark). Bands were visualized by treating the membranes with the Immobilon Western chemiluminescent kit (Merck Millipore), and quantified using Image J software (NIH, Bethesda, MD). All the TP-to- $\beta$ -actin ratios were referred to the corresponding ratio obtained from a control extract run in all gels and used as a calibrator.

**Immunofluorescence.** Immunofluorescent histological analysis of human TP was performed in 10  $\mu\text{m}$  liver cryosections fixed with acetone:methanol (1:1 v/v). Sections were then blocked with BSA 2% (w/v) in TBS buffer (50 mmol/l Tris-HCl, pH 7.6; 125 mmol/l NaCl) for 30 minutes and incubated with 20  $\mu\text{g/ml}$  anti-TP rabbit polyclonal antibody (Abcam) overnight at  $4^\circ\text{C}$ . After washing, sections were stained with AlexaFluor 488 conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen). Nuclear staining was performed with 1  $\mu\text{g/ml}$  Hoechst 33342.

**Vector copy number.** DNA was extracted from liver with the QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Detection and quantification of vector genome copies per cell were performed by qPCR in the ABI PRISM 7900 sequence detection system (Applied Biosystems). *hcTYMP* DNA was quantified using the predesigned TaqMan MGB gene expression assay Hs00157317\_m1 (Applied Biosystems), and was referred to the single copy nuclear gene *Ang1* using the predesigned TaqMan MGB gene expression assay Mm00833184\_s1 (Applied Biosystems). The quantifications were based on a standard curve prepared with different dilutions of vectors containing *hcTYMP* DNA or a specific region of the *Ang1* gene.

**Liver mitochondrial dNTP quantification.** Liver mitochondria were isolated as previously described.<sup>6</sup> A volume (~0.1–0.3 ml) of suspension with isolated mitochondria containing 0.5 mg protein were treated with trichloroacetic acid (final concentration 0.5 mol/l) and centrifuged at 20,000 x g for 5 minutes at 4 °C. Supernatants were neutralized with 1.5 volumes of 0.5 mol/l tri-N-octylamine in Freon (1,1,2-trichlorotrifluoroethane) and centrifuged for 10 minutes at 10,000 x g at 4 °C. Half the aqueous upper phase was recovered and dried under speed vacuum. Dry dNTP extracts were dissolved in 125 µl of 40 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4) and stored at –80 °C until measurement. For mitochondrial dNTP quantification, we used the polymerase-based assay previously described.<sup>6</sup> In order to characterize the purity of the mitochondrial fractions obtained with our protocol, three additional independent mitochondrial isolations were performed to determine citrate synthase activity as mitochondrial marker,<sup>32</sup> lactate dehydrogenase as cytosolic marker (LDH-L reagent; Thermo Scientific, Louisville, CO) and β-galactosidase and catalase as lysosomal and peroxisomal markers, respectively.<sup>33</sup> Based on the determination of these markers in the raw homogenates and in the mitochondria-enriched fractions, we obtained a 4.3±0.3-fold mitochondrial enrichment and negligible cytosolic contamination (0.78±0.66%). Contamination by lysosomes (65±34%) and peroxisomes (55±10%) was rather high. Overall, the quality of our mitochondrial fraction was good enough for our purposes, because lysosomes and peroxisomes do not contain dNTPs, and cytosol, which contains dNTPs, was virtually eliminated from our preparations.

**Statistical analysis.** Statistical analysis was performed with the SPSS 15.0 software (IBM, Armonk, NY). The tests used are indicated in the figure legends. For statistical purposes, undetectable values were considered as zero.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Figure S1.** Schematic representation of AAV2/8-TBG-hCTYMP.

**Figure S2.** Plasma nucleoside levels at the completion of the study.

**Figure S3.** Absence of liver toxicity in AAV treated mice.

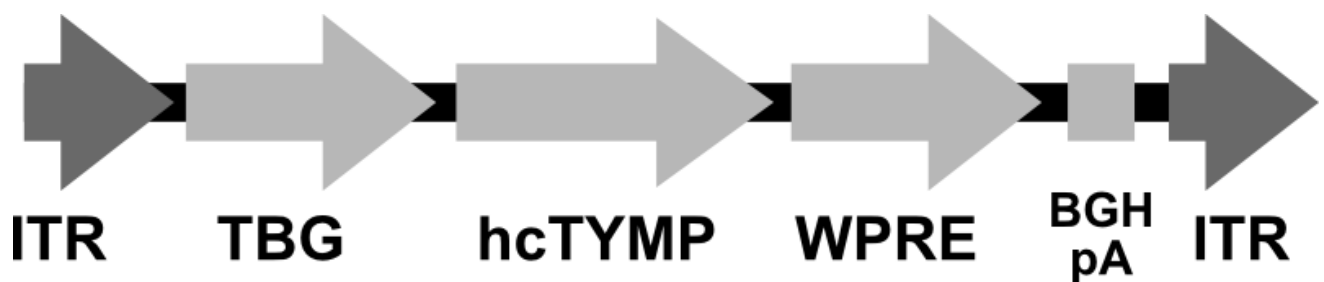
## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (grant PI12/00322 to R.M.), the United Mitochondrial Disease Foundation (postdoctoral grant 12–029 to J.T.), the French Muscular Dystrophy Association-Téléthon (AFMTéléthon, to Y.C.) the Pierfranco and Luisa Mariani Foundation Italy, Telethon-Italy (GPP10005 and GPP11011 to M.Z.), Cariplo (2011-0526 to M.Z.), European Research Council Grant (ERC-322424 to M.Z.), and the Italian Ministry of Health Research Grant (GR-2010-2306-756 to C.V.). There is no conflict of interest to disclose.

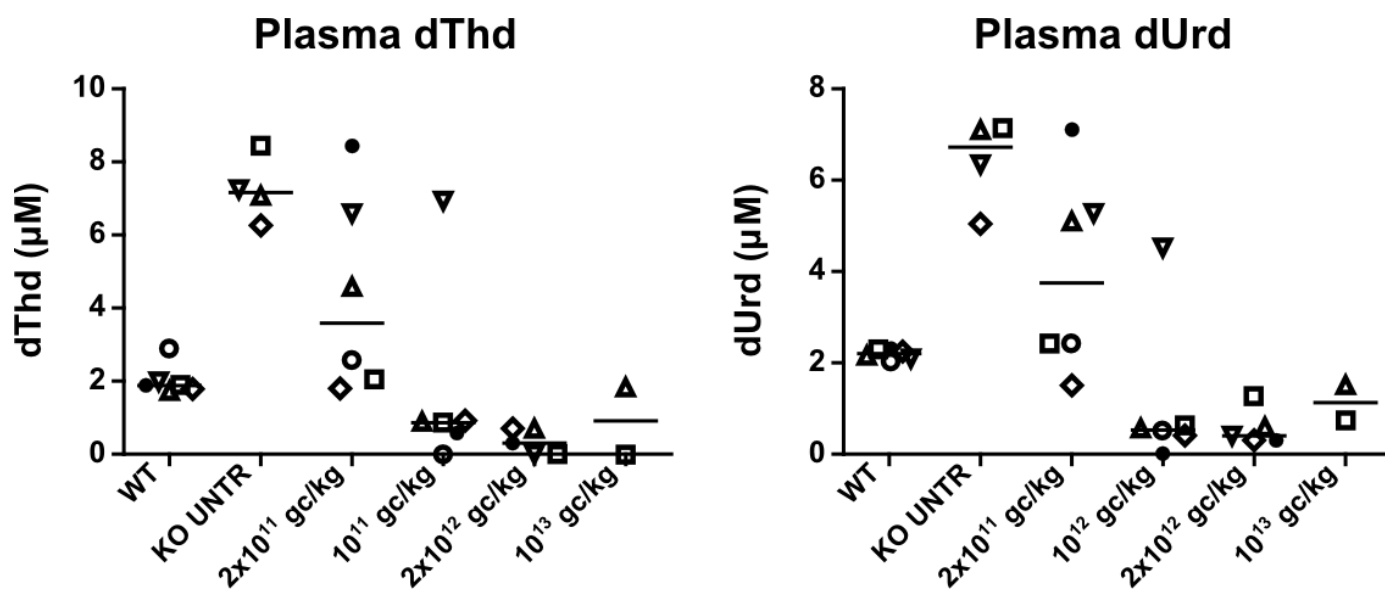
## REFERENCES

- Garone, C, Tadesse, S and Hirano, M (2011). Clinical and genetic spectrum of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain* **134**(Pt 11): 3326–3332.
- Nishino, I, Spinazzola, A and Hirano, M (1999). Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* **283**: 689–692.
- Martí, R, Nishigaki, Y and Hirano, M (2003). Elevated plasma deoxyuridine in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* **303**: 14–18.
- Pontarin, G, Ferraro, P, Valentino, ML, Hirano, M, Reichard, P and Bianchi, V (2006). Mitochondrial DNA depletion and thymidine phosphate pool dynamics in a cellular model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *J Biol Chem* **281**: 22720–22728.
- López, LC, Akman, HO, García-Cazorla, A, Dorado, B, Martí, R, Nishino, I et al. (2009). Unbalanced deoxynucleotide pools cause mitochondrial DNA instability in thymidine phosphorylase-deficient mice. *Hum Mol Genet* **18**: 714–722.
- González-Vioque, E, Torres-Torronteras, J, Andreu, AL and Martí, R (2011). Limited dCTP availability accounts for mitochondrial DNA depletion in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *PLoS Genet* **7**: e1002035.
- Yavuz, H, Ozel, A, Christensen, M, Christensen, E, Schwartz, M, Elmaci, M et al. (2007). Treatment of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy with dialysis. *Arch Neurol* **64**: 435–438.
- Spinazzola, A, Martí, R, Nishino, I, Andreu, AL, Naini, A, Tadesse, S et al. (2002). Altered thymidine metabolism due to defects of thymidine phosphorylase. *J Biol Chem* **277**: 4128–4133.
- Moran, NF, Bain, MD, Muqit, MM and Bax, BE (2008). Carrier erythrocyte entrapped thymidine phosphorylase therapy for MNGIE. *Neurology* **71**: 686–688.
- Lara, MC, Weiss, B, Illa, I, Madoz, P, Massuet, L, Andreu, AL et al. (2006). Infusion of platelets transiently reduces nucleoside overload in MNGIE. *Neurology* **67**: 1461–1463.
- Hirano, M, Martí, R, Casali, C, Tadesse, S, Uldrick, T, Fine, B et al. (2006). Allogeneic stem cell transplantation corrects biochemical derangements in MNGIE. *Neurology* **67**: 1458–1460.
- Halter, J, Schüpbach, WM, Casali, C, Elhasid, R, Fay, K, Hammans, S et al. (2011). Allogeneic hematopoietic SCT as treatment option for patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): a consensus conference proposal for a standardized approach. *Bone Marrow Transplant* **46**: 330–337.
- Torres-Torronteras, J, Gómez, A, Eixarch, H, Palenzuela, L, Pizzorno, G, Hirano, M et al. (2011). Hematopoietic gene therapy restores thymidine phosphorylase activity in a cell culture and a murine model of MNGIE. *Gene Ther* **18**: 795–806.
- Smith, RH (2008). Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther* **15**: 817–822.
- Nathwani, AC, Tuddenham, EG, Rangarajan, S, Rosales, C, McIntosh, J, Linch, DC et al. (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* **365**: 2357–2365.
- Di Meo, I, Auricchio, A, Lamperti, C, Burlina, A, Viscomi, C and Zeviani, M (2012). Effective AAV-mediated gene therapy in a mouse model of ethylmalonic encephalopathy. *EMBO Mol Med* **4**: 1008–1014.
- Kong, W, Engel, K and Wang, J (2004). Mammalian nucleoside transporters. *Curr Drug Metab* **5**: 63–84.
- Stein, S, Ott, MG, Schultze-Strasser, S, Jauch, A, Burwinkel, B, Kinner, A et al. (2010). Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat Med* **16**: 198–204.
- Hacein-Bey-Abina, S, Von Kalle, C, Schmidt, M, McCormack, MP, Wulffraat, N, Leboulch, P et al. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**: 415–419.
- Nakai, H, Iwaki, Y, Kay, MA and Couto, LB (1999). Isolation of recombinant adeno-associated virus vector-cellular DNA junctions from mouse liver. *J Virol* **73**: 5438–5447.
- Kearns, WG, Afione, SA, Fulmer, SB, Pang, MC, Erikson, D, Egan, M et al. (1996). Recombinant adeno-associated virus (AAV-CFTR) vectors do not integrate in a site-specific fashion in an immortalized epithelial cell line. *Gene Ther* **3**: 748–755.
- Flotte, TR, Afione, SA and Zeitlin, PL (1994). Adeno-associated virus vector gene expression occurs in nondividing cells in the absence of vector DNA integration. *Am J Respir Cell Mol Biol* **11**: 517–521.
- Donsante, A, Vogler, C, Muzyczka, N, Crawford, JM, Barker, J, Flotte, T et al. (2001). Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther* **8**: 1343–1346.
- Gauttier, V, Pichard, V, Aubert, D, Kaeppl, C, Schmidt, M, Ferry, N et al. (2013). No tumour-initiating risk associated with scAAV transduction in newborn rat liver. *Gene Ther* **20**: 779–784.
- Zincarelli, C, Soltys, S, Rengo, G and Rabinowitz, JE (2008). Analysis of AAV serotypes 1–9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther* **16**: 1073–1080.
- Tessitore, A, Faella, A, O'Malley, T, Cotugno, G, Doria, M, Kunieda, T et al. (2008). Biochemical, pathological, and skeletal improvement of mucopolysaccharidosis VI after gene transfer to liver but not to muscle. *Mol Ther* **16**: 30–37.
- Nathwani, AC, Gray, JT, Ng, CY, Zhou, J, Spence, Y, Waddington, SN et al. (2006). Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. *Blood* **107**: 2653–2661.
- Xiao, W, Chirmule, N, Berta, SC, McCullough, B, Gao, G and Wilson, JM (1999). Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol* **73**: 3994–4003.
- Gao, G, Qu, G, Burnham, MS, Huang, J, Chirmule, N, Joshi, B et al. (2000). Purification of recombinant adeno-associated virus vectors by column chromatography and its performance in vivo. *Hum Gene Ther* **11**: 2079–2091.
- Bradford, MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254.
- Valentino, ML, Martí, R, Tadesse, S, López, LC, Manes, JL, Lyzak, J et al. (2007). Thymidine and deoxyuridine accumulate in tissues of patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *FEBS Lett* **581**: 3410–3414.
- Medja, F, Allouche, S, Frachon, P, Jardel, C, Malgat, M, Mousson de Camaret, B et al. (2009). Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion* **9**: 331–339.
- Graham, JM (2001). Purification of a crude mitochondrial fraction by density-gradient centrifugation. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3: Unit 3.4.

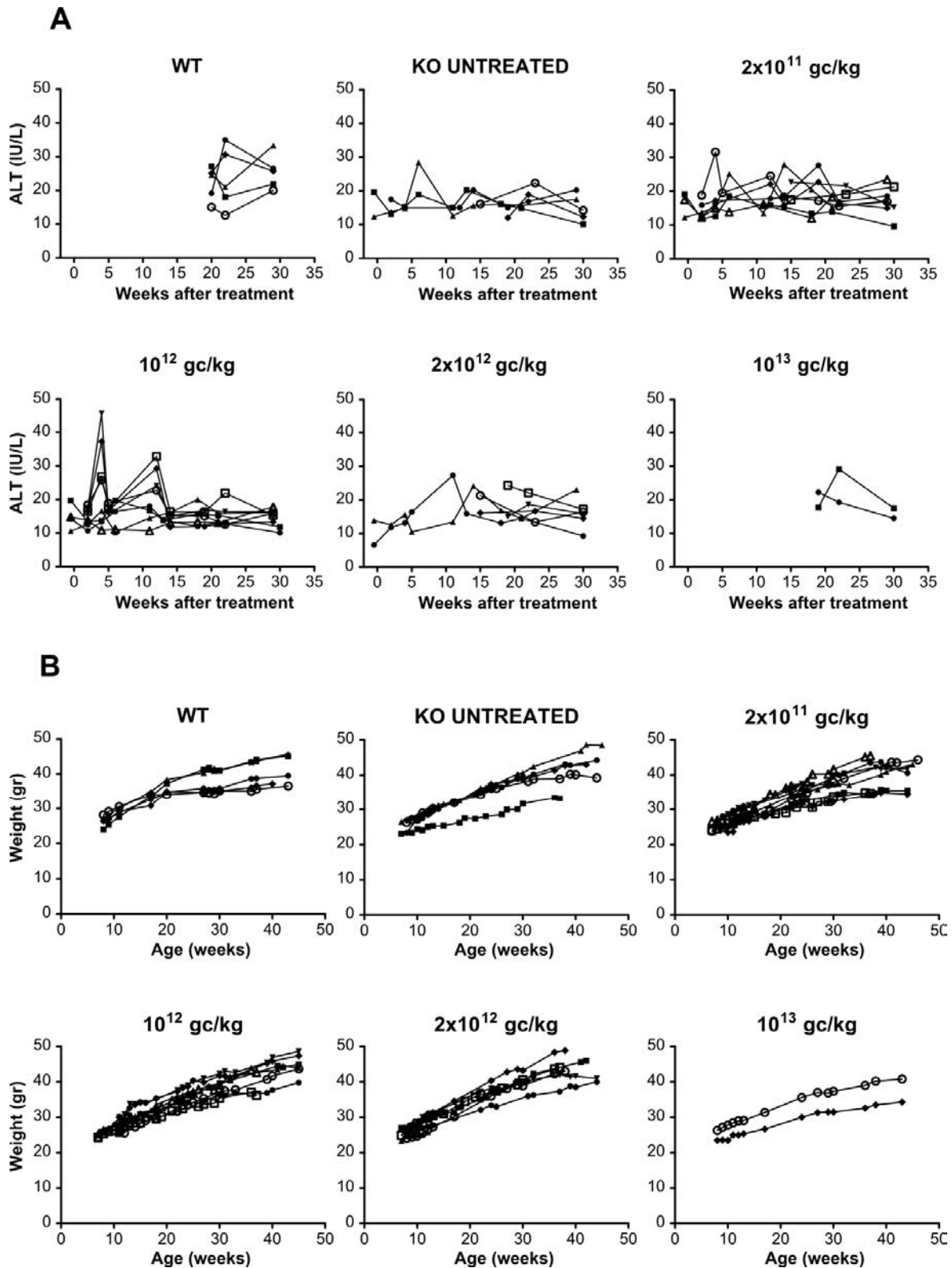




**Supplementary Figure S1.** Schematic representation of AAV2/8-TBG-hcTYMP. BGH pA, bovine growth hormone polyadenylation signal; hcTYMP, human thymidine phosphorylase coding sequence; ITR, inverted terminal repeats; TBG, thyroxine-binding globulin promoter; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element.



**Supplementary Figure S2.** Plasma nucleoside levels at the completion of the study. Plasma dThd and dUrd concentration were measured in samples from intracardiac blood 34 weeks after treatment. Horizontal lines represent median values.



**Supplementary Figure S3.** Absence of liver toxicity in AAV treated mice. (A) Plasma alanine aminotransferase activity (ALT) measured before treatment and at different time-points after AAV injection. (B) Body weight of wt, and treated and non-treated KO mice

# EXPERT OPINION

1. Introduction
2. Therapeutic approaches for MNGIE
3. Conclusions
4. Expert opinion

## Prospective therapeutic approaches in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE)

Raquel Cabrera-Pérez, Javier Torres-Torronteras, Ferran Vila-Julà, Francisco J Ortega, Yolanda Cámara, Jordi Barquinero & Ramon Martí<sup>†</sup>

<sup>†</sup>*Universitat Autònoma de Barcelona, Vall d'Hebron Research Institute, Research Group on Neuromuscular and Mitochondrial Diseases, Barcelona, Catalonia, Spain*

**Introduction:** Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) is caused by mutations in *TYMP*, which encodes thymidine phosphorylase (TP). TP dysfunction leads to systemic overload of thymidine (dThd) and deoxyuridine (dUrd), and altered mitochondrial deoxyribonucleotide homeostasis, which interferes with mitochondrial DNA replication and results in mitochondrial dysfunction. In MNGIE, the clinical phenotype is the consequence of an accumulation of noxious metabolites.

**Areas covered:** Knowledge gained about the pathomechanisms involved in MNGIE has allowed the design of plausible treatments aimed to clear the systemic dThd and dUrd overload. This article describes these strategies, from the first attempts to treat the disease through dialysis, to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT), which has been the most successful treatment in the long term to date. This option, however, is associated with a high risk of severe adverse effects so safer alternatives with long-term efficacy are required such as gene therapy.

**Expert opinion:** The generally poor health of MNGIE patients at the time of treatment aggravates the risks associated with therapies like allo-HSCT. Recently, gene therapy has emerged as a feasible alternative, based on promising preclinical results. To this end, clinical trials should be carefully designed and carried out to investigate the safety and efficacy of this option.

**Keywords:** adeno-associated virus, deoxyuridine, gene therapy, mitochondria, mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy, thymidine, thymidine phosphorylase, *TYMP*

*Expert Opinion on Orphan Drugs (2015) 3(10):1167-1182*

### 1. Introduction

Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) is a rare autosomal recessive disorder characterized by gastrointestinal dysmotility, cachexia, ptosis, progressive external ophthalmoplegia, peripheral neuropathy and leukoencephalopathy [1]. Biochemical and morphological evidence of mitochondrial dysfunction was recognized in the first clinical description of the disease [2], and has since been further studied and characterized [3-8]. This evidence includes lactic acidosis and mitochondrial respiratory chain dysfunction in skeletal muscle (presence of ragged red fibers and cytochrome *c* oxidase-deficient fibers; reduced isolated or multi-complex respiratory chain enzyme activities; and ultra-structurally abnormal mitochondria on electron microscopy) [3-5,8]. Analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) in muscle and other tissues reveals depletion, multiple deletions and somatic site-specific point mutations [5-7].



Taylor & Francis  
Taylor & Francis Group

**Article highlights.**

- Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) is an ultra-rare and severe disorder; most patients die in their early adulthood.
- MNGIE is caused by the toxic effects of accumulated metabolites.
- The only successful treatment for MNGIE resulting in sustained nucleoside normalization and progressive slow clinical improvement is allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, but it is associated to high morbidity and mortality rates.
- Gene therapy has emerged as a promising alternative for treatment of MNGIE, based on positive preclinical results obtained with an adeno-associated virus vector.
- Clinical trials should be implemented to demonstrate the safety and efficacy of gene therapy for MNGIE in patients.
- If safety and efficacy of gene therapy are confirmed for MNGIE in a clinical study, it could serve as a pioneering model for other diseases caused by systemic excess of toxic metabolites.

This box summarizes key points contained in the article.

The ages of onset vary considerably, ranging from 5 months to 65 years. In most cases, patients are diagnosed before the age of 30 (average 18 years) [1]. MNGIE is a progressive and debilitating disease that causes death mainly due to complications derived from patients' poor nutritional status and gastrointestinal dysfunction. Eighty percent of patients die by the age of 40, and the average life expectancy is 35 years [1]. Nevertheless, cases of late-onset MNGIE patients presenting a mild form of the disease have also been reported [9,10].

MNGIE is an ultra-rare disease and its true prevalence is unknown. Fewer than 250 MNGIE patients have been reported worldwide so far, but there are many unreported cases. Approximate calculations underestimate the real prevalence because MNGIE was initially described only 39 years ago [2] and it is probably still under-recognized by many clinicians. Moreover, MNGIE patients are often incorrectly diagnosed with anorexia nervosa, inflammatory bowel disease, superior mesenteric artery syndrome, Whipple disease, chronic intestinal pseudo-obstruction, chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and Charcot Marie Tooth disease [1,11,12]. In addition, cases with atypical features may be difficult to recognize [13-15]. A recent prevalence estimate by Orphanet calculated one MNGIE patient per million in Europe [16]. In this case, however, this value is probably higher than the real prevalence, because one of the limitations of this report based on published data is the tendency to overestimate. Nonetheless, this data is updated every year and probably it will be closer to the real prevalence in coming years.

### 1.1 The genetics of MNGIE

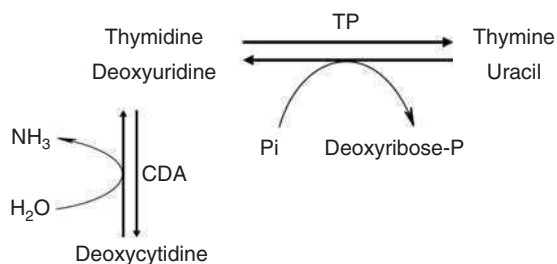
MNGIE is caused by mutations in *TYMP*, which encodes the enzyme thymidine phosphorylase (TP) [3,17]. TP is a

homodimer that catalyzes the phosphorolysis of the pyrimidine deoxyribonucleosides thymidine (dThd) and deoxyuridine (dUrd) into their corresponding bases, thymine or uracil, and 2-deoxy-D-ribose-1-phosphate (Figure 1) [18]. This is the first step in the catabolism of these nucleosides. Indirectly, TP also contributes to the degradation of the third pyrimidine deoxyribonucleoside, deoxycytidine, because it is first converted to dUrd via deamination (Figure 1). In addition, an indirect role in angiogenesis has been proposed for TP, because the 2-deoxy-D-ribose-1-phosphate acts as an endothelial-cell chemoattractant [19,20]. However, no evidence of reduced or dysfunctional angiogenesis has been reported in MNGIE patients.

According to the Human Gene Mutation Database [21] (accessed August 2015), 83 different mutations in *TYMP* have been associated with MNGIE, either in homozygosis or in compound heterozygosis [12,13,22-39], including 52 missense/nonsense, 12 splicing mutations, 11 small deletions, 6 small insertions, 2 small indels and 1 gross deletion. There is no correlation between the mutations and the clinical manifestations, and phenotypic variability has been observed even in siblings with identical genotypes [40], suggesting that unknown genetic or environmental factors may affect the phenotype.

### 1.2 Molecular pathomechanisms of the disease

In typical MNGIE patients, mutations in *TYMP* produce severe TP deficiency (activity below 10% of values of healthy controls) [41,42], although cases of partial TP deficiency have been reported, which results in a late-onset presentation of the disease [9,10]. As a consequence, systemic levels of the substrates of the enzyme, dThd and dUrd, are drastically increased both in plasma and all tissues studied from patients [41-44]. Plasma dThd and dUrd levels are around 1 – 2  $\mu\text{mol/l}$  in late-onset patients [9,10], and between 2 and 25  $\mu\text{mol/l}$  in typical MNGIE patients [41,42], while they are undetectable (below 0.05  $\mu\text{mol/l}$ ) in healthy individuals and asymptomatic *TYMP* heterozygous mutation carriers [41]. In MNGIE patients, the systemic excess of dThd and dUrd interferes with the correct replication of mtDNA. These nucleosides are widely distributed in the human body, specifically the total body water volume [45], in keeping with the fact that they are water-soluble compounds that readily pass across cell membranes via nucleoside transporters present in many cell types [46]. These include the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1), which is present in liver, spleen, adipose cells, brain, colon and other tissues. hENT1 has also been identified in the inner membrane of mitochondria [47,48]. There is a large body of *in vitro* and *in vivo* experimental evidence demonstrating that dThd excess results in imbalances of mitochondrial deoxyribonucleoside triphosphates (dNTP), specifically increased thymidine triphosphate (dTTP) and secondary decrease of deoxycytidine triphosphate (dCTP) [49-53]. Imbalanced mitochondrial dNTPs interfere with correct mtDNA replication, which results in somatic



**Figure 1. Role of TP in the catabolism of pyrimidine deoxyribonucleosides in humans.** The reaction catalyzed by TP is thermodynamically reversible, but the catabolic direction is the physiologically predominant. TP indirectly contributes to deoxycytidine degradation, because it is first converted into deoxyuridine via deamination.

CDA: Cytidine deaminase; Pi: Inorganic phosphate; TP: Thymidine phosphorylase.

quantitative and qualitative alterations of this molecule (mtDNA depletion, multiple deletions and point mutations). These molecular aberrations are observed in several tissue types of MNGIE patients, and ultimately result in respiratory chain dysfunction and the clinical phenotype [5-7] (Figure 2).

Taken together, these observations support the notion that MNGIE is a disorder caused by the toxic effects of metabolite accumulation. In healthy individuals, dThd and dUrd are catabolized by cells and tissues that express high levels of TP (platelets, placenta, lymph node, spleen, liver, lung and peripheral lymphocytes). By contrast, TP is absent or expressed at very low levels in skeletal muscle [54], which is a tissue clearly affected in patients with the disease. The systemic accumulation of dThd and dUrd in MNGIE patients provided an explanation to this apparent paradox: skeletal muscle is affected, not because of its TP dysfunction, but rather due to the toxic effects of dThd and dUrd overload (Figure 3).

### 1.3 Therapies are aimed at reducing dThd and dUrd levels

The toxic nature of the disease is consistent with some of the clinical and molecular features of MNGIE. In contrast with other mtDNA depletion and deletion syndromes, MNGIE is a relatively late-onset disorder, especially when compared with those caused by mutations in other genes involved in dNTP metabolism [55-57]. It was hypothesized that progressive mtDNA changes are produced by the persistent toxic effects of dThd and dUrd overload on mtDNA replication [42,58]. Once the proportion of defective mtDNA reaches a critical threshold, tissue-specific mitochondrial dysfunction manifests clinically. The observation that mtDNA depletion is especially pronounced in the smooth muscle cells of the *muscularis propria* external layer of the stomach and the smooth intestine supports this notion and accounts for the gastrointestinal dysmotility in MNGIE patients [59,60].

Based on this evidence, almost all therapeutic approaches have been aimed so far at reducing the systemic overload of dThd and dUrd (Table 1). Two different strategies have been tried in patients. The first one was to use dialysis, because dThd and dUrd are ultrafiltratable molecules. The second strategy encompasses those options based on enzyme replacement using different means. Evidence from heterozygous carriers of *TYMP* mutations, who are asymptomatic with TP activities as low as 25 – 35% of that of healthy controls [41,42], suggests that only partial restoration of the total body enzyme activity should suffice to prevent or slow down the progression of the disease.

The only strategy that to date has demonstrated to be effective in the long term is allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) [61-63]. However, this procedure is associated with serious risks, and high morbidity and mortality rates have been observed in MNGIE patients undergoing this procedure. In the next sections, the current therapy options are described and discussed, as well as those strategies at the preclinical stage which have potential application in the treatment of MNGIE. Finally, based on very promising preclinical results, a gene therapy clinical trial using a liver-targeted adeno-associated virus (AAV) vector is proposed.

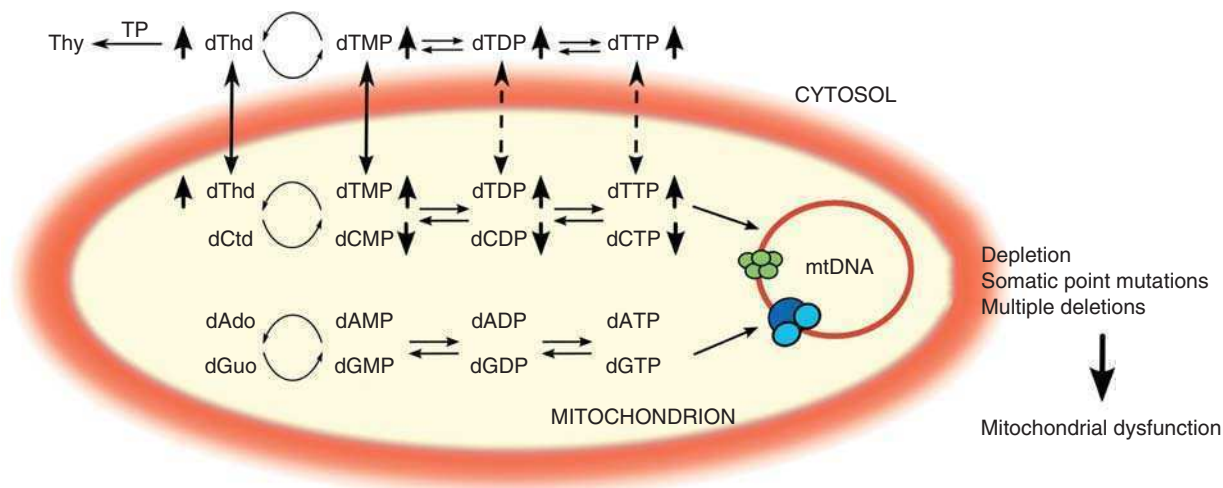
## 2. Therapeutic approaches for MNGIE

As indicated above, therapy approaches for MNGIE are always aimed at lowering dThd and dUrd concentrations to normal levels, either by removing these molecules using dialysis, or by employing different strategies for the transient or permanent replacement of the enzyme in patients.

It is worth remarking that, in MNGIE, the mitochondrial dysfunction is a consequence of the cumulative toxic effect of nucleoside overload on mtDNA. While it might be expected that mtDNA depletion, which is probably a major contributing factor to the gastrointestinal dysmotility [59,60], be prevented and even reverted upon restoration of nucleoside homeostasis, other mtDNA somatic alterations such as multiple deletions and point mutations are less likely to be reversible. Therefore, the expected effect of the nucleoside homeostasis normalization on the clinical phenotype is to halt the progression of the disease, likely followed by a slow improvement as fully functional mtDNA molecules recover in affected tissues. Unfortunately, MNGIE patients are often in a poor clinical condition at the time of diagnosis. For this reason, it is strongly advisable to initiate the treatment as early as possible after diagnosis to prevent further and perhaps irreversible mtDNA damage.

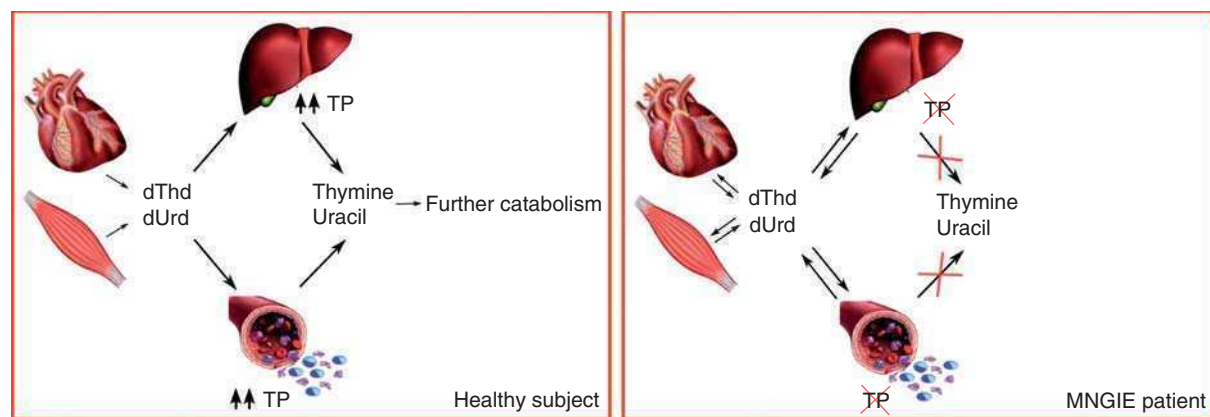
### 2.1 Hemodialysis and peritoneal dialysis

After the genetic and biochemical cause of the disease was found [3,17,42], hemodialysis was the first therapeutic attempt tested in MNGIE patients [42]. Given the chemical nature of the molecules to be cleared, this seemed the most obvious and straightforward approach. Actually, MNGIE patients



**Figure 2. Effects of dThd excess on mitochondrial nucleotide homeostasis and on mitochondrial DNA replication.** TP dysfunction results in dThd accumulation, which leads to dTTP excess and dCTP depletion. This imbalance interferes with mtDNA replication producing depletion, somatic point mutations and multiple deletions in mtDNA, which result in mitochondrial dysfunction.

dThd: Thymidine; dCtd: Deoxycytidine; dAdo: Deoxyadenosine; dGuo: Deoxyguanosine; TP: Thymidine phosphorylase.



**Figure 3. Schematic representation of dThd and dUrd homeostasis in humans.** dThd and dUrd generated from normal metabolism in tissues with low *TYMP* expression such as skeletal muscle or heart, are catabolized by cells and tissues where *TYMP* is expressed at high levels (platelets, white blood cells, liver), which maintains systemic dThd and dUrd concentrations at low levels. In MNGIE, the absence of TP results in systemic dThd and dUrd overload, which exerts a toxic effect on mitochondria of all tissues.

dThd: Thymidine; dUrd: Deoxyuridine; MNGIE: Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy; TP: Thymidine phosphorylase.

excrete high amounts of nucleosides in urine [42,64], although biochemical evidence indicates that reabsorption of the filtered compounds also occurs [42]. The ability of hemodialysis to reduce dThd concentrations (the only nucleoside monitored at that time) to half of pre-dialysis values confirmed that dThd is ultrafiltratable [42]. However, only 3 h after the procedure, plasma dThd concentrations returned to initial values, unveiling the high metabolic rate of this nucleoside, which exceeds the ability of the dialysis to efficiently clear the nucleoside from blood. It should be also

noted that, ideally, nucleoside concentrations should reach levels similar to those found in healthy subjects (i.e., undetectable values, below 0.05 μM). But plasma dThd concentrations achieved after the hemodialysis, although partially reduced, still remained within the micromolar range. Weekly repeated hemodialysis did not improve the result, thus indicating that hemodialysis is not a feasible approach to treat MNGIE [42].

Although transiently, hemodialysis was able to reduce nucleoside levels in MNGIE patients. For this reason,

Table 1. Summary of therapeutic approaches developed to date for the treatment of MNGIE.

Therapy	Patients reported	Advantages	Limitations	Ref.
Hemodialysis	2	Partial nucleoside clearance observed	Transient effect ( $\approx$ 3 h). Hospitalization required	[42]
Peritoneal dialysis	2	Partial nucleoside clearance observed in one case. Clinical improvement reported	Transient effect. Inconsistencies in plasma nucleoside reduction. Infectious complications. Metabolic complications. Technique failure	[65,66]
Platelet infusions	3	Partial nucleoside clearance observed	Transient effect (very short half-life). Risk of disease transmission. Risk of immune response	[64]
EE-TP	3	Partial nucleoside clearance. Clinical improvement reported	Transient effect. Expensive treatment	[68,72,73]
Allo-HSCT	24	Sustained normalization of nucleoside levels. Clinical improvement reported. Potentially curative treatment	Compatible donor required. Toxic conditioning. Risk of severe adverse effects. Restrictive inclusion criteria (severely affected patients excluded). High morbidity and mortality rates	[61-63]
Inhibition of renal nucleoside reabsorption	-	Pharmacological noninvasive treatment	Difficulty of achieving target specificity	[42]
Increase of deoxycytidine availability	-	Pharmacological noninvasive treatment	Risk of additional nucleoside/nucleotide imbalances	[50,77]
TP-polymeric nanoreactors	-	Expected partial or total nucleoside clearance, based on <i>in vitro</i> results	Transient effect. Risk of inflammatory effect (detected <i>in vitro</i> ). Expensive treatment	[78,79]
Liver transplantation	-	Liver is rich in TP. Expected partial or total nucleoside clearance, based on <i>in vitro</i> results. Potentially curative treatment	Compatible donor required. Invasive treatment. Risk of rejection.	[76]
Gene therapy	-	Expected partial or total nucleoside clearance, based on preclinical <i>in vivo</i> results. Noninvasive treatment. Therapy likely to be improved (new vectors). Potentially curative treatment	Immunosuppressants required High proportion of non-eligible patients (neutralizing antibodies). Risk of immune response	[101,116]

Allo-HSCT: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; EE-TP: Erythrocyte entrapped TP; MNGIE: Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy; TP: Thymidine phosphorylase.

continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) was also proposed and tested [65,66]. CAPD is a generally well-tolerated procedure, which can be performed in an outpatient setting. Improvement of clinical symptoms was reported in two patients undergoing CAPD over several months or years. In both reports, gastrointestinal function improved (stopped vomiting, reduced nausea and/or abdominal pain, gained weight). Other improvements were resuming menstruation [66] and numbness resolution [65]. Remarkably, the reduction of plasma nucleoside levels was negligible [66] or only moderate [65]. In one of the cases, nucleoside levels increased again to pre-dialysis values or above 15 months after the initiation of CAPD [65]. Indeed, the authors proposed to use CAPD only as a supportive treatment to improve the pre-transplant clinical condition before undertaking allo-HSCT. Despite these positive reports, no additional cases of treatment of

MNGIE patients with CAPD have been reported to date. More data is needed to further confirm to which extent CAPD can be useful and for how long this procedure can be maintained in MNGIE patients.

## 2.2 Infusion of platelets from healthy donors

TP was formerly known as platelet-derived endothelial cell growth factor, because human platelets are very rich in this enzyme and contribute to pyrimidine deoxyribonucleosides catabolism in blood [18,54]. Based on this, it was tested whether the infusion of platelets from healthy donors would have a positive biochemical effect in reducing dThd and dUrd in MNGIE patients [64]. The results showed that platelets provide sufficient circulating TP activity to reduce, although transiently, dThd and dUrd nucleosides from blood. The short half-life of platelets in blood (8 – 9 days), which is



even lower for transfused platelets from donors [67], obviously accounted for the limited time lapse of this effect. Although platelet infusion was not intended to become a permanent treatment for patients, data from *in vitro* and *in vivo* studies using platelet infusions provided the proof of concept that restoration of blood TP activity in MNGIE patients could reduce nucleoside concentrations to undetectable levels [64].

### 2.3 Erythrocyte entrapped TP

A new approach based on the use of erythrocyte entrapped TP (EE-TP) was proposed in 2008 [68]. This proposal follows the strategy and the methodology previously used by the same group to treat patients with severe combined immunodeficiency due to adenosine deaminase (ADA) deficiency, as an alternative to the classical enzyme-replacement method based on the use of polyethylene glycol-conjugated (pegylated) ADA [69]. The strategy consists of the *ex vivo* encapsulation of TP protein within patients' erythrocytes using a hypo-osmotic dialysis technique [70]. Then, erythrocytes containing TP are resuspended in plasma and returned to the patient by intravenous infusion. As the erythrocyte membrane is permeable to nucleosides, they can freely enter into the cell to be catabolized by the EE-TP. Furthermore, preclinical studies showed that encapsulation prevents the formation of neutralizing antibodies against TP and maintains enzyme activity throughout the erythrocyte life span [71].

Three patients have been reported to be treated with this method so far [68,72,73], although the effect of the treatment has been detailed only in two of them [68,72]. The first one was in very poor clinical condition at the time of the treatment, and was treated with a single infusion, but died of pneumonia 21 days after the treatment [68]. The second patient was treated with approximately monthly infusions, and objective signs of clinical improvement were observed during the studied time. The follow-up period reported included 30 cycles of treatment, and plasma dThd and dUrd levels were cyclically reduced, but most trough concentrations remained above 5  $\mu\text{mol/L}$ , which are in the range of many typical MNGIE patients [41,42], and most peak values were similar to those observed before the initiation of the treatment [72]. Thus, the efficacy of this treatment is only partial and needs to be improved, because plasma nucleoside concentrations do not reach values below the micromolar range during most of the treatment period. On the other hand, this case illustrates a correlation between moderate and cyclic reductions of plasma nucleoside levels and signs of clinical improvement in MNGIE.

Although only limited data is available, treatment of MNGIE with EE-TP is an option to be considered because it has been associated with a positive clinical effect in one of the three patients reported. In this patient, there were improvements in gait and balance, sensory ataxia, and fine finger function. Body weight increased and plasma creatine kinase activity was reduced. Numbness in hands and feet also resolved. However, nerve conduction and

electromyography studies did not show any significant changes [72]. These observations make EE-TP a potential maintenance treatment to improve the health status of patients before allo-HSCT, or when patients do not fulfill eligibility criteria for allo-HSCT. However, there are some issues that should not be forgotten, such as the requirement of monthly repeated administrations, which probably makes EE-TP a very expensive therapy, or the fact that nucleoside reductions cases are suboptimal.

### 2.4 Allogeneic hematopoietic stem cells transplantation

In 2006, Hirano *et al.* proposed allogeneic hematopoietic stem cells transplantation (allo-HSCT) as a potential curative treatment for MNGIE [62]. The rationale for this strategy was based on the fact that platelets and white blood cells are among the human cells with higher TP content [18,54]. The notion that allo-HSCT would be a suitable strategy for MNGIE was supported by the previous results obtained with platelet infusions [64]. Allo-HSCT should provide long-term allogeneic TP enzyme replacement to patients and decrease their nucleoside levels. In this regard, it is important to be aware that, as already mentioned, only partial restoration of the total body TP activity should suffice to prevent the clinical phenotype, as demonstrated by the absence of clinical symptoms in heterozygous carriers of *TYMP* mutations.

In the first report, allo-HSCT was performed in two patients. In the first patient, donor cells failed to engraft and the patient died 86 days after transplant from disease progression complicated by sepsis and respiratory failure. By contrast, the second patient achieved mixed hematopoietic chimerism, which partially restored buffy coat TP activity and lowered plasma nucleosides to undetectable or barely detectable concentrations [62]. Since this proof of concept, several patients have been treated with allo-HSCT, and the results are reported in a retrospective analysis of 24 MNGIE patients undergoing allo-HSCT [63]. This report revealed that, in the patients that engrafted and survived for more than 2 years after transplantation, there are improvements in the body mass index, the gastrointestinal manifestations and the peripheral neuropathy. However, only nine patients (37.5%) were alive at the time of last follow-up. Of the 15 patients who did not survive, 9 died due to transplant-related causes (including graft-versus-host disease, transplant-related toxicity or infection) and 6 due to complications of the primary disease [63].

Allo-HSCT has serious limitations, including: i) the difficulties in obtaining suitable donors, ii) the fact that patients are generally in a poor medical condition with a very limited capacity to deal with transplant-related complications, iii) the risk of graft rejection, with the need of an adequate conditioning and immunosuppression, which are highly toxic, iv) the risk of graft failure and graft-versus-host disease,

v) the fact that gastrointestinal function is disturbed with potential impairment of absorption, thus requiring parenteral administration of drugs and vi) the fact that many drugs used in allo-HSCT have unknown effects on mitochondrial function.

As a consequence of all these risks, treatment of MNGIE with allo-HSCT is associated with unacceptably high morbidity and mortality rates, as evidenced by the retrospective analysis of the patients treated so far [63]. Given these risks and limitations, a proposal of standardized protocol was generated after a consensus conference collecting all the experience accumulated by physicians that had treated MNGIE patients worldwide [61]. It is important to remark that so far allo-HSCT is the only potentially curative treatment able to improve clinical manifestations over time, with an ongoing clinical trial to study the safety of the procedure when a strict protocol and inclusion criteria are followed [74].

From the experience gained in the last 10 years, including the consensus recommendations and the results observed in the patients treated so far, it can be concluded that allo-HSCT should be considered only for carefully selected patients before severe organ damage has occurred. Patients with history of gastrointestinal pseudo-obstruction, perforation and/or liver disease should be excluded. In addition, this treatment should be restricted to patients with an optimal donor available, ideally a HLA-identical related individual [61,63,75].

## 2.5 Approaches under preclinical investigation

The above-discussed therapies have all been tested in MNGIE patients, usually as experimental procedure and compassionate use. In the case of allo-HSCT, there is an ongoing clinical trial in the recruitment phase (see above). However, other potential strategies have also been proposed in the past years, although none of them have been clinically evaluated yet [42,50,76-79].

One of such potential strategies is the pharmacological inhibition of renal reabsorption of dThd and dUrd. When causative mutations in *TYMP* were identified [17] and TP deficiency was first biochemically characterized [42], the results revealed that reabsorption of nucleosides might contribute to the high levels of these compounds found in MNGIE patients. Plasma dThd is ultrafiltratable, because it was reduced by hemodialysis similarly to freely dialyzable molecules. However, the renal clearances of this nucleoside were very low compared with the clearance of creatinine, indicating that most of the filtered nucleoside is reabsorbed [42]. Therefore, blocking renal dThd and dUrd reabsorption, thereby increasing urinary elimination of these nucleosides, would contribute to prevent nucleoside overload in MNGIE patients. Several descriptions of the kinetics and pharmacological properties of nucleoside transporters in the cell have been published and multiple drugs can inhibit the function of these carriers (reviewed in [46,80]). The main challenge for this approach would be to find the drugs that selectively inhibit pyrimidine deoxyribonucleoside reabsorption, without disturbing the physiological renal transport of other compounds. The use of animal models would

constitute an easy tool to investigate this approach with different candidate drugs.

More recently, another potential pharmacological approach has been proposed, aimed at increasing deoxycytidine availability in patients, in order to prevent mitochondrial dCTP depletion. Two different *in vitro* models have provided evidence that dCTP depletion is the direct cause of dThd-induced reduction of mtDNA copy number in MNGIE [50]. Therefore, increasing dCTP availability is expected to prevent mtDNA depletion. It should be noted here again that all observations indicate that mtDNA depletion is, among the other somatic mtDNA alterations (multiple deletions and point mutations), the most important contributor to mitochondrial dysfunction and the clinical phenotype in MNGIE. This notion derives from the observation that most diseases associated with mtDNA multiple deletions are usually adult disorders, with moderate phenotype [81-84]; by contrast, cases associated with profound mtDNA depletion are often severe and with infantile onset [55-57,85-90]. Furthermore, gastrointestinal dysmotility, the most debilitating feature of MNGIE, is associated with pronounced mtDNA depletion in the gastrointestinal smooth muscle [59,60]. The administration of deoxycytidine and/or tetrahydrouridine (an inhibitor of its catabolism) would prevent dThd-induced mitochondrial dCTP depletion, as shown *in vivo* using the animal model of MNGIE, and would restore mtDNA copy number, as shown in human cultured cells [50,77]. However, the optimal way to provide this precursor and/or inhibition of its catabolism will have to consider the intricate metabolic interconnections between cytosolic and mitochondrial enzymes of dNTP metabolism. In fact, deoxycytidine supply alone would probably have a rather undesired biochemical effect, that is, an additional increase of dUrd as a product of fast deoxycytidine deamination by cytidine deaminase [91]; therefore, the combination with cytidine deaminase inhibitors would be needed. In any case, deoxycytidine supply and/or inhibition of its catabolism would only prevent dCTP depletion, but would not eliminate dThd and dUrd excess (which contributes to mtDNA mutations other than depletion); hence, this strategy is proposed as a maintenance treatment before a more enduring alternative can be applied to patients.

An alternate strategy to provide enzyme replacement was based on the use of polymeric nanoreactors [78,79]. This strategy consists of the manufacture of enzyme-loaded nanoparticles, made with an amphiphilic copolymer, permeabilized by incorporating the bacterial nucleoside transporter T<sub>5x</sub> into the polymeric capsule, which allows the transport of the substrates (dThd and dUrd) and products of the reaction to be exchanged across the capsule wall. *In vitro* experiments demonstrated that TP-loaded nanoreactors were enzymatically active and stable in blood serum at 37°C, and did not produce cytotoxicity when incubated with hepatocytes, nor induce a macrophage-mediated inflammatory response *ex vivo*, or after intraperitoneal administration in C57BL/6 mice [78,79]. However, further investigations are

needed to confirm the feasibility of this approach, which would work by means of periodic infusions of the nanoreactor preparations, according to the half-life in patient's blood.

The most recent proposed strategy to treat MNGIE is orthotopic liver transplantation [76]. Human liver is very rich in TP, as evidenced by several studies in which TP protein levels or TP activity was assessed in different cells and tissues [44,54,76]. In fact, according to these reports, the amount of TP in liver may be higher than that found in buffy coats from blood. Moreover, liver functions as a metabolic clearing organ for a wide range of endogenous metabolites or exogenous drugs. After successful engraftment, allo-HSCT provides sufficient TP activity to reduce plasma dThd and dUrd concentrations to undetectable or barely detectable levels. Thus, similar results can be expected after liver transplantation, considering that the total amounts of restored TP should be in a similar range as the amounts reached after allo-HSCT, if not higher. Therefore, liver transplantation can be regarded as a potential long-term cure of the disease, but the potential benefits and risks of liver transplantation as compared with allo-HSCT will have to be considered. Liver transplantation is an aggressive intervention and most patients require lifelong immunosuppression. Although the mortality risk associated to the surgical procedure have shown constant improvements, they are not negligible, and the mortality rates at 90 days associated with liver transplantation can be estimated around 10% [92,93].

## 2.6 Gene therapy

During the last decade, gene therapy has re-emerged as an alternative strategy to treat many diseases, due to a better understanding of the diseases and of the factors involved in past pitfalls associated with the use of retroviral vectors [94-97] and the current improvement in available vectors, which has provided safer and more effective tools leading to recent successes in clinical practice [98,99].

The use of gene therapy is particularly appropriate for MNGIE for several reasons. MNGIE is a monogenic disorder, and there is no need for a specific target organ, as the molecular defect (TP deficiency) can be corrected in any tissue or cell type, provided that this correction takes place in a sufficient number of cells. The enzyme does not need to be secreted because its substrates are small water-soluble molecules that readily diffuse across plasma membranes through equilibrative transporters. Moreover, the correction of a limited number of cells providing enough TP activity can be sufficient to clear the systemic overload of nucleosides, as found in asymptomatic heterozygous carriers with 25 – 35% of normal TP activity.

Based on this, and considering that treating MNGIE with allo-HSCT presents serious risks of severe adverse effects, it has been hypothesized that gene therapy can be useful in MNGIE patients and a good alternative to currently available treatments. Two different preclinical gene therapy approaches for MNGIE have been carried out, using both cultured cells from MNGIE patients and the murine model of the disease,

the *Tymp/Upp1* double knockout (dKO) mouse, which recapitulates the biochemical imbalances of the disease [51]. Although this murine model has some limitations (the main one is that the mice do not develop any detectable clinical alterations unless they are exposed to dietetic nucleoside overload, as recently reported [100]), it is nowadays the only available tool for *in vivo* preclinical studies on this disease.

### 2.6.1 Proof of concept using a lentiviral vector

Using this animal model, it was first showed that gene therapy using a lentiviral vector targeting hematopoietic progenitor cells can correct the biochemical abnormalities in sublethally myeloablated mice [101]. This proof-of-concept study demonstrated that the transduction of the human *TYMP* gene can restore TP function and dThd and dUrd homeostasis both *in vitro* and *in vivo*. In this work, with the aim of testing the feasibility of gene therapy for MNGIE, TP-deficient B-lymphoblastoid cells obtained from MNGIE patients were transduced with a lentiviral vector carrying the human *TYMP* DNA coding sequence under the control of the constitutive promoter of the human phosphoglycerate kinase. This construct restored TP activity in the cells and normalized dThd and dUrd homeostasis in the culture. Additionally, lentiviral-mediated hematopoietic gene therapy was used in partially myeloablated dKO mice. High levels of TP activity were observed in the peripheral blood of the transplanted mice, with a concomitant reduction of nucleoside concentrations, even in animals with levels of molecular chimerism as low as 8 – 10% (measured in the peripheral blood). From these results, it was concluded that the alteration of dThd and dUrd homeostasis due to TP deficiency can be prevented by transducing the *TYMP* gene using gene therapy, providing the first proof of concept that gene therapy could become an alternative treatment for MNGIE. It should be noted here that, in mice, the hematopoietic cells constitute an ectopic target for the expression of the gene, as TP activity in murine buffy coats is very low, in contrast to the high activities observed in humans [101]. Therefore, this first study also demonstrated that, as initially hypothesized, transducing the *TYMP* gene to a surrogate target tissue is effective.

Although gene therapy using lentiviral vectors could overcome some of the limitations and risks associated with allo-HSCT, it generates new potential risks that cannot be ignored. The above-mentioned strategy would involve reinfusion of autologous hematopoietic progenitors that were first transduced *ex vivo* with the lentiviral vector, which require some myelosuppression and poses some risks for patients. In addition, lentiviral vectors are integrative and thus a potential cause of insertional oncogenesis for patients. In this regard, it should be noted that, in MNGIE patients and dKO mice, *TYMP* is not only the therapeutic gene, but it can also behave as a suicide gene for cells expressing or overexpressing TP, as this enzyme is necessary to convert the prodrug capecitabine into 5-fluorouracil, a highly toxic drug [102]. This represents a safeguard mechanism in case of oncogenic events related to

the gene therapy procedure, since the tumor cells will necessarily derive from TP transduced cells, which in these particular patients will be the only ones sensitive to the prodrug.

### 2.6.2 Use of AAV vectors

In order to bypass or attenuate the risks associated with the use of an *ex vivo*-based gene therapy using a lentiviral vector, a safer alternative has been explored by using an AAV vector transcriptionally targeted at the liver to express human TP in hepatocytes (Figure 4). Among the advantages of AAV vectors is the fact that they predominantly remain as episomes in the host cells. Although a very small percentage can integrate into the host genome, there is no clear evidence that AAV vectors can be oncogenic in humans, at least under the conditions normally used in gene therapy clinical trials [103,104]. The fact that AAV vectors are not integrative makes them safer than lentiviral vectors, but limits the use of AAV to non-dividing tissues. Lentiviral vectors replicate as the cells divide because they are integrated in the genome, but episomal AAVs do not replicate; the copy number dilutes as cells divide. Therefore, the therapeutic effect would be reduced in non-quiescent tissues over time.

AAVs have been extensively used in such clinical trials [105-112]. The success of AAV-mediated gene transfer in hemophilia B has shown that an AAV vector can provide sustained therapeutic levels of coagulation factor IX in humans for several years [98,99]. The effective AAV-mediated expression of the gene of interest in the liver indicates a potential strategy for treatment of genetic metabolic disorders caused by systemic accumulation of toxic metabolites. In fact, the feasibility of this approach for the ethylmalonic encephalopathy (another metabolic and mitochondrial disease) and for mtDNA depletion syndrome caused by MPV17 mutations have also been demonstrated in preclinical studies [113,114].

The rationale of this approach for MNGIE is illustrated in Figure 5. The use of the serotype AAV8, which has a high tropism for the liver, in combination with the use of the liver-specific thyroxine-binding globulin protein (TBG) promoter, was intended to provide high levels of TP activity in the liver, converting it into an effective clearing organ for dThd and dUrd overload. The liver constitutes an excellent target for *in vivo* gene therapy. Many viral vectors (including AAV) have a natural tropism for this organ. In addition, from an immunological point of view, it has clear tolerogenic properties, which have undoubtedly contributed to the recent success of gene therapy clinical trials targeting this organ [98,99,115]. Robust and stable TP expression in hepatocytes should clear the systemic accumulation of dThd and dUrd, as observed in MNGIE patients undergoing allo-HSCT [62,63] and as demonstrated *in vivo* by the previous preclinical work using hematopoietic cells transduced with a lentiviral vector [101].

The preclinical testing of this strategy in the murine model of MNGIE confirmed the feasibility of this approach, and improved the previous results obtained in the hematopoietic approach. Indeed, a single intravenous injection of the vector

resulted in permanent therapeutic TP expression in the liver of the KO mice and normalized nucleoside and mitochondrial nucleotide homeostasis in this animal model [116]. A dose as low as  $2 \times 10^{11}$  vector genomes/kg led to stable liver expression in about half of treated mice, with a concomitant reduction in plasma nucleoside levels to normal values in effectively treated animals. Higher doses (between  $10^{12}$  and  $10^{13}$  vector genomes/kg) resulted in reductions to normal or slightly below normal nucleoside levels in virtually all mice treated. Interestingly, liver of treated mice reached TP activities much higher than those found in wild-type animals (up to 30-fold increases for the highest vector dose), with no signs of toxicity. Although more systematic preclinical studies would have to be performed to safely rule out toxicity for this or for other vectors before its use in patients, these results suggest that liver can tolerate TP activity levels well above normal values.

### 2.6.3 Prospects for gene therapy for MNGIE

From the preclinical results summarized and discussed here, it seems reasonable to conclude that gene therapy should be tested in MNGIE patients. Based on the experimental data and the differential safety features of the vectors and target cells studied in preclinical settings, the use of a liver-targeted AAV8 vector appears to be a highly promising tool.

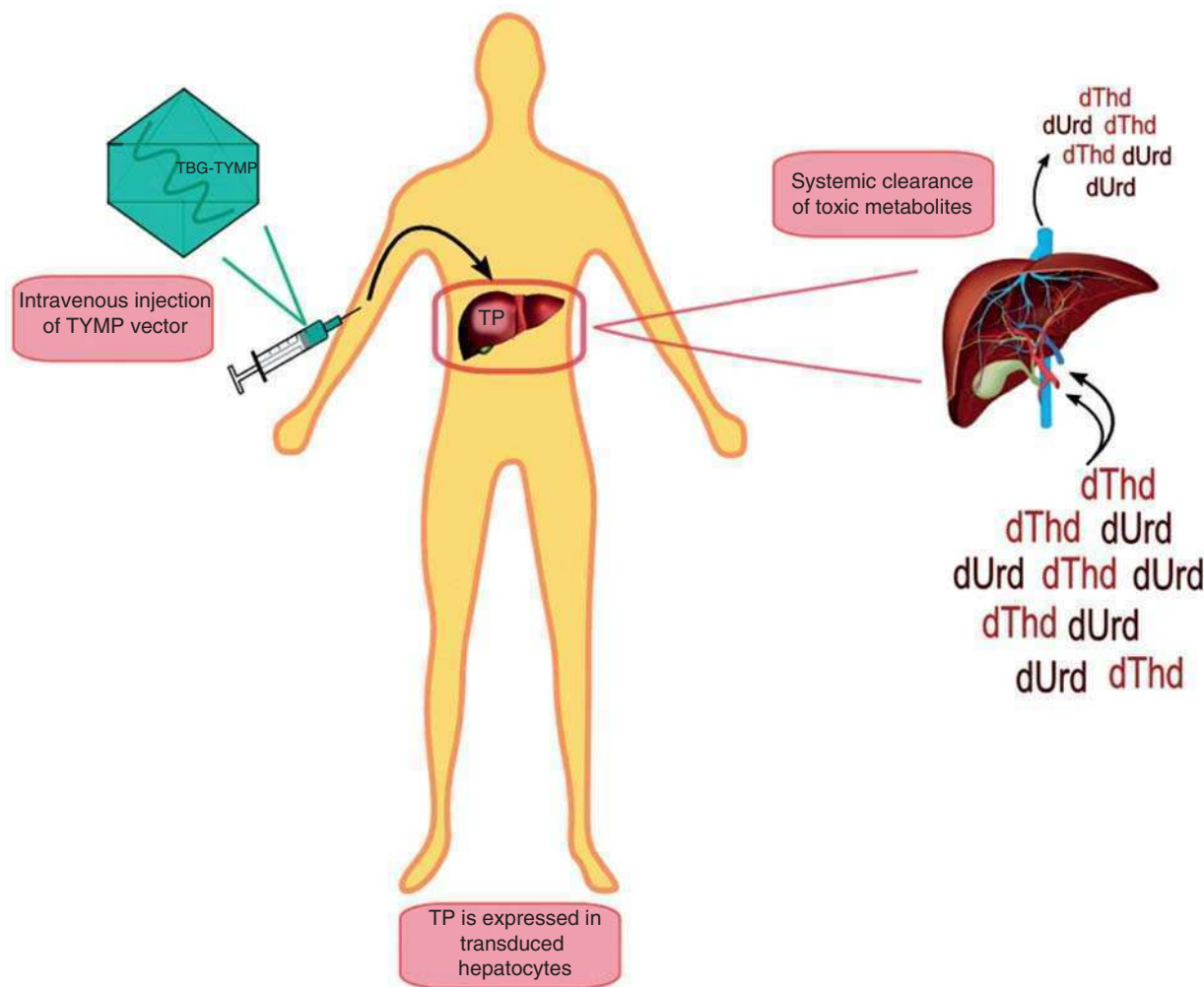
Treating MNGIE with an AAV8 vector transcriptionally targeted at the liver would provide an alternative treatment (perhaps a permanent cure) for MNGIE, and would overcome most limitations of allo-HSCT, such as the difficulty in finding a fully human leukocyte antigen-matched donor, or the serious risks derived from the toxicity of the conditioning procedures, the immunosuppressive drugs and graft-versus-host disease. In addition, gene therapy using AAV would consist of a single intravenous infusion followed by one or two days of hospitalization, a simpler and cheaper procedure than the allo-HSCT, which requires longer hospitalization in specialized protected areas.

Despite the above-mentioned advantages, specific limitations of the proposed gene therapy with the AAV8 vector should also be taken into account. First, only patients with unaffected liver function would be eligible for this approach; liver is unaffected in the murine model used in the preclinical setting [51], but MNGIE may be associated to liver disease, which would compromise the efficacy of the therapy. Moreover, oncogenic risks associated to the use of AAV vectors cannot completely be ruled out. However, this is very likely a negligible risk for AAV vectors [103,104], and in the specific case of MNGIE, the expression of *TYMP* as suicide gene with capecitabine can be used as a safeguard [102]. Also, risks derived from elevated TP activity in the hepatocytes should be ruled out in preclinical settings, although previous proof-of-concept reports suggest that a high level of TP activity in the liver is not associated with detectable toxic effects [101,116]. The activation of a cytotoxic T lymphocytes immune response elicited by an excessive viral load or by the product of the transgene constitutes also a potential risk, as



**Figure 4. Schematic representation of the vector used in [116].**

BGH: Bovine growth hormone polyadenylation signal; hTYMP: Human thymidine phosphorylase coding sequence; ITR: Inverted terminal repeats; TBG: Thyroxine-binding globulin promoter; WPRE: Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element.



**Figure 5. Mechanism of action of the AAV vector carrying TYMP under the control of a hepatic promoter. Transduced hepatocytes expressing TP enzyme will clear the systemic accumulation of toxic dThd and dUrd.**

AAV: Adeno-associated virus; dThd: Thymidine; dUrd: Deoxyuridine; TP: Thymidine phosphorylase; TBG: Thyroxine binding globulin promoter.

has been observed in some patients treated with high vector doses in the hemophilia B trial. However, transaminase rises were slight or mild, and the episode resolved after few weeks of prednisolone treatment [98,99,115]. Environmental and health risks derived from the possibility of vector shedding should also be managed appropriately.

In addition to the above considerations, it should also be taken into account that transduction efficiencies of AAV8

vectors are higher in mice than in humans, as revealed by several preclinical and clinical studies in different species [98,99,117-119]. Another potential issue is the dilution of the transgene in rapidly dividing tissues because AAV remain in the cells as episomes. However, a recent clinical study indicates that liver gene transfer with AAV vectors results in stable, multiyear transgene expression in adult liver [98]. It is also important to note that patients with neutralizing anti-capsid antibodies in their sera

due to a previous contact with the virus (for anti-AAV8 antibodies, the prevalence is 38% [120]) would not be eligible to be treated with this specific vector. Alternative treatments for these patients would have to rely on the development of vectors with different serotypes or the development of methods to prevent the inhibition of transduction by these antibodies [121]. As mentioned above, patients with liver disease, which is not uncommon in MNGIE patients [1], would not be eligible for a liver-based gene therapy.

Even considering the potential issues associated with the clinical use of gene therapy for MNGIE, they are probably surpassed by the foreseen advantages over the treatments currently available. The final assessment of the safety and efficacy of this new and promising approach will have to be properly addressed through a suitable clinical trial.

### 3. Conclusions

Like many other metabolic diseases, MNGIE is caused by the toxic effect of accumulated metabolites. Thus, all therapy approaches should aim to eliminate these noxious substances. Among all the strategies proposed, only the allo-HSCT has demonstrated to be a long-lasting effective option, but it is associated with potential severe adverse effects. Based on very promising preclinical results, gene therapy has emerged as a particularly appropriate potential alternative. The development of a clinical trial to demonstrate the safety and efficacy of this option should be encouraged. In addition, the success of this treatment option could be regarded as a model for the gene therapy to be applied to other diseases also caused or mediated by systemic accumulation of toxic metabolites.

### 4. Expert opinion

In MNGIE, the clinical phenotype is the consequence of the persistent toxic effects that nucleosides dThd and dUrd exert on mtDNA replication. These two compounds are the substrates of TP, the enzyme encoded by *TYMP*, which is mutated in MNGIE patients. As a consequence, dThd and dUrd levels drastically increase in blood and tissues, because of their high solubility in water and free diffusion across plasma membranes through dedicated transporters.

Based on this, all therapy approaches tested so far for MNGIE aimed to achieve the effective elimination of dThd and dUrd overload. Given the chemical properties of the nucleosides, the first strategies tested in patients were based on their clearance through dialysis, but these approaches were unable to maintain dThd and dUrd levels at the targeted low levels observed in healthy subjects. Similar limitations were found when periodic platelet infusions or EE-TP administrations were tested. The high metabolic turnover of dThd and dUrd constitutes a challenge for these procedures, which would have to be unfeasibly repeated very often to reach the goal of permanent low concentrations.

By contrast, the results observed in patients undergoing allo-HSCT demonstrate that, after successful engraftment of donors' hematopoietic stem cells, this treatment restores and maintains the correct dThd and dUrd homeostasis long term, which according to objective indicators is associated with a sustained clinical improvement. Unfortunately, allo-HSCT is an aggressive procedure associated with high morbidity and mortality rates when applied to MNGIE patients with advanced disease. Therefore, it is of utmost importance to find alternatives, especially for those patients who are not eligible for allo-HSCT. One of such alternatives could be orthotropic liver transplantation, which has been recently proposed to treat MNGIE; liver would restore probably higher TP activity amounts to the patients than allo-HSCT, thus indicating that nucleoside homeostasis should be restored in MNGIE patients also after liver transplantation. If results are positive, this would be probably the best option for patients with liver function affected by the course of the disease.

In recent years, gene therapy has emerged as a very promising approach for many diseases, including MNGIE. The first proof-of-concept study, consisting of hematopoietic stem cell gene therapy by *ex vivo* transduction using a lentiviral vector, was successful in reducing nucleoside levels to normal values in a murine model of the disease. However, the risk of oncogenicity derived from the integrative nature of the lentiviral vectors and the need for some extent of conditioning regimen for this hematopoietic *ex vivo* approach, may raise concerns on the safety of this specific procedure. A safer approach, based on the use of an AAV vector (non-integrative) transcriptionally targeted at the liver, resembled and even improved the results. In addition, this is a simpler procedure, consisting in a single intravenous injection, which avoids *ex vivo* manipulations and the potential toxicity of the myeloablative conditioning that would be required in a hematopoietic transplantation. Therefore, the AAV-based gene therapy targeted at the liver circumvents the risks and limitations of allo-HSCT without generating any additional major risks, thus constituting a very attractive option to be clinically tested.

MNGIE is an ultra-rare but devastating disease. Prevalence estimates indicate that prevalence in the western world area (Europe and USA) should be between 0.1 and 1 patient per million people, although these estimates could be improved on, as they are based on partial surveys and incomplete data. The lack of financial incentives and investment return associated with research for therapies on orphan diseases are especially pronounced for such ultra-rare entities. Therefore, it is critical to find the mechanisms to promote and fund research and clinical trials once the scientific proof of concept has been convincingly provided. In the case of MNGIE, gene therapy using an AAV vector targeted at the liver has demonstrated to be a feasible option which would significantly improve currently available treatments. Moreover, a demonstration of the efficacy and safety of this option for MNGIE could serve as a model to encourage similar approaches for

other severe monogenic disorders caused by systemic accumulation of toxic metabolites.

## Declaration of interest

Funding was received from the Spanish national funding agency – Instituto de Salud Carlos III (PI12/00322).

The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

## Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (●) or of considerable interest (●●) to readers.

1. Garone C, Tadesse S, Hirano M. Clinical and genetic spectrum of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain* 2011;134:3326-32
- **This is the most updated and complete published review containing a detailed description of clinical and molecular features of MNGIE, with data from 102 patients.**
2. Okamura K, Santa T, Nagae K, et al. Congenital oculoskeletal myopathy with abnormal muscle and liver mitochondria. *J Neurol Sci* 1976;27:79-91
3. Hirano M, Garcia-de-Yébenes J, Jones AC, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy syndrome maps to chromosome 22q13.32-qter. *Am J Hum Genet* 1998;63:526-33
4. Hirano M, Nishigaki Y, Marti R. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): a disease of two genomes. *Neurologist* 2004;10:8-17
5. Hirano M, Silvestri G, Blake DM, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): clinical, biochemical, and genetic features of an autosomal recessive mitochondrial disorder. *Neurology* 1994;44:721-7
6. Nishigaki Y, Marti R, Copeland WC, et al. Site-specific somatic mitochondrial DNA point mutations in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *J Clin Invest* 2003;111:1913-21
7. Nishigaki Y, Marti R, Hirano M. ND5 is a hot-spot for multiple atypical mitochondrial DNA deletions in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Hum Mol Genet* 2004;13:91-101
8. Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. MNGIE: from nuclear DNA to mitochondrial DNA. *Neuromuscul Disord* 2001;11:7-10
9. Marti R, Verschuuren JJ, Buchman A, et al. Late-onset MNGIE due to partial loss of thymidine phosphorylase activity. *Ann Neurol* 2005;58:649-52
10. Massa R, Tessa A, Margollicci M, et al. Late-onset MNGIE without peripheral neuropathy due to incomplete loss of thymidine phosphorylase activity. *Neuromuscul Disord* 2009;19:837-40
11. Needham M, Duley J, Hammond S, et al. Mitochondrial disease mimicking Charcot-Marie Tooth disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:99-100
12. Filosto M, Scarpelli M, Tonin P, et al. Pitfalls in diagnosing mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *J Inherit Metab Dis* 2011;34:1199-203
13. Carod-Artal FJ, Herrero MD, Lara MC, et al. Cognitive dysfunction and hypogonadotropic hypogonadism in a Brazilian patient with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy and a novel ECGF1 mutation. *Eur J Neurol* 2007;14:581-5
14. Martin MA, Blazquez A, Marti R, et al. Lack of gastrointestinal symptoms in a 60-year-old patient with MNGIE. *Neurology* 2004;63:1536-7
15. Szigeti K, Wong LJ, Perng CL, et al. MNGIE with lack of skeletal muscle involvement and a novel TP splice site mutation. *J Med Genet* 2004;41:125-9
16. Prevalence of rare diseases: Bibliographic data, Orphanet Report Series, Rare Diseases collection. Number 1: Diseases listed in alphabetical order. 2015. Available from: [http://www.orphanet/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence\\_of\\_rare\\_diseases\\_by\\_alphabetical\\_list.pdf](http://www.orphanet/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence_of_rare_diseases_by_alphabetical_list.pdf)
17. Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 1999;283:689-92
- **This was the article revealing that mutations in TYMP cause mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE).**
18. Desgranges C, Razaka G, Rabaud M, et al. Catabolism of thymidine in human blood platelets: purification and properties of thymidine phosphorylase. *Biochim Biophys Acta* 1981;654:211-18
19. Brown NS, Bicknell R. Thymidine phosphorylase, 2-deoxy-D-ribose and angiogenesis. *Biochem J* 1998;334(Pt 1):1-8
20. Moghaddam A, Zhang HT, Fan TP, et al. Thymidine phosphorylase is angiogenic and promotes tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:998-1002
21. Stenson PD, Mort M, Ball EV, et al. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum Genet* 2014;133:1-9
22. Baris Z, Eminoglu T, Dalgic B, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): case report with a new mutation. *Eur J Pediatr* 2010;169:1375-8
23. Bedlack RS, Vu T, Hammans S, et al. MNGIE neuropathy: five cases mimicking chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Muscle Nerve* 2004;29:364-8
24. Blazquez A, Martin MA, Lara MC, et al. Increased muscle nucleoside levels associated with a novel frameshift mutation in the thymidine phosphorylase gene in a Spanish patient with MNGIE. *Neuromuscul Disord* 2005;15:775-8
25. Cardaioli E, Sicurelli F, Carluccio MA, et al. A new thymidine phosphorylase mutation causing elongation of the protein underlies mitochondrial

- neurogastrointestinal encephalomyopathy. *J Neurol* 2012;259:172-4
26. Feddersen B, DE LA Fontaine L, Sass JO, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy mimicking anorexia nervosa. *Am J Psychiatry* 2009;166:494-5
  27. Gamez J, Lara MC, Mearin F, et al. A novel thymidine phosphorylase mutation in a Spanish MNGIE patient. *J Neurol Sci* 2005;228:35-9
  28. Kintarak J, Liewluck T, Sangruchi T, et al. A novel ECGF1 mutation in a Thai patient with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *Clin Neurol Neurosurg* 2007;109:613-16
  29. Kocafe YC, Erdem S, Ozguc M, et al. Four novel thymidine phosphorylase gene mutations in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy syndrome (MNGIE) patients. *Eur J Hum Genet* 2003;11:102-4
  30. Laforce R Jr, Valdmanis PN, Dupre N, et al. A novel TYMP mutation in a French Canadian patient with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Clin Neurol Neurosurg* 2009;111:691-4
  31. Lara MC, Valentino ML, Torres-Torronteras J, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): biochemical features and therapeutic approaches. *Biosci Rep* 2007;27:151-63
  32. Monroy N, Macias Kauffer LR, Mutchinick OM. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) in two Mexican brothers harboring a novel mutation in the ECGF1 gene. *Eur J Med Genet* 2008;51:245-50
  33. Nalini A, Gayathri N. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy in an Indian family with possible manifesting carriers of heterozygous TYMP mutation. *J Neurol Sci* 2011;309:131-5
  34. Nishino I, Spinazzola A, Papadimitriou A, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: an autosomal recessive disorder due to thymidine phosphorylase mutations. *Ann Neurol* 2000;47:792-800
  35. Poulton J, Hirano M, Spinazzola A, et al. Collated mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) depletion syndrome (excluding the mitochondrial gamma polymerase, POLG1). *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:1109-12
  36. Scheffer RC, Smout AJ. Tachyduodenia in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Neurogastroenterol Motil* 2011;23:408-10
  37. Schupbach WM, Vadday KM, Schaller A, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy in three siblings: clinical, genetic and neuroradiological features. *J Neurol* 2007;254:146-53
  38. Slama A, Lacroix C, Plante-Bordeneuve V, et al. Thymidine phosphorylase gene mutations in patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy syndrome. *Mol Genet Metab* 2005;84:326-31
  39. Torres-Torronteras J, Rodriguez-Palmero A, Pinos T, et al. A novel nonstop mutation in TYMP does not induce nonstop mRNA decay in a MNGIE patient with severe neuropathy. *Hum Mutat* 2011;32:E2061-8
  40. Gamez J, Ferreira C, Accarino ML, et al. Phenotypic variability in a Spanish family with MNGIE. *Neurology* 2002;59:455-7
  41. Marti R, Spinazzola A, Tadesse S, et al. Definitive diagnosis of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy by biochemical assays. *Clin Chem* 2004;50:120-4
  42. Spinazzola A, Marti R, Nishino I, et al. Altered thymidine metabolism due to defects of thymidine phosphorylase. *J Biol Chem* 2002;277:4128-33
  - **This was the first detailed biochemical characterization of the biochemical consequences of thymidine phosphorylase (TP) dysfunction in MNGIE. Hemodialysis was studied and inhibition of renal nucleoside reabsorption was proposed.**
  43. Marti R, Nishigaki Y, Hirano M. Elevated plasma deoxyuridine in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303:14-18
  44. Valentino ML, Marti R, Tadesse S, et al. Thymidine and deoxyuridine accumulate in tissues of patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *FEBS Lett* 2007;581:3410-14
  45. Zaharko DS, Bolten BJ, Chiuten D, et al. Pharmacokinetic studies during phase I trials of high-dose thymidine infusions. *Cancer Res* 1979;39:4777-81
  46. Cass CE, Young JD, Baldwin SA, et al. Nucleoside transporters of mammalian cells. *Pharm Biotechnol* 1999;12:313-52
  47. Lai Y, Tse CM, Unadkat JD. Mitochondrial expression of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) results in enhanced mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *J Biol Chem* 2004;279:4490-7
  48. Lee EW, Lai Y, Zhang H, et al. Identification of the mitochondrial targeting signal of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1): implications for interspecies differences in mitochondrial toxicity of fialuridine. *J Biol Chem* 2006;281:16700-6
  49. Ferraro P, Pontarin G, Crocco L, et al. Mitochondrial deoxynucleotide pools in quiescent fibroblasts: a possible model for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *J Biol Chem* 2005;280:24472-80
  50. Gonzalez-Vioque E, Torres-Torronteras J, Andreu AL, et al. Limited dCTP availability accounts for mitochondrial DNA depletion in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *PLoS Genet* 2011;7:e1002035
  - **This article showed the role of dCTP depletion on dThd-induced copy number reduction in MNGIE, and proposed dCtd administration (or inhibition of its catabolism) as potential treatment.**
  51. Lopez LC, Akman HO, Garcia-Cazorla A, et al. Unbalanced deoxynucleotide pools cause mitochondrial DNA instability in thymidine phosphorylase-deficient mice. *Hum Mol Genet* 2009;18:714-22
  52. Pontarin G, Ferraro P, Valentino ML, et al. Mitochondrial DNA depletion and thymidine phosphate pool dynamics in a cellular model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *J Biol Chem* 2006;281:22720-8
  53. Song S, Wheeler LJ, Mathews CK. Deoxyribonucleotide pool imbalance stimulates deletions in HeLa cell mitochondrial DNA. *J Biol Chem* 2003;278:43893-6



54. Yoshimura A, Kuwazuru Y, Furukawa T, et al. Purification and tissue distribution of human thymidine phosphorylase; high expression in lymphocytes, reticulocytes and tumors. *Biochim Biophys Acta* 1990;1034:107-13
55. Bourdon A, Minai L, Serre V, et al. Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet* 2007;39:776-80
56. Mandel H, Szargel R, Labay V, et al. The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat Genet* 2001;29:337-41
57. Saada A, Shaag A, Mandel H, et al. Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat Genet* 2001;29:342-4
58. Marti R, Nishigaki Y, Vila MR, et al. Alteration of nucleotide metabolism: a new mechanism for mitochondrial disorders. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:845-51
59. Giordano C, Sebastiani M, De Giorgio R, et al. Gastrointestinal dysmotility in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy is caused by mitochondrial DNA depletion. *Am J Pathol* 2008;173:1120-8
60. Giordano C, Sebastiani M, Plazzi G, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: evidence of mitochondrial DNA depletion in the small intestine. *Gastroenterology* 2006;130:893-901
61. Halter J, Schupbach WM, Casali C, et al. Allogeneic hematopoietic SCT as treatment option for patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): a consensus conference proposal for a standardized approach. *Bone Marrow Transplant* 2011;46:330-7
- **Recommendations for a standardized protocol for the treatment of MNGIE with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT).**
62. Hirano M, Marti R, Casali C, et al. Allogeneic stem cell transplantation corrects biochemical derangements in MNGIE. *Neurology* 2006;67:1458-60
- **First report of the treatment of MNGIE with allo-HSCT.**
63. Halter JP, Michael W, Schupbach M, et al. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain* 2015. [Epub ahead of print]
- **This important article compiles the long-term results of the treatment of 24 patients worldwide (from 26 initially selected) with allo-HSCT, the most complete report of the outcome of a therapy for MNGIE.**
64. Lara MC, Weiss B, Illa I, et al. Infusion of platelets transiently reduces nucleoside overload in MNGIE. *Neurology* 2006;67:1461-3
- **This article provided the proof of concept that hematopoietic restoration from healthy donors was a feasible treatment for MNGIE.**
65. Ariaudo C, Daidola G, Ferrero B, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy treated with peritoneal dialysis and bone marrow transplantation. *J Nephrol* 2014;28(1):125-7
66. Yavuz H, Ozel A, Christensen M, et al. Treatment of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy with dialysis. *Arch Neurol* 2007;64:435-8
- **This is the first report of a MNGIE patient treated with peritoneal dialysis.**
67. Cesar JM, Vecino AM. Survival and function of transfused platelets. *Studies in two patients with congenital deficiencies of platelet membrane glycoproteins. Platelets* 2009;20:158-62
68. Moran NF, Bain MD, Muqit MM, et al. Carrier erythrocyte entrapped thymidine phosphorylase therapy for MNGIE. *Neurology* 2008;71:686-8
69. Bax BE, Bain MD, Fairbanks LD, et al. A 9-yr evaluation of carrier erythrocyte encapsulated adenosine deaminase (ADA) therapy in a patient with adult-type ADA deficiency. *Eur J Haematol* 2007;79:338-48
70. Bax BE, Bain MD, Talbot PJ, et al. Survival of human carrier erythrocytes in vivo. *Clin Sci (Lond)* 1999;96:171-8
71. Levene M, Coleman DG, Kilpatrick HC, et al. Preclinical toxicity evaluation of erythrocyte-encapsulated thymidine phosphorylase in BALB/c mice and beagle dogs: an enzyme-replacement therapy for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Toxicol Sci* 2013;131:311-24
72. Bax BE, Bain MD, Scarpelli M, et al. Clinical and biochemical improvements in a patient with MNGIE following enzyme replacement. *Neurology* 2013;81:1269-71
- **This is the most detailed report of the long-term outcome resulting from treatment of one patient with erythrocyte entrapped thymidine phosphorylase.**
73. Chapman TP, Hadley G, Fratter C, et al. Unexplained gastrointestinal symptoms: think mitochondrial disease. *Dig Liver Dis* 2014;46:1-8
74. NCT02427178. Available from: <https://clinicaltrials.gov>
75. Finkenstedt A, Schranz M, Bosch S, et al. MNGIE syndrome: liver cirrhosis should be ruled out prior to bone marrow transplantation. *JIMD Rep* 2013;10:41-4
76. Boschetti E, D'Alessandro R, Bianco F, et al. Liver as a source for thymidine phosphorylase replacement in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *PLoS One* 2014;9:e96692
- **The authors of this article proposed that orthotopic liver transplantation could be a therapy for MNGIE, providing data indicating the feasibility of this approach.**
77. Camara Y, Gonzalez-Vioque E, Scarpelli M, et al. Administration of deoxyribonucleosides or inhibition of their catabolism as a pharmacological approach for mitochondrial DNA depletion syndrome. *Hum Mol Genet* 2014;23(9):2459-67
78. De Vocht C, Ranquin A, Van Ginderachter J, et al. Polymeric nanoreactors for enzyme replacement therapy of MNGIE. *J Control Release* 2010;148:e19-20
- **In this article, an enzyme replacement approach, using TP entrapped in nanoreactors, is proposed.**
79. De Vocht C, Ranquin A, Willaert R, et al. Assessment of stability, toxicity and immunogenicity of new polymeric nanoreactors for use in enzyme replacement therapy of MNGIE. *J Control Release* 2009;137:246-54
80. Van Aubel RA, Masereeuw R, Russel FG. Molecular pharmacology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279:F216-32

81. Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, et al. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 2000;26:207-10
82. Kaukonen J, Juselius JK, Tiranti V, et al. Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science* 2000;289:782-5
83. Longley MJ, Clark S, Yu Wai Man C, et al. Mutant POLG2 disrupts DNA polymerase gamma subunits and causes progressive external ophthalmoplegia. *Am J Hum Genet* 2006;78:1026-34
84. Spelbrink JN, Li FY, Tiranti V, et al. Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet* 2001;28:223-31
85. Bonnen PE, Yarham JW, Besse A, et al. Mutations in FBXL4 cause mitochondrial encephalopathy and a disorder of mitochondrial DNA maintenance. *Am J Hum Genet* 2013;93:471-81
86. Elpeleg O, Miller C, Hershkovitz E, et al. Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion. *Am J Hum Genet* 2005;76:1081-6
87. Gai X, Ghezzi D, Johnson MA, et al. Mutations in FBXL4, encoding a mitochondrial protein, cause early-onset mitochondrial encephalomyopathy. *Am J Hum Genet* 2013;93:482-95
88. Naviaux RK, Nguyen KV. POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol* 2004;55:706-12
89. Ostergaard E, Christensen E, Kristensen E, et al. Deficiency of the alpha subunit of succinate-coenzyme A ligase causes fatal infantile lactic acidosis with mitochondrial DNA depletion. *Am J Hum Genet* 2007;81:383-7
90. Spinazzola A, Viscomi C, Fernandez-Vizarra E, et al. MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet* 2006;38:570-5
91. Ebrahim Q, Mahfouz RZ, Ng KP, et al. High cytidine deaminase expression in the liver provides sanctuary for cancer cells from decitabine treatment effects. *Oncotarget* 2012;3:1137-45
92. O'Mahony CA, Goss JA. The future of liver transplantation. *Tex Heart Inst J* 2012;39:874-5
93. Tsai MS, Wang YC, Wang HH, et al. Pre-existing diabetes and risks of morbidity and mortality after liver transplantation: A nationwide database study in an Asian population. *Eur J Intern Med* 2015;26(6):433-8
94. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003;348:255-6
95. Montini E, Cesana D, Schmidt M, et al. The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. *J Clin Invest* 2009;119:964-75
96. Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, et al. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat Med* 2010;16:198-204
97. Wu X, Li Y, Crise B, et al. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 2003;300:1749-51
98. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med* 2014;371:1994-2004
99. Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* 2011;365:2357-65
100. Garcia-Diaz B, Garone C, Barca E, et al. Deoxynucleoside stress exacerbates the phenotype of a mouse model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain* 2014;137(Pt 5):1337-49
101. Torres-Torronteras J, Gomez A, Eixarch H, et al. Hematopoietic gene therapy restores thymidine phosphorylase activity in a cell culture and a murine model of MNGIE. *Gene Ther* 2011;18:795-806
102. Lopez-Estevéz S, Ferrer G, Torres-Torronteras J, et al. Thymidine phosphorylase is both a therapeutic and a suicide gene in a murine model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Gene Ther* 2014;21(7):673-81
103. Donsante A, Vogler C, Muzyczka N, et al. Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther* 2001;8:1343-6
104. Gauttier V, Pichard V, Aubert D, et al. No tumour-initiating risk associated with scAAV transduction in newborn rat liver. *Gene Ther* 2013;20:779-84
105. Stroes ES, Nierman MC, Meulenberg JJ, et al. Intramuscular administration of AAV1-lipoprotein lipase S447X lowers triglycerides in lipoprotein lipase-deficient patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:2303-4
106. Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008;358:2240-8
107. Maguire AM, High KA, Auricchio A, et al. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 2009;374:1597-605
108. MacLaren RE, Groppe M, Barnard AR, et al. Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial. *Lancet* 2014;383:1129-37
109. Jacobson SG, Cideciyan AV, Ratnakaram R, et al. Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. *Arch Ophthalmol* 2012;130:9-24
110. Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, et al. Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Hum Gene Ther* 2008;19:979-90
111. Carpentier AC, Frisch F, Labbe SM, et al. Effect of alipogene tiparvovec (AAV1-LPL(S447X)) on postprandial chylomicron metabolism in lipoprotein lipase-deficient patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:1635-44

112. Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008;358:2231-9
113. Bottani E, Giordano C, Civiletto G, et al. AAV-mediated Liver-specific MPV17 expression restores mtDNA levels and prevents diet-induced liver failure. *Mol Ther* 2014;22:10-17
114. Di Meo I, Auricchio A, Lamperti C, et al. Effective AAV-mediated gene therapy in a mouse model of ethylmalonic encephalopathy. *EMBO Mol Med* 2012;4:1008-14
115. Mingozzi F, Liu YL, Dobrzynski E, et al. Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by in vivo hepatic gene transfer. *J Clin Invest* 2003;111:1347-56
116. Torres-Torronteras J, Viscomi C, Cabrera-Perez R, et al. Gene therapy using a liver-targeted AAV vector restores nucleoside and nucleotide homeostasis in a murine model of MNGIE. *Mol Ther* 2014;22(5):901-7
- **This article reports the preclinical *in vivo* proof of concept demonstrating the feasibility of a transcriptionally liver-targeted AAV8-based gene therapy for MNGIE.**
117. Jiang H, Couto LB, Patarroyo-White S, et al. Effects of transient immunosuppression on adenoassociated, virus-mediated, liver-directed gene transfer in rhesus macaques and implications for human gene therapy. *Blood* 2006;108:3321-8
118. Nathwani AC, Gray JT, McIntosh J, et al. Safe and efficient transduction of the liver after peripheral vein infusion of self-complementary AAV vector results in stable therapeutic expression of human FIX in nonhuman primates. *Blood* 2007;109:1414-21
119. Nathwani AC, Gray JT, Ng CY, et al. Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. *Blood* 2006;107:2653-61
120. Boutin S, Monteilhet V, Veron P, et al. Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum Gene Ther* 2010;21:704-12
121. Louis Jeune V, Joergensen JA, Hajjar RJ, et al. Pre-existing anti-adeno-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy. *Hum Gene Ther Methods* 2013;24:59-67

### Affiliation

Raquel Cabrera-Pérez<sup>1,2</sup> BSc,  
 Javier Torres-Torronteras<sup>1,2</sup> PhD,  
 Ferran Vila-Julíà<sup>1,2</sup> PhD,  
 Francisco J Ortega<sup>1,2</sup> PhD,  
 Yolanda Cámara<sup>1,2</sup> PhD,  
 Jordi Barquinero<sup>3</sup> MD PhD &  
 Ramon Martí<sup>†1,2</sup> PhD  
<sup>†</sup>Author for correspondence  
<sup>1</sup>Universitat Autònoma de Barcelona, Vall d'Hebron Research Institute, Research Group on Neuromuscular and Mitochondrial Diseases, Pg Vall d'Hebron 119, 08035 Barcelona, Catalonia, Spain  
 Tel: +34 9 34 89 40 54;  
 Fax: +34 9 32 74 67 63;  
 E-mail: ramon.marti@vhir.org  
<sup>2</sup>Instituto de Salud Carlos III, Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain  
<sup>3</sup>Universitat Autònoma de Barcelona, Vall d'Hebron Research Institute, Gene and Cell Therapy Laboratory, Barcelona, Catalonia, Spain

## Long-Term Restoration of Thymidine Phosphorylase Function and Nucleoside Homeostasis Using Hematopoietic Gene Therapy in a Murine Model of Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy

Javier Torres-Torronteras,<sup>1,2</sup> Raquel Cabrera-Pérez,<sup>1,2</sup> Ignasi Barba,<sup>3</sup> Carme Costa,<sup>4</sup> Noemí de Luna,<sup>1,2</sup> Antoni L. Andreu,<sup>1,2</sup> Jordi Barquineró,<sup>5</sup> Michio Hirano,<sup>6</sup> Yolanda Cámara,<sup>1,2</sup> and Ramon Martí<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Research Group on Neuromuscular and Mitochondrial Diseases; <sup>2</sup>Research Group on Cardiocirculatory Pathology; <sup>3</sup>Servei de Neurologia-Neuroimmunologia, Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya; and <sup>4</sup>Gene and Cell Therapy Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>5</sup>Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; <sup>6</sup>Department of Neurology, H. Houston Merritt Center, Columbia University Medical Center, New York, New York.

Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) is a metabolic disorder caused by mutations in *TYMP*, encoding thymidine phosphorylase (TP). In MNGIE patients, TP dysfunction produces systemic thymidine and deoxyuridine accumulation, which ultimately impairs mitochondrial DNA replication and results in mitochondrial dysfunction. To date, only allogeneic hematopoietic stem cell transplantation has demonstrated long-term clinical efficacy, but high morbidity and mortality associated with this procedure necessitate the search for safer alternatives. In a previous study, we demonstrated that hematopoietic stem cell gene therapy using a lentiviral vector containing the coding sequence of *TYMP* restored the biochemical homeostasis in an animal model of MNGIE. In the present follow-up study, we show that ectopic expression of TP in the hematopoietic system restores normal nucleoside levels in plasma, as well as in tissues affected in MNGIE such as small intestine, skeletal muscle, brain, and liver. Mitochondrial dNTP pool imbalances observed in liver of the animal model were also corrected by the treatment. The biochemical effects were maintained at least 20 months even with low levels of chimerism. No alterations in the blood cell counts or other toxic effects were observed in association with the lentiviral transduction or TP overexpression. These results further support the notion that gene therapy is a feasible treatment option for MNGIE.

### INTRODUCTION

MITOCHONDRIAL NEUROGASTROINTESTINAL encephalomyopathy (MNGIE) is a severe disorder caused by mutations in *TYMP*, the gene encoding thymidine phosphorylase (TP).<sup>1–3</sup> This cytosolic enzyme catalyzes the phosphorolysis of the nucleosides thymidine (dThd) and deoxyuridine (dUrd) to the corresponding bases thymine and uracil, and deoxyribose-1-phosphate.<sup>4</sup> In MNGIE patients, the lack of TP activity results in systemic dThd and dUrd overload and this excess is toxic for mitochondria.<sup>5</sup> *In vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that, in quiescent cells, excess of dThd results in increased mitochondrial dTTP and

secondary dCTP depletion.<sup>6,7</sup> This deoxyribonucleotide imbalance impairs mitochondrial DNA (mtDNA) replication and results in mtDNA depletion, multiple deletions, and somatic point mutations.<sup>6,8–10</sup> MNGIE is a rare disease, with fewer than 300 patients known to be affected worldwide, although the exact incidence is unknown. Clinically, MNGIE is characterized by progressive external ophthalmoplegia, gastrointestinal dysmotility, cachexia, peripheral neuropathy, diffuse leukoencephalopathy on brain magnetic resonance imaging, and mitochondrial dysfunction. The average life expectancy of MNGIE patients is 37 years.<sup>2,11</sup>

\*Correspondence: Dr. Ramon Martí, Research Group on Neuromuscular and Mitochondrial Diseases, Vall d'Hebron Research Institute, Pg Vall d'Hebron 119 08035 Barcelona, Catalonia, Spain. E-mail: ramon.marti@vhir.org

Since MNGIE is caused by accumulation of the toxic metabolites dThd and dUrd, all therapeutic approaches have been focused on reducing them to normal levels. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (Allo-HSCT) has been demonstrated to be an effective treatment in several patients.<sup>12–14</sup> Nonetheless, allo-HSCT is limited by the difficulty of finding suitable donors and the high mortality and morbidity rates associated with this procedure, especially in MNGIE patients, who are usually in poor clinical condition when treated. Thus, allo-HSCT may be relevant only for a subset of MNGIE patients who have HLA-matched donors and are not severely medically compromised by the disease. These limitations encouraged us to investigate alternative approaches. Our previous work on a murine model of the disease has already demonstrated that gene therapy using *TYMP* is a feasible approach. Full normalization of biochemical abnormalities was achieved using either *ex vivo* transduction of a lentiviral vector targeted at hematopoietic stem cells,<sup>15</sup> or an adeno-associated virus (AAV) vector with targeted expression at the liver.<sup>16</sup> In the current study, we demonstrate that expression of *TYMP* targeted at hematopoietic tissue using a lentiviral vector is fully maintained over at least 18 months, and that the correction of biochemical derangements is sustained long-term over this entire period. These results further confirm the feasibility of gene therapy as an alternative to allo-HSCT in MNGIE patients.

## MATERIALS AND METHODS

### Vector production, titration, and transduction

Third-generation self-inactivating (SIN) HIV-derived lentiviral vectors that express *EGFP* (p-sham) or *EGFP* and *TYMP* (p-TP) under the control of the *hPGK* promoter have been previously described.<sup>15</sup> Viral production was performed by polyethylenimine (PEI) transient cotransfection of HEK293T with the transfer vector and the packaging plasmids pRSV REV, pMDLg RRE, and pMD VSVG as described elsewhere.<sup>15</sup> Viral productions were titrated by transduction of HEK293T cells with serial dilutions of lentiviral vector suspensions and counting the percentage of green fluorescent cells by flow cytometry.<sup>15</sup>

### Animal procedures and sample collection

All animal procedures were performed in accordance with protocols approved by our institutional review board. *Tymp/Upp1* double-knockout (dKO) mice in C57b/6J genetic background<sup>6</sup> were used in this study. Transplanted mice were routinely checked for

general health status, including periodic blood cell counts. Blood samples were collected from the saphenous vein using EDTA as anticoagulant. Total and differential blood cell counts were performed in a BC-2800 Auto Hematology Analyzer (Mindray, China).

Two subgroups of mice were killed at two different timepoints (6 and 18 months after treatment) by CO<sub>2</sub> inhalation. Intracardiac blood samples were collected and processed to obtain plasma, buffy coat, and blood cell fraction (i.e., total sedimented cells, including erythrocytes and buffy coat). Different tissues were gently washed in cold phosphate buffered saline (PBS) and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C until analysis. Small intestine was additionally washed by flushing with PBS before freezing.

### Transduction and transplantation protocol

Eight- to 12-week-old donor mice were killed with CO<sub>2</sub> inhalation and bone marrow (BM) was obtained from femorae, tibiae, and iliac crests. Purified murine lineage (Lin)<sup>–</sup> BM cells (Lineage Cell Depletion Kit mouse; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) were seeded at a density of  $5 \times 10^5$  cells per well in 24-well plates containing 1 ml of Iscoves modified Dulbecco's medium (IMDM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, and recombinant murine growth factors (rmSCF 10 ng/ $\mu$ l, rmTPO 10 ng/ $\mu$ l, rmIL3 10 ng/ $\mu$ l, and rmFlt3 10 ng/ $\mu$ l). Lentiviral vectors p-TP and p-sham were added at an MOI of 100 and cells were incubated for 16 hr at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> and then washed with PBS. Transduction efficacy of Lin<sup>–</sup> selected cells, assessed by flow cytometry, ranged from 12% to 28%.

Eight- to 12-week-old *Tymp/Upp1* dKO mice were tail vein injected with  $3\text{--}5 \times 10^5$  transduced hematopoietic progenitors after sublethal myeloablation with total body irradiation (6 Gy, in 2 doses of 3 Gy at a dose rate of 2.24 Gy/min given at a 2 hr interval) using a cesium (Cs<sup>137</sup>) gamma-ray irradiator.

### Nucleosides and TP activity determination

Plasma dThd and dUrd concentrations and blood cell TP activity were analyzed by HPLC-UV, as previously described.<sup>15</sup> For tissue TP activity and nucleoside concentration determination, frozen samples were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.2; 10 ml/l Triton X-100; 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride; 0.2 ml/l 2-mercaptoethanol) in a Potter homogenizer. Homogenates were centrifuged at 20,000  $\times g$  for 30 min at 4°C, and supernatants were separated into two aliquots. One aliquot was used as described elsewhere

for protein determination<sup>17</sup> and TP activity determination.<sup>18</sup> The other aliquot was frozen until used to measure nucleosides by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Thawed supernatants were centrifuged at  $20,000 \times g$  for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$  to eliminate any remaining particles, and clean supernatants were deproteinized by ultrafiltration (10 kDa Amicon Ultra filters; Millipore, Darmstadt, Germany) at  $14,000 \times g$  and  $4^{\circ}\text{C}$  for 30 min. Five microliters of deproteinized homogenate was injected into an Acquity UPLC-MS/MS apparatus (Acquity UPLC-Xevo TQ Mass Spectrometer; Waters, Milford, MA) using an Acquity UPLC BEH C18 column ( $100 \times 2.1$  mm,  $130 \text{ \AA}$  pore,  $1.7 \mu\text{m}$  particle; Waters). The components of the sample were resolved at  $0.5 \text{ ml/min}$  through a binary gradient-elution using a saline buffer ( $20 \text{ mM}$  ammonium acetate,  $\text{pH } 5.6$ ) and acetonitrile as follows:  $0\text{--}1.1$  min, isocratic  $100\%$  saline buffer;  $1.1\text{--}5$  min, gradient from  $0\%$  to  $13.6\%$  acetonitrile;  $5\text{--}5.1$  min, gradient from  $13.6\%$  to  $100\%$  acetonitrile;  $5.1\text{--}6.1$  min, isocratic  $100\%$  acetonitrile;  $6.1\text{--}7.2$  min, isocratic  $100\%$  saline buffer. Eluate components were detected by multiple reaction monitoring, with positive electrospray for dThd (transition mass  $242.8\text{--}127.1$ , cone voltage  $10 \text{ V}$ , collision energy  $12 \text{ V}$ ) and dUrd (transition mass  $228.8\text{--}113.08$ , cone voltage  $8 \text{ V}$ , and collision energy  $12 \text{ V}$ ). Calibration curves made with aqueous standards were processed in parallel, and concentrations were obtained from interpolation of the peak areas.

#### Mitochondrial isolation and dNTP quantification

Liver mitochondria were isolated by differential centrifugation as previously described.<sup>9</sup> Fourteen-month-old mice were killed by cervical dislocation and liver was homogenized in buffer A ( $320 \text{ mM}$  sucrose,  $1 \text{ mM}$  EDTA,  $10 \text{ mM}$  Tris-HCl,  $\text{pH } 7.4$ ). A volume (approximately  $0.1\text{--}0.3 \text{ ml}$ ) of suspension with isolated mitochondria containing  $0.5 \text{ mg}$  protein was treated with trichloroacetic acid (final concentration  $0.5 \text{ M}$ ) and centrifuged at  $20,000 \times g$  for 5 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatants were neutralized with 1.5 volumes of  $0.5 \text{ M}$  tri-*N*-octylamine in Freon (1,1,2-trichlorotrifluoroethane) and centrifuged for 10 min at  $10,000 \times g$  at  $4^{\circ}\text{C}$ . Half the aqueous upper phase was recovered and dried under speed vacuum. Lyophilized dNTP extracts were dissolved in  $125 \mu\text{l}$  of  $40 \text{ mM}$  Tris-HCl ( $\text{pH } 7.4$ ) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until measurement. For mitochondrial dNTP quantification, we used the polymerase-based assay previously described.<sup>9</sup>

#### Vector copy number

DNA was extracted from buffy coat, BM, liver, and brain with the QIAamp DNA mini kit (Qiagen,

Hilden, Germany). Quantification of vector copy number was performed by qRT-PCR in the ABI PRISM 7900 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA). Vector copy number in DNA samples from buffy coat and BM was quantified using custom-designed specific primers and TaqMan MGB probe to detect *EGFP*-integrated copies in the genome from p-TP or p-sham transduction, as previously described.<sup>15</sup> Results were referred to the single-copy nuclear gene *Ang1* using the predesigned TaqMan MGB gene expression assay Mm00833184\_s1 (Applied Biosystems).

#### Flow cytometry

EGFP fluorescence was analyzed by flow cytometry. BM, spleen, and blood cells were incubated with erythrocyte lysis buffer (BD Biosciences, San Jose, CA) for 10 min at  $37^{\circ}\text{C}$  and then centrifuged for 5 min at  $300 \times g$ . Cell pellets were re-suspended in fresh medium and fluorescence was measured through a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

#### Statistical analysis

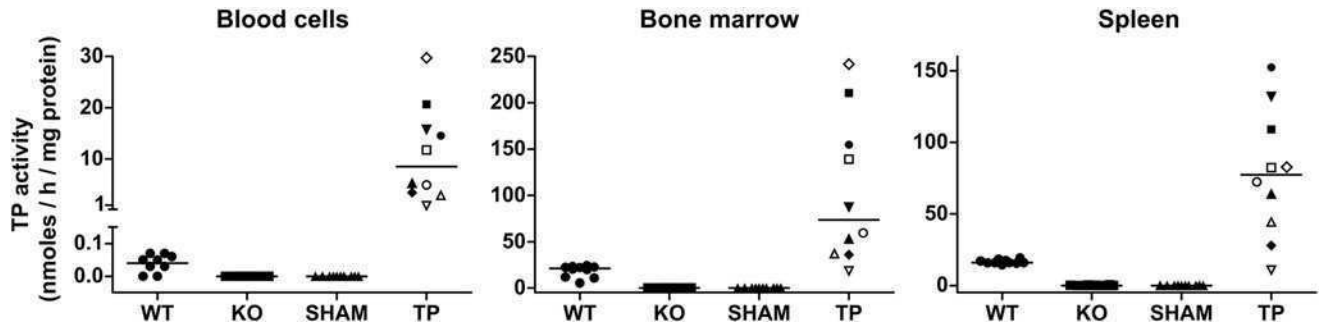
Statistical analysis was performed with the SPSS 15.0 and GraphPad Prism 5 software. Tests used are indicated in the figure legends. For statistical purposes, undetectable values were considered as zero.

## RESULTS

### Low levels of molecular chimerism resulted in high TP activity in the hematopoietic tissues

Our previous studies using a lentiviral vector containing a copy of the human *TYMP* gene targeted at the hematopoietic cells in a TP-deficient mouse model showed that ectopic TP restoration in blood cells reduced dThd and dUrd concentrations to levels observed in wild-type (wt) mice.<sup>15</sup> Here, we have analyzed blood cell fraction and other hematopoietic tissues, including BM and spleen. Six months after treatment, sustained increases in TP activity were observed in blood cells (ranging  $0.9\text{--}30 \text{ nmol Thy/hr/mg prot}$ ), BM ( $19\text{--}242 \text{ nmol Thy/hr/mg prot}$ ), and spleen ( $11\text{--}152 \text{ nmol Thy/hr/mg prot}$ ), whereas TP activity was undetectable in untreated and p-sham vector-treated dKO mice. TP activities of mice treated with the p-TP vector were clearly higher than those observed in wt mice (Fig. 1).

Molecular chimerism was assessed by flow cytometry (expressed as the percentage of EGFP<sup>+</sup> cells), and by quantitative real-time PCR (quantifying *EGFP* copy number) six months after treatment (Fig. 2). Flow cytometry analysis revealed

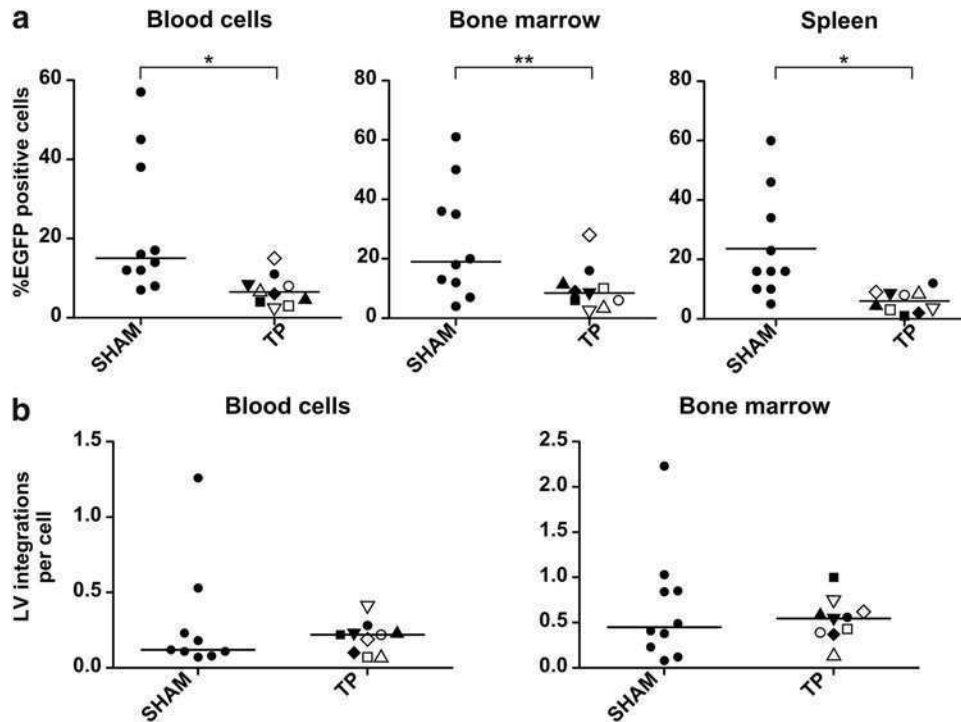


**Figure 1.** TP activity in hematopoietic tissues. TP activity in blood, BM, and spleen of wild type (WT), nontreated (KO), p-sham-treated (SHAM), and p-TP-treated (TP) *Tymp/Upp1* dKO mice 6 months after treatment. To facilitate matching the results, each mouse in the TP-treated group is identified with the same symbol in Figs. 1–4. Horizontal lines indicate medians. BM, bone marrow; KO, knockout; dKO, double-knockout; TP, thymidine phosphorylase.

low molecular chimerism ratios in TP-treated mice, ranging from 2% to 15% (white blood cells), 2% to 28% (BM cells), and 1% to 11% (spleen). Higher chimerism ratios, although widely variable, were observed when assessed as *EGFP* copy number per cell, which ranged from 0.07 to 0.40 in white blood cells, and 0.15 to 1 in BM cells. Percentages of *EGFP*<sup>+</sup> cells were higher in mice treated with p-sham than in the p-TP-treated counterparts, but the *EGFP* copy number per cell was similar in both groups,

suggesting that the sham construct expressed *EGFP* more efficiently than the TP construct. A significant correlation between chimerism levels (% *EGFP*<sup>+</sup> cells) and TP activity was found only in the BM (Supplementary Fig. S1a; Supplementary Data are available online at [www.liebertpub.com/hum](http://www.liebertpub.com/hum)).

To explore the possibility of TP activity restoration in nonhematopoietic tissues as a consequence of resident cells of hematopoietic origin, we measured TP activity in organs that are usually af-



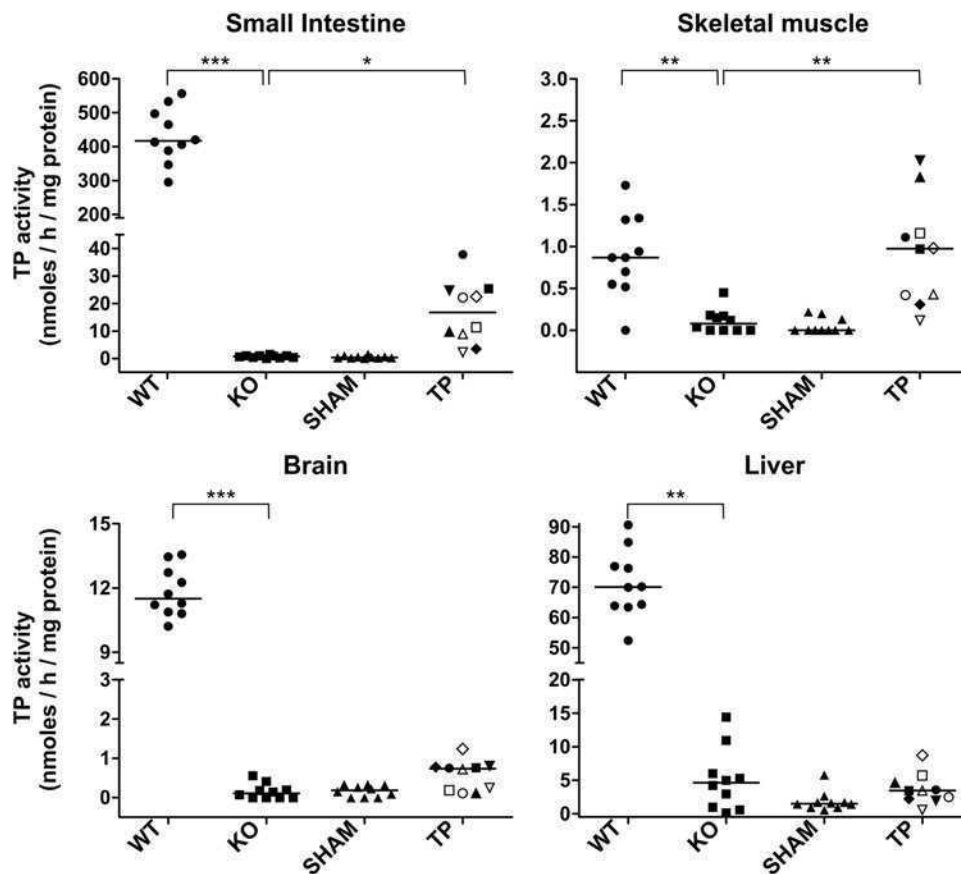
**Figure 2.** Molecular chimerism. Molecular chimerism measured through flow cytometry as percentage of green fluorescent cells (a) and lentiviral integrations per cell measured by qRT-PCR, using an *EGFP*-specific probe referred to the single-copy mouse gene angiogenin-1 (b) in white blood cells, BM, and spleen of sham ( $n=10$ ) and TP-treated ( $n=10$ ) dKO mice 6 months after treatment. In order to facilitate matching the results, each mouse in the TP-treated group is identified with the same symbol. Horizontal lines indicate median. Statistical analyses were performed with the nonparametric Mann–Whitney *U*-test (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ ).

ected in MNGIE patients (Fig. 3). In wt mice, the highest TP activity was found in small intestine (median 417 nmol Thy/hr/mg prot), and the lowest activity was found in skeletal muscle (median 0.9 nmol Thy/hr/mg prot), among the analyzed tissues. Similar values had been reported elsewhere.<sup>19</sup> TP activity was not restored in liver, and was barely increased in brain and small intestine in treated animals; TP activity was fully restored in skeletal muscle, although the significance of this finding is limited because wt TP activity levels in this tissue are close to the lower limit of quantification of the method (0.5 nmol Thy/hr/mg prot). Interestingly, in TP-treated animals, moderate but significant correlations were observed between TP activities in small intestine, BM, blood cells, and spleen (Supplementary Fig. S1b).

### Systemic nucleoside reduction

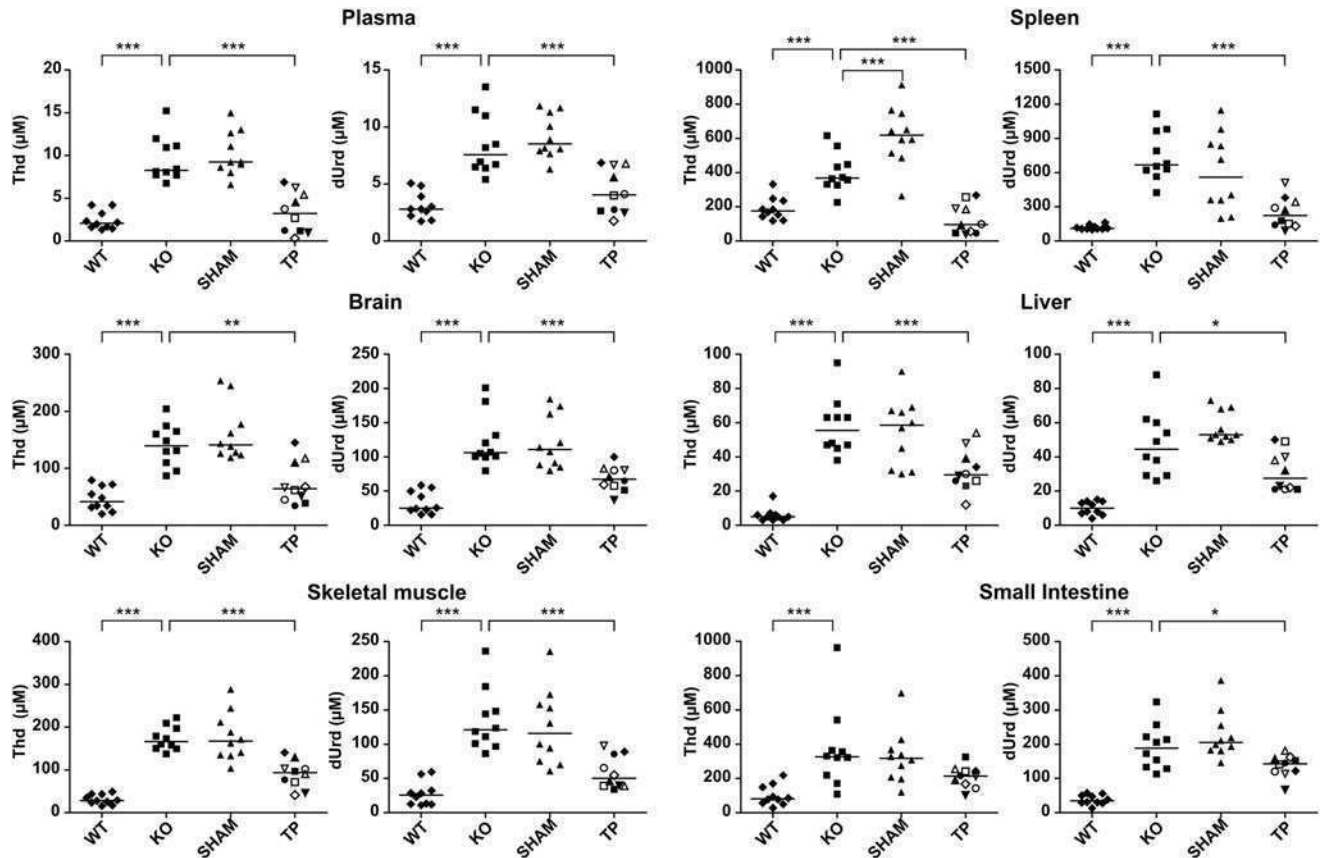
Six months after treatment, plasma dThd and dUrd concentrations were significantly reduced in

all dKO mice treated with p-TP ( $p \leq 0.001$ ), although not all mice reached wt levels. In 60% of the animals, plasma dThd and dUrd concentrations decreased to wt levels or below (Fig. 4) (wt, dThd range 1.3–4.2  $\mu\text{M}$ , dUrd range 1.7–5.1  $\mu\text{M}$ ; TP-treated dKO, dThd range 0.2–6.9  $\mu\text{M}$ , dUrd range 1.8–6.9  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 4). Reduction of dThd and dUrd levels was also observed in all tissues analyzed (Fig. 4). The reductions were more pronounced in spleen and brain (where dThd and dUrd levels reached concentrations similar to wt levels), but were only partial in liver, skeletal muscle, and small intestine. The sum of dThd and dUrd levels in plasma and all tissues analyzed (except small intestine) negatively correlated with TP activity in BM, spleen, and blood cells (Supplementary Table S1). However, when we compared nucleoside levels (dThd+dUrd) versus TP activity within a given tissue, only blood ( $r = -0.927$ ;  $p < 0.001$ , Spearman) and spleen ( $r = -0.912$ ;  $p < 0.001$ ) showed significant correlations between these two variables, whereas no correlations were



**Figure 3.** TP activity in different tissues. TP activity in liver, brain, small intestine, and gastrocnemius muscle from wt (WT), nontreated (KO), p-sham-treated (SHAM), and p-TP-treated (TP) *Tymp/Upp1* dKO mice 6 months after treatment. Horizontal lines indicate median. In order to facilitate matching the results, each mouse in the TP-treated group is identified with the same symbol. Statistical analysis were performed with the nonparametric Dunn's multiple comparison test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).





**Figure 4.** Systemic nucleoside clearance. dThd and dUrd concentration in plasma, spleen, brain, liver, skeletal muscle, and small intestine from wt (WT,  $n=10$ ), nontreated (KO,  $n=10$ ), p-sham-treated (SHAM,  $n=10$ ), and p-TP-treated (TP,  $n=10$ ) *Tymp/Upp1* dKO mice 6 months after treatment. Horizontal lines indicate median. In order to facilitate matching the results, each mouse in the TP-treated group is identified with the same symbol. Statistical analysis were performed with the parametric Dunnett's multiple comparison test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

found in the other tissues (brain, liver, skeletal muscle, and small intestine), indicating that the degree of the nucleoside reduction directly depends on the TP activity provided by the hematopoietic cells.

#### The effect of the treatment is sustained long-term

Eighteen months after transplantation, the molecular chimerism in TP-treated mice (assessed as the percentage of  $\text{EGFP}^+$  cells) ranged from 3.1% to 50% in BM and from 0.4% to 68.1% in blood cells. The number of lentiviral integrations per cell quantified by qRT-PCR in BM and blood cells was less than one copy per cell in all animals (Table 1). TP activity in these tissues exceeded wt levels in 3 of the 5 animals treated (mice #3, #4, and #5) and correlated with the percentage of  $\text{EGFP}^+$  cells (Table 1). Plasma and liver nucleoside concentrations were also reduced to normal levels or below in these animals. In the two remaining TP-treated animals (mice #1 and #2), TP activity in blood cells and BM was negligible, correlating with the low

levels of molecular chimerism. Consistently, plasma nucleoside levels remained high in these two animals. Surprisingly, liver dThd levels in one of these mice (#1) were in the range of wt animals.

Molecular chimerism in blood cells did not decline in old animals; mice #1 and #2 displayed very low levels of chimerism from the first month after treatment, which were maintained 18 months after the treatment (20 months of age); chimerism was maintained in mouse #4, and increased in mouse #5. In mouse #3, chimerism decreased from 10% to 4%, but was sufficient to maintain TP activity in blood and low nucleoside levels in plasma (Table 1).

#### Effect on survival

Kaplan–Meier analysis showed that untreated wt and dKO mice had no differences in survival, which was reduced in the treated groups regardless of whether they received sham- or TP-corrected cells (mean of survival for TP and sham groups was 70 and 77 weeks, respectively, and 91 weeks for wt and untreated dKO mice) (Fig. 5a and Supple-

**Table 1. Summary of long-term molecular and biochemical variables in treated mice**

Group	N	ID	Age (weeks)	Molecular chimerism (% EGFP+)			Copy number per cell			TP activity <sup>a</sup>			dThd levels <sup>b</sup>		
				Blood cells	BM	Blood cells	BM	Blood cells	BM	Blood cells	BM	Liver	Plasma	Liver	
WT	9	—	84.5 (84–85)	ND	ND	ND	ND	0.08 (0.02–0.12)	39.0 (21.5–69.9)	51.4 (27.2–71.5)	2.5 (0.9–4.5)	29 (11–70)			
KO	9	—	85.6 (82–89)	ND	ND	ND	ND	Und	1.4 (Und –5.1)	2.0 (0.5–5.8)	26.3 (6.4–171.4)	245 (95–1356)			
SHAM	7	—	84.6 (80–86)	15.5 (0.4–25.9)	9.4 (1.4–15.4)	0.51 (0.16–0.85)	0.27 (0.14–0.34)	Und	1.5 (Und –3.5)	7.8 (0.8–25.6)	10.1 (3.0–14.8)	134 (79–272)			
TP	5	1	85	0.7 (1.7) <sup>c</sup>	3.4	0.19	0.16	0.03	3.3	2.4	7.0	57			
		2	85	0.4 (0.5) <sup>c</sup>	3.1	0.06	0.21	0.02	6.0	3.7	13.0	99			
		3	85	3.9 (10.1) <sup>c</sup>	10.8	0.09	0.2	6.1	94.6	3.8	2.0	62			
		4	85	10.0 (8.8) <sup>c</sup>	17.9	0.22	0.37	15.5	237.8	6.6	ND	23			
		5	76	68.1 (19.2) <sup>c</sup>	50.0	0.89	0.87	90.4	824.3	31.3	ND	8			

<sup>a</sup>TP activity is measured as nmol Thy/hr/mg protein. Values are shown as mean (range).

<sup>b</sup>dThd concentration in  $\mu\text{M}$  in plasma (nmol/mg prot in liver). Values are shown as mean (range).

<sup>c</sup>Molecular chimerism 18 months after transplantation (in parentheses, molecular chimerism 1 month after transplantation).

BM, bone marrow; KO, knockout; ND, not determined; TP, thymidine phosphorylase; Und, undetectable (dThd <0.45  $\mu\text{M}$ ; blood cells TP activity <0.02; BM and liver TP activity <0.5); WT, wild type.

mentary Table S2). These results indicate that the treatment is associated with an increase in mortality, but not because of the effect of the transgene, as survival rates were similar in animals treated with p-sham and p-TP. To elucidate if the higher mortality was associated with the transplantation procedure, we studied an additional group of animals transplanted with nontransduced total BM cells from syngeneic wt donors, following the conditioning and transplantation protocols used for the animals treated with p-sham and p-TP. The results showed that mice transplanted with nontransduced BM survived for an average of 75 weeks, similar to that observed in p-sham-transduced or p-TP-transduced transplanted animals (Fig. 5a and Supplementary Table S2). This suggests that the reduction of lifespan is related to the transplantation procedure rather than to the lentiviral transduction or the TP overexpression.

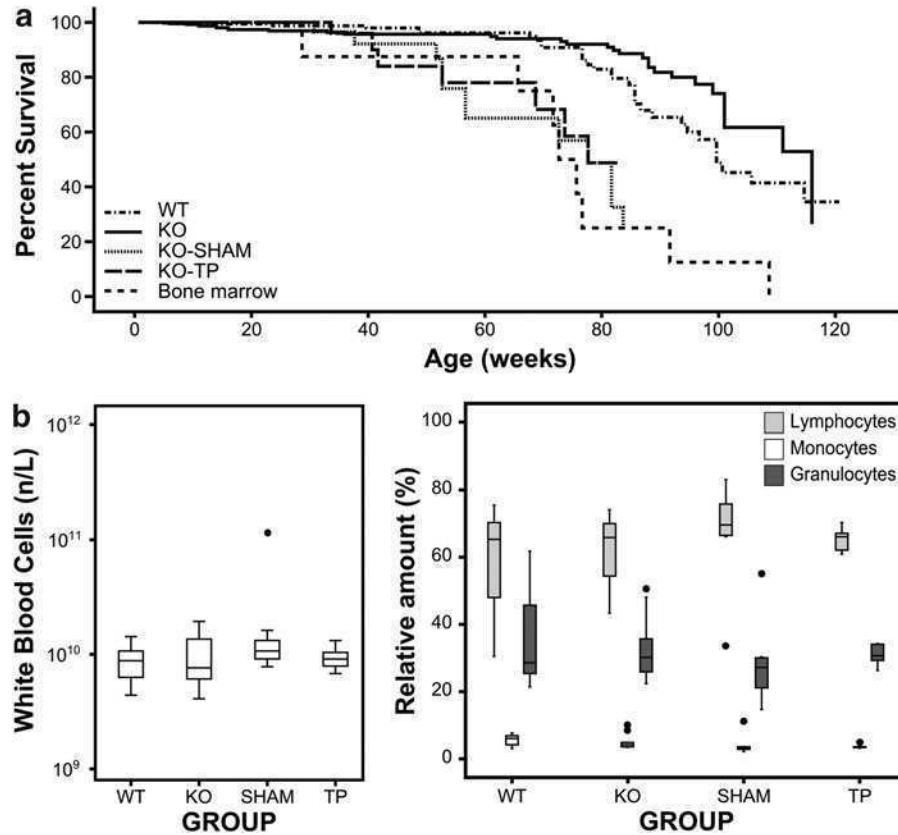
To rule out undesired hematopoietic toxicity attributable to the lentiviral transduction and/or ectopic TP expression, blood cell counts were performed periodically and at the end of the study. No differences in white blood cell counts were observed among groups (Fig. 5b).

### dNTP homeostasis

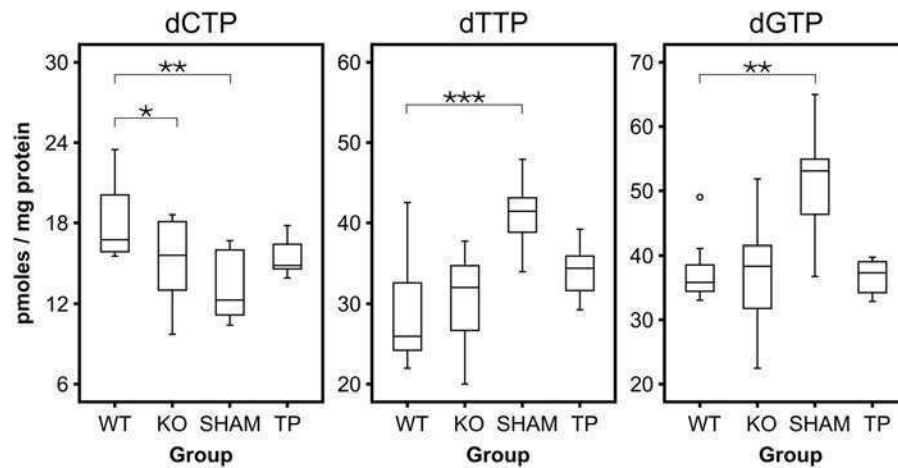
*In vitro* and *in vivo* models of MNGIE show that dThd overload results in mitochondrial dNTP pool imbalances characterized by increased dTTP<sup>6,8,9</sup> and secondary dCTP depletion.<sup>6,8,9</sup> We measured mitochondrial dNTPs in livers of 14-month-old treated and untreated mice (Fig. 6). Mitochondrial dCTP level was significantly lower in untreated and p-sham-treated KO animals, as compared with the wt values. Surprisingly, dTTP levels did not significantly increase in untreated dKO mice, but clearly did in mice treated with p-sham, and the same pattern was observed for mitochondrial dGTP. This enhanced biochemical effect observed in the mice treated with p-sham coincides with a more pronounced nucleoside accumulation in these mice (Supplementary Fig. S2). When compared with mice treated with p-sham, mitochondrial dCTP, dTTP, and dGTP levels were restored to wt values in the group treated with the TP-vector. Results obtained for mitochondrial dATP were unreliable because they were very close to the lower limit of quantification or undetectable (data not shown).

### DISCUSSION

All therapeutic approaches for MNGIE have been focused on reducing systemic dThd and dUrd overload, and most have shown biochemical efficacy,



**Figure 5.** Survival curve and blood cell counts. (a) Kaplan–Meier survival representation of wt ( $n=111$ ), nontreated ( $n=181$ ), p-sham-treated ( $n=21$ ), p-TP-treated ( $n=22$ ), and BM-transplanted ( $n=9$ ) dKO mice. (b) Blood cell counts in wt ( $n=9$ ), nontreated ( $n=10$ ), p-sham-treated ( $n=7$ ), and p-TP-treated ( $n=5$ ) dKO mice 18 months after treatment (20-month-old mice). Box plots represent the median (horizontal line), interquartile range (box), and minimum and maximum (whiskers), except outliers, which are depicted as dots.



**Figure 6.** Liver mitochondrial dNTP concentrations. Mitochondrial dNTP concentration in liver from wt (WT,  $n=10$ ), nontreated (KO,  $n=10$ ), p-sham-treated (SHAM,  $n=7$ ), and p-TP-treated (TP,  $n=5$ ) dKO mice 12 months after treatment. Box plots represent the median (horizontal line), interquartile range (box), and minimum and maximum (whiskers), except outliers, which are depicted as open circles. Asterisks indicate significant differences with WT (\* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.001$ ; \*\*\* $p<0.0001$ , Student's *t*-test).

though in some cases, such as hemodialysis, the reductions are transient and suboptimal.<sup>20–23</sup> Enzyme replacement through erythrocyte-entrapped TP administration has shown to improve the health in MNGIE patients, although the biochemical correction was only partial.<sup>21,24</sup> Only allo-HSCT has been demonstrated to be metabolically and clinically effective and associated with objective evidence of health improvement in the long-term.<sup>13,14</sup> However, this procedure has produced high morbidity and mortality rates in MNGIE patients.<sup>13</sup>

In recent years, gene therapy has emerged as a promising alternative for MNGIE patients. Our previous work has demonstrated that *ex vivo* hematopoietic stem cell gene therapy (HSCGT) using a lentiviral vector was able to provide ectopic TP activity in blood cells for at least six months after transplantation of sublethally irradiated *Tymp/Uppl* dKO mice. Lentiviral-mediated TP expression restored normal dThd and dUrd homeostasis in this mouse model one month after treatment.<sup>15</sup> In this follow-up study, we expand our previous results that support two important concepts. First, that TP activity provided by lentiviral HSCGT as well as its effects on systemic nucleoside homeostasis (i.e., restoration of dThd and dUrd concentrations to wt levels in blood and tissues) are maintained throughout the lifespan of treated mice. Although the mortality rate of the animals was significantly increased by the transplantation procedure, which limited the number of mice available for postmortem studies at advanced age, we were still able to study biochemically and molecularly 5 animals 18 months after treatment. None lost the gene-modified cells or the transgene expression. Two animals had low levels of chimerism, negligible TP activity, and increased nucleoside levels in blood 18 months after treatment, but those mice already had very low chimerism early after treatment. For unknown reasons, *ex vivo* transduction and/or engraftment after transplant were not efficient in these two animals. A primary graft failure related to the quality or the viability of the BM cells transplanted or the presence of an immune response to the transgene products cannot be ruled out. On the other hand, the 3 animals with moderate chimerism levels immediately after treatment maintained relatively good levels of chimerism and TP activity 18 months after the treatment. Overall, these results indicate that, when transduction and engraftment are successful (i.e., moderate levels of chimerism achieved after transplant), TP function is maintained and is effective in lowering nucleosides over the lifespan of the mice. Other preclinical studies in larger model

animals have demonstrated that lentiviral HSCGT is stable during six years after transplantation.<sup>25</sup> Furthermore, there are running clinical trials using lentiviral HSCGT for X-linked adrenoleukodystrophy and Wiskott–Aldrich syndrome that report long-term therapeutic effect for more than three years.<sup>26,27</sup> These observations support the notion that lentiviral HSCGT may provide stable TP expression in MNGIE patients.

The second important finding of our study is that partial restoration of TP activity, irrespective of the organ or tissue where it is expressed, is sufficient to clear dThd and dUrd systemically. Indeed, the present results confirm that moderate levels of molecular chimerism in blood (around 10%) are sufficient to reach biochemical efficacy, and nucleosides are cleared from all organs even though TP activity is only present in hematopoietic cells. Therefore, the use of a moderate and well-accepted low genotoxic promoter such as hPGK, previously used in a lentiviral-based clinical trial,<sup>28</sup> suffices to restore the nucleoside homeostasis in our model. This represents an advantage in terms of safety, because the need for stronger promoters would be associated with higher risks of genotoxicity attributable to potential transactivation of oncogenes.<sup>29</sup>

Hematopoietic progenitors transduced with the therapeutic lentiviral vector were infused in dKO mice after sublethal total body irradiation. As a result, treated animals expressed TP in hematopoietic tissues (blood cells, BM, and spleen). TP restoration was very low in other tissues; minute or moderate increases of TP activity were observed in brain, skeletal muscle, and small intestine. Blood contamination of the tissue sample likely contributed to these activities, as organs were collected without prior exsanguination. Nevertheless, we cannot rule out the contribution of tissue-resident cells of hematopoietic origin, such as macrophages or other cell types, as suggested by the fact that TP activity (expressed per mg of protein) in the small intestine is similar or even higher than that observed in blood cell extracts. Nucleoside reduction observed in skeletal muscle, brain, and liver correlated with TP activity in BM, blood cells, and spleen but not with their own TP activity, indicating that systemic dThd and dUrd clearance is mainly carried out by the system, supporting the notion that the biochemical defect in MNGIE can be repaired by molecular correction in any tissue or cell type. Furthermore, we have recently demonstrated that another gene therapy strategy using an AAV targeted at the liver provides enough TP activity to this tissue to clear systemic nucleoside accumulation.<sup>19</sup>

It should be noted that, in contrast with other tissues analyzed, reductions of nucleoside concentrations in the small intestine were only partial, and this observation coincides with our prior studies using a liver-targeted AAV to deliver TP.<sup>19</sup> The reasons for the difficulty in clearing excess nucleoside from the intestine in the animal model are unknown. A substantial proportion of the nucleosides found in this organ could be derived from direct absorption from the diet; therefore, continuous diet supply would be hindering the total removal of these compounds by the blood stream. Efforts should be focused on understanding the specific difficulty in clearing nucleosides from small intestine, and on finding the way to improve it, as the small intestine is one of the most clinically affected organs in MNGIE.<sup>11</sup>

One of the consequences of dThd and dUrd overload in MNGIE is the imbalance of the mitochondrial dNTP pool. Observations from *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that dThd excess induces dTTP expansion and dCTP depletion in mitochondria, which interferes with mtDNA replication.<sup>6,8,9</sup> Our results here reveal a modest dNTP imbalance in liver mitochondria of dKO mice, as compared with those of their wt counterparts. In fact, this dNTP imbalance (including a dGTP expansion) is enhanced in mice treated with p-sham, coinciding with a more pronounced nucleoside accumulation in this group. Our findings recapitulate *in vitro* and *in vivo* results previously reported by others.<sup>10,30</sup> The reasons why dNTP imbalances are more pronounced in the animals treated with p-sham are not clear. Irradiation and transplantation procedures may perturb nucleotide metabolism of the mice; however, the mice were treated at 2 months of age, and dNTPs were analyzed at 14 months, and it is unlikely that alterations in dNTP metabolism early in the life of the animals would have such long-lasting effects. In any case, the treatment with the therapeutic vector largely prevented the dNTP imbalance observed in mice treated with p-sham, which further supports the positive effects of the treatment.

One of the aims of our long-term study was to assess the effects of treatment on other phenotype traits of the animal model, as it has been previously reported that old animals develop mtDNA depletion, histological alterations in brain, and leukoencephalopathy.<sup>6</sup> However, we did not find differences in brain and liver mtDNA copy number, brain magnetic resonance imaging, or histological changes in muscle or brain in our experimental mice. In fact, in the original report the magnitude of these phenotypic differences was

small and elusive<sup>6</sup>; therefore, different conditions of the colony in our animal facilities may account for this discrepancy. The limitation of this murine model of the disease (the only one so far available) constitutes a significant issue for preclinical *in vivo* studies; the absence of clinical phenotype makes it difficult to evaluate whether correction of the biochemical imbalances is an appropriate demonstration of efficacy of the treatment. However, there are repeated observations that the normalization (or at least, significant reductions) of systemic dThd and dUrd levels achieved by bone marrow transplantation,<sup>13</sup> peritoneal dialysis,<sup>23</sup> or infusion of erythrocyte-entrapped TP<sup>24</sup> is associated with transient or long term-maintained clinical improvement in MNGIE patients. Therefore, the demonstration that a therapy is able to restore the biochemical homeostasis in the murine model should be combined with the increasing evidence, obtained from other treatments tested in MNGIE patients, that such biochemical restoration is beneficial.

In addition, it has been shown that feeding the dKO animals with dThd and dUrd exacerbates the phenotype in the long-term, leading to reduced survival, body weight, and muscle strength, as well as enhanced leukoencephalopathy, reduction of smooth muscle cells, and increased fibrosis in the small intestine.<sup>30</sup> These new findings constitute a relevant improvement and a valuable tool to test the therapy and will allow us to definitively show in this *in vivo* model whether this and other therapy approaches are effective improving the clinical endpoints.

The most concerning issue of HSCGT using lentiviral or other integrative vectors is the risk of insertional oncogenesis, as it was observed in initial clinical trials performed with gamma retroviral vectors.<sup>31,32</sup> The development of less genotoxic self-inactivating (SIN) vectors<sup>33</sup> has contributed to recent successes of HSCGT in clinical trials for X-linked SCID,  $\beta$ -thalassemia, Wiskott–Aldrich syndrome, metachromatic leukodystrophy, and X-linked adrenoleukodystrophy, with no adverse effects observed so far.<sup>27,28,34–37</sup> We used a SIN vector, and no oncogenic events associated to the treatment with the sham or TP vectors have been observed over 18 months, as assessed by macroscopic survey and inspection of the living animals, more specifically by periodic complete blood cell counts, and in necropsies. In addition, these analyses indicated that blood cell differentiation was not affected by the hematopoietic TP overexpression. It is noteworthy that we recently demonstrated that, in TP-deficient mice, *TYMP* can act as a suicide gene in combination with capecitabine, a commonly used anticancer drug, and this

would represent a valuable safeguard if MNGIE patients undergoing gene therapy were to develop tumors because of insertional oncogenesis.<sup>16</sup>

Although no specific adverse effects were caused by the use of the vectors (neither the sham nor the TP vectors), the transplantation procedure, which includes irradiation and BM transplantation, was associated with a lower survival rate. It is beyond the scope of this study to address the issue of the secondary effects of the conditioning and hematopoietic transplantation, but this limitation should be obviously considered when balancing the potential benefits and risks of HSCGT for MNGIE. In this regard, it should be noted that the gene transfer protocol can still be optimized to achieve higher transduction rates in the hematopoietic progenitors, which would allow us the use of milder myeloablative methods based on chemotherapeutic regimes currently used in autologous transplantation, reducing the toxicity of the procedure. A HSCGT clinical trial for Wiskott–Aldrich syndrome showed that reduction of flurabadine and busulfan doses to 50% and 30% of those used for standard allogeneic transplantation results in multilineage engraftment of gene-corrected cells in BM and blood.<sup>37</sup> Our results in the murine model indicate that relatively low levels of correction that can be achieved with reduced intensity conditioning regimens currently available could also correct the metabolic abnormalities in humans. On the other hand, even if high-intensity myeloablative conditioning regimens were required (as occurs in patients with thalassemia, metachromatic leukodystrophy, or adrenoleukodystrophy),<sup>28,34,36</sup> this toxicity could still be acceptable in comparison with that of allogeneic transplantation, which in these particular patients is extremely risky.<sup>13</sup>

Our preclinical studies have demonstrated that submyeloablative HSCGT using a SIN lentiviral vector containing a functional *TYMP* is able to restore nucleoside homeostasis in the animal model of MNGIE during the entire life of the mice. This should be considered in the context of the recent demonstration that the use of an AAV2/8 vector transcriptionally targeted at the liver also resulted in the long-term restoration of nucleoside homeostasis, using the same animal model.<sup>19</sup> Based on these results and on their safe profiles, we consider the use of an AAV vector as a potential first option in MNGIE. Nevertheless, there will be a percentage of patients who would not be eligible for such strategy because the presence of liver disease, which is not uncommon in MNGIE patients,<sup>11</sup> or the existence of anti-AAV8-neutralizing antibodies would preclude the use of this strategy.<sup>38</sup> Hence, these patients would benefit from the HSCGT strategy studied here. In summary, gene therapy using different target tissues and vectors offers plausible alternatives to treat MNGIE, and the implementation of clinical trials to demonstrate their safety and efficacy warrants serious consideration.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the *Instituto de Salud Carlos III* (Grant PI12/00322 to R.M., cofunded with FEDER funds), the United Mitochondrial Disease Foundation (Postdoctoral Grant 12–029 to J.T.-T.), and the French Muscular Dystrophy Association–Téléthon (AFMTTéléthon Postdoctoral Grant 18247 to J.T.-T.).

#### AUTHOR DISCLOSURE

No competing financial interests exist.

#### REFERENCES

- Hirano M, Garcia-de-Yebenes J, Jones AC, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy syndrome maps to chromosome 22q13.32-qter. *Am J Hum Genet* 1998;63:526–533.
- Hirano M, Nishigaki Y, Marti R. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): A disease of two genomes. *Neurologist* 2004;10:8–17.
- Hirano M, Silvestri G, Blake DM, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): Clinical, biochemical, and genetic features of an autosomal recessive mitochondrial disorder. *Neurology* 1994;44:721–727.
- Desgranges C, Razaka G, Rabaud M, et al. Catabolism of thymidine in human blood platelets: Purification and properties of thymidine phosphorylase. *Biochim Biophys Acta* 1981;654:211–218.
- Marti R, Nishigaki Y, Vila MR, et al. Alteration of nucleotide metabolism: A new mechanism for mitochondrial disorders. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:845–851.
- Lopez LC, Akman HO, Garcia-Cazorla A, et al. Unbalanced deoxynucleotide pools cause mitochondrial DNA instability in thymidine phosphorylase-deficient mice. *Hum Mol Genet* 2009;18:714–722.
- Pontarin G, Ferraro P, Valentino ML, et al. Mitochondrial DNA depletion and thymidine phosphate pool dynamics in a cellular model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *J Biol Chem* 2006;281:22720–22728.
- Ferraro P, Pontarin G, Crocco L, et al. Mitochondrial deoxynucleotide pools in quiescent fibroblasts: A possible model for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *J Biol Chem* 2005;280:24472–24480.
- Gonzalez-Vioque E, Torres-Torronteras J, Andreu AL, et al. Limited dCTP availability accounts for mitochondrial DNA depletion in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *PLoS Genet* 2011;7:e1002035.
- Song S, Wheeler LJ, Mathews CK. Deoxyribonucleotide pool imbalance stimulates deletions in HeLa cell mitochondrial DNA. *J Biol Chem* 2003;278:43893–43896.
- Garone C, Tadesse S, Hirano M. Clinical and genetic spectrum of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain* 2011;134:3326–3332.
- Halter J, Schupbach WM, Casali C, et al. Allogeneic hematopoietic SCT as treatment option for

- patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): A consensus conference proposal for a standardized approach. *Bone Marrow Transplant* 2010;46:330–337.
13. Halter JP, Michael W, Schupbach M, et al. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain* 2015;138:2847–2858.
  14. Hirano M, Marti R, Casali C, et al. Allogeneic stem cell transplantation corrects biochemical derangements in MNGIE. *Neurology* 2006;67:1458–1460.
  15. Torres-Torronteras J, Gomez A, Eixarch H, et al. Hematopoietic gene therapy restores thymidine phosphorylase activity in a cell culture and a murine model of MNGIE. *Gene Ther* 2011;18:795–806.
  16. Lopez-Estevez S, Ferrer G, Torres-Torronteras J, et al. Thymidine phosphorylase is both a therapeutic and a suicide gene in a murine model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Gene Ther* 2014;21:673–681.
  17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.
  18. Valentino ML, Marti R, Tadesse S, et al. Thymidine and deoxyuridine accumulate in tissues of patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *FEBS Lett* 2007;581:3410–3414.
  19. Torres-Torronteras J, Viscomi C, Cabrera-Perez R, et al. Gene therapy using a liver-targeted AAV vector restores nucleoside and nucleotide homeostasis in a murine model of MNGIE. *Mol Ther* 2014;22:901–907.
  20. Lara MC, Weiss B, Illa I, et al. Infusion of platelets transiently reduces nucleoside overload in MNGIE. *Neurology* 2006;67:1461–1463.
  21. Moran NF, Bain MD, Muqit MM, et al. Carrier erythrocyte entrapped thymidine phosphorylase therapy for MNGIE. *Neurology* 2008;71:686–688.
  22. Spinazzola A, Marti R, Nishino I, et al. Altered thymidine metabolism due to defects of thymidine phosphorylase. *J Biol Chem* 2002;277:4128–4133.
  23. Yavuz H, Ozel A, Christensen M, et al. Treatment of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy with dialysis. *Arch Neurol* 2007;64:435–438.
  24. Bax BE, Bain MD, Scarpelli M, et al. Clinical and biochemical improvements in a patient with MNGIE following enzyme replacement. *Neurology* 2013;81:1269–1271.
  25. Beard BC, Kiem HP. Canine models of gene-modified hematopoiesis. *Methods Mol Biol* 2009;506:341–361.
  26. Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, et al. Lentiviral hematopoietic cell gene therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. *Methods Enzymol* 2012;507:187–198.
  27. Hacein-Bey-Abina S, Gaspar HB, Blondeau J, et al. Outcomes following gene therapy in patients with severe Wiskott-Aldrich syndrome. *JAMA* 2015;313:1550–1563.
  28. Biffi A, Montini E, Lorioli L, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science* 2013;341:1233158.
  29. Cesana D, Ranzani M, Volpin M, et al. Uncovering and dissecting the genotoxicity of self-inactivating lentiviral vectors *in vivo*. *Mol Ther* 2014;22:774–785.
  30. Garcia-Diaz B, Garone C, Barca E, et al. Deoxynucleoside stress exacerbates the phenotype of a mouse model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy. *Brain* 2014;137:1337–1349.
  31. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003;348:255–256.
  32. Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, et al. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat Med* 2010;16:198–204.
  33. Montini E, Cesana D, Schmidt M, et al. The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. *J Clin Invest* 2009;119:964–975.
  34. Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, et al. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 2009;326:818–823.
  35. Hacein-Bey-Abina S, Pai SY, Gaspar HB, et al. A modified gamma-retrovirus vector for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2014;371:1407–1417.
  36. Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature* 2010;467:318–322.
  37. Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with wiskott-aldrich syndrome. *Science* 2013;341:1233151.
  38. Boutin S, Monteilhet V, Veron P, et al. Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: Implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum Gene Ther* 2010;21:704–712.

Received for publication December 10, 2015;  
accepted after revision March 21, 2016.

Published online: March 22, 2016.