

### ANÁLISIS DE PARTÍCULAS PSEUDOVIRALES DE VIRUS ADENOASOCIADO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN EN GEL Y DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ.

Cuitláhuac Chávez Peña, Octavio Tonatihu Ramírez, Laura A. Palomares  
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa  
C.P. 62210, Cuernavaca, Morelos

Fax: (777) 3138811. E-mail: cuitlac@ibt.unam.mx , laura@ibt.unam.mx

**Palabras clave:** partículas pseudovirales, dispersión dinámica de luz, cromatografía de exclusión en gel.

**Introducción.** Los virus adenoasociados son una prometedora fuente de vectores para terapia génica, además sus cápsides pueden tener otras posibles aplicaciones. Estas partículas están constituidas por tres proteínas (VP1, VP2 y VP3) con una relación estequiométrica 10:1:1. La cápside con geometría icosaédrica contiene un total de 60 subunidades y tiene un diámetro aproximado de 20-25nm. Actualmente existen diversas metodologías de producción, siendo una de ellas la basada en el uso del sistema células de insecto-baculovirus [1]. En este sistema se expresan de forma recombinante las proteínas virales, las cuales se ensamblan para dar lugar a partículas iguales a las del virus nativo. Estas partículas no contienen el material genético viral, por lo que se les denomina partículas pseudovirales (PPV). La producción de PPV debe ir acompañada de métodos de purificación y análisis que permitan obtener y garantizar la calidad de los productos fabricados. Se han reportado diversas metodologías de purificación (centrifugación isopícnica, cromatografía) y cuantificación de PPV [2].

El objetivo del presente trabajo fue el evaluar la técnica de cromatografía de exclusión en gel acoplada a un sistema de detección basado en la dispersión dinámica de la luz como herramienta para el análisis de PPV recombinantes de virus adenoasociados.

**Metodología.** Se llevó a cabo la infección de células de insecto High Five™ con un baculovirus recombinante que codifica para las tres proteínas de la cápside del virus adenoasociado. A las 120 h se cosecharon las células y se trataron como se describió previamente [3]. Las proteínas virales fueron purificadas mediante ultracentrifugación en CsCl. Las bandas fueron colectadas e inyectadas en un sistema cromatográfico equipado con dos columnas de exclusión en gel [4] y acoplado a un equipo de medición de dispersión de luz. Se utilizaron fluoeresferas de 20, 40 y 100nm como estándares.

**Resultados y discusión.** Las PPV inyectadas en el sistema cromatográfico eluyen a volúmenes diferentes según su tamaño. El volumen de elución es inversamente proporcional al tamaño de la partícula. Cada uno de los picos registrados por el cromatógrafo corresponde con

mediciones del equipo de dispersión dinámica de la luz. Este equipo permite conocer el tamaño característico de cada una de las partículas inyectadas.

Las PPV analizadas eluyeron a los 16.78ml y fueron registradas en el equipo de medición de la dispersión de luz con un tamaño de 23nm. Este resultado se encuentra dentro del rango de valores reportados (20-25nm).

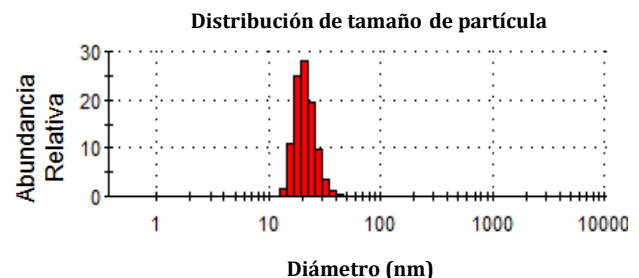


Fig. 1. Distribución de tamaño de partícula obtenida mediante el análisis de dispersión de luz.

**Conclusiones.** La combinación de un sistema de separación cromatográfico de exclusión en gel acoplado con un sistema de detección basado en la medición de la dispersión de luz fue una herramienta analítica capaz de separar y cuantificar PPV de virus adenoasociados en las muestras analizadas.

**Agradecimientos** Financiamiento CONACYT 46225 PAPIIT-UNAM 224409. Apoyo técnico de R. Pastor y V. Hernández.

#### Bibliografía.

- 1 Aucoin M., Perrier M., Kamen A. (2006). Critical assessment of current adeno-associated viral vector production and quantification methods. *Biotechnol Advan* 10:1016
- 2 Aucoin, M., Perrier, M., Kamen, A. (2006). Production of adenoassociated viral vectors in insect cells using triple infection: Optimization of baculovirus concentration ratios. *Biotechnol. Bioeng.* 95(6):1081-1092.
- 3 Chahal P., Auconin M., Kamen A. (2007). Primary recovery and chromatographic purification of adeno-associated virus type 2 produced by baculovirus/insect cell system *J. Virol. Methods* 139(1):61-70
- 4 Mena, J.A., Ramirez, O.T., Palomares, L. A. (2005). Quantification of rotavirus like particles by gel permeation chromatography. *J. Chrom. B.* 824(1-2):267-276.