



GENERACIÓN DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES DUALES BAC REP-CAP PARA LA POSTERIOR PRODUCCIÓN DE VECTORES DE VIRUS ADENOASOCIADOS DE LOS SEROTIPOS 2/1 Y 2/8.

Laura Sevilla^{1,2}, Miguel Á. Torres-Vega², Plácido Espíritu², Nancy Ortega², Ruth Pastor¹,
Tonatihu Ramírez¹, Laura A. Palomares¹.

¹Instituto de Biotecnología, Medicina Molecular y Bioprocesos, UNAM, Cuernavaca, Morelos 62210. ² Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Gastroenterología, DF 14000. stapia@ibt.unam.mx

Palabras clave: Baculovirus recombinantes, Virus adenoasociados, Sistema de células de insecto.

Introducción. Los virus adenoasociados (VAA) se están utilizando actualmente en los protocolos clínicos de Terapia Génica. Recientemente el medicamento Glybera se aprobó para el tratamiento de una deficiencia en la lipoproteína lipasa. Este es un VAA que se produce en el sistema de células de insecto-baculovirus.¹ Nosotros estamos interesados en producir VAAs con un tropismo para músculo esquelético, por lo que estamos utilizando este sistema para la generación de los VAAs de los serotipos 2/1 y 2/8. En un sistema simplificado las células de insecto Sf9 se coinfectan con dos diferentes baculovirus recombinantes: un baculovirus dual designado como bacRep-Cap que expresa las proteínas Rep78 y Rep52 del VAA2, y las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 que pueden ser de cualquier serotipo, entre ellos VAA1 ó VAA8; un segundo baculovirus recombinante porta el gen terapéutico^{2,3}. El objetivo de este trabajo es generar los baculovirus recombinantes duales bacRep-Cap, con el gen rep del VAA del serotipo 2 y los genes cap del VAA de los serotipos 1 u 8, para usarlos para producir VAAs en el sistema de células de insecto-baculovirus.

Metodología. Generación de bácmidos recombinantes. Transformación. Usando los plásmidos pSR651 y pSR660, que contienen los genes rep-2 y cap-1 u 8 respectivamente, se transforman células de *E. Coli* DH10Bac, en las que por un proceso de transposición se lleva a cabo la inserción de los genes de interés hacia el genoma del baculovirus, denominado por ello un bácmido recombinante. **Análisis de los transformantes por PCR de colonia.** Las colonias candidatas en las cuales se llevó a cabo la transposición en el lugar correcto del bácmido muestran una coloración blanca, a diferencia del resto de las colonias que son de color azul. Tomando una muestra de las colonias blancas, se lleva a cabo un PCR con oligos específicos para determinar si hubo transposición de los genes de interés. **Análisis de los bácmidos aislados.** Se aísla y se purifica el DNA de los bácmidos recombinantes a partir de las DH10Bac transformadas y se analiza por PCR con oligos específicos.

Resultados.

Se obtuvieron colonias recombinantes bacRep-Cap de los serotipos de VAA2/1 y VAA2/8, seleccionadas

mediante su resistencia a determinados antibióticos y la nula expresión del gen reportero *LacZ*. La verificación del proceso de transposición, para generar un bácmido recombinante, se llevó a cabo en las colonias y en los bácmidos recombinantes aislados mediante PCR, utilizando para ello oligonucleótidos que hibridan en secuencias específicas del bácmido y en los genes de interés (rep y cap). Los productos de PCR indican que la transposición ocurrió correctamente, puesto que los productos amplificados resultaron estar en los pesos moleculares esperados (Fig.1).

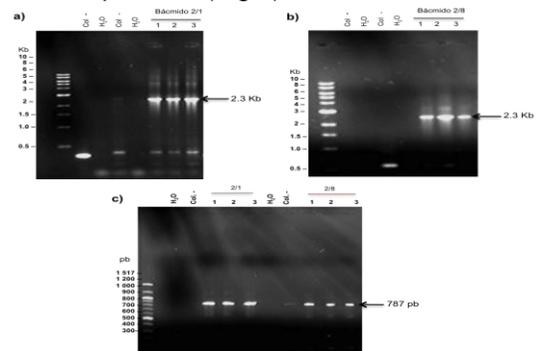


Fig. 1. PCRs de los bácmidos recombinantes con los genes rep y cap de los AAVs 2/1 y 2/8. a) bácmido recombinante 2/1, con un fragmento amplificado de 2.3 kb, b) bácmido recombinante 2/8 con un fragmento amplificado de 2.3 kb, c) bácmidos recombinantes 2/1 y 2/8 con un fragmento amplificado de 787 pb.

En paralelo se está llevando a cabo un modelo animal de cirrosis por medio de ligadura del conducto biliar, en el cual se probarán los VAA recombinantes. Resultados preliminares indican que los animales tienen poco peso e ictericia.

Conclusiones. Los baculovirus bacRep-Cap 2/1 y 2/8 generarán partículas de VAA que entregarán genes de forma dirigida hacia músculo esquelético.

Agradecimiento.

Al Dr. Rober M. Kotin del NHI Bethesda, USA por la donación de los plásmidos pSR651 y pSR660.

Bibliografía.

1. Kotterman MA & Schaffer DV. (2014). *Nature Rev. Gen.* 14:445-451.
2. Urabe M, Ding C, Kotin RM. (2002). *Hum Gene Ther.* 13(16):1935-1943.
3. Smith RH, Levy JR, Kotin RM. (2009). *Mol Ther.* 17(11): 1888-1896.