



OPTIMIZACION DE LA PRODUCCION DE VECTORES ADENOVIRALES “HELPER DEPENDENT” POR MEDIO DE LA MULTIPLICIDAD DE INFECCION

Angélica Meneses Acosta², Edwige Dormond¹, Yves Durocher¹, Renald Gilbert¹ y Amine Kamen¹.

1. Biotechnology Research Institute, CNRC-NRC. 6100 Royalmount Av. Montreal, QC. H4P 2R2 Canadá.

2. Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. ama302001@yahoo.com.mx

Palabras clave: *Multiplividad de Infección, terapia génica, vectores adenovirales.*

Introducción. Los vectores adenovirales tipo 5 (Ad5), son uno de los sistemas virales más utilizados en terapia génica para el tratamiento de cáncer, fibrosis quística, deficiencias genéticas, etc. Clínicamente se ha demostrado que los Ad5 de 1^a y 2^a generación presentan problemas relacionados con la respuesta inmune y pérdida de expresión a largo plazo. Por ello, se han desarrollado los vectores de tercera generación, denominados “gutless” o “helper dependent” (HDV). Estos vectores solo contienen elementos de replicación y la señal de empaquetamiento por lo que son considerados un sistema de expresión de alta capacidad (25-35 kDa) y de expresión a largo plazo ya que la respuesta inmune generada es mínima (2). Sin embargo, las limitantes de este sistema se presentan principalmente a nivel de producción ya que la generación de los HDV requiere de una coinfección con un virus “auxiliar” (HV) que brinde todos los elementos replicación viral en *trans*; esto conlleva a un proceso de purificación más complejo y además los títulos virales obtenidos son más bajos que en el caso de Ad5 de 1^a y 2^a generación.

Por otro lado, la multiplicidad de infección (MOI), es un parámetro que establece la relación entre partículas infectivas iniciales por célula, y se ha empleado ampliamente para la producción racional de varios tipos de partículas virales (1).

Por tanto, el objetivo principal de este trabajo fue optimizar la producción de un vector modelo tipo HD utilizando el sistema de expresión FLP/*frt* mediante el análisis de la multiplicidad de infección.

Metodología. Se utilizó el vector adenoviral HD proveniente del plásmido pCB-LacZ-ITR, cuyo gene reportero fue el cassette de expresión LacZ. El vector auxiliar fue un vector adenoviral de primera generación con fragmentos *frt* que expresaba la proteína luciferasa. Se usaron células 293 SF/FLP cultivadas en medio NSFM13 con 0.75 µg/mL de puromicina, las cuales crecen en suspensión. Se realizaron cultivos a nivel de matraces agitados (50 mL) a diferentes multiplicidades de infección del HDV desde 0.1 hasta 50. La MOI para el HV fue de 5 en todos los casos. Todos los experimentos se hicieron por duplicado. Se evaluó la cinética de infección por 72 h.

Las técnicas analíticas empleadas para determinar la cantidad de partículas virales y el proceso de infección fueron HPLC, ensayo de transferencia genética (HDV), evaluación del efecto citopático (HV) y expresión de las proteínas b-gal y luciferasa.

Resultados y discusión. Los resultados demostraron que la expresión de la proteína reportera fue proporcional al proceso de infección de ambos virus. Sin embargo, la formación de partículas tanto virales totales e infectivas resultó ser similar a partir de la MOI 5 (Fig. 1).

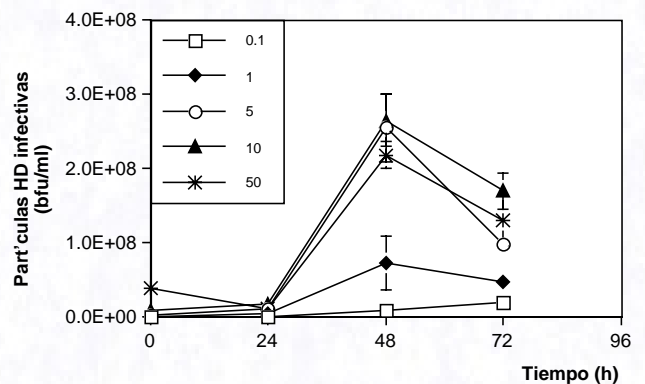


Fig. 1 Efecto de la Multiplicidad de Infección del vector adenoviral HD en matraces agitados de 50 mL.

El porcentaje de virus contaminante fue menor al 1% en todos los casos. La producción del HV fue inversa a la generación de las partículas HDV por lo que se considera una importante relación con la carga metabólica de la célula. Posteriormente, el efecto de la MOI se comprobó mediante la amplificación del HDV durante los primeros pases y se comparó con el criterio generalmente usado que es el volumen, observándose un incremento sustancial en el título viral después del cuarto pase por lo que se redujo la probabilidad de recombinación homóloga.

Conclusiones. Estos resultados ayudan a mejorar la producción de los vectores HDV mediante un estudio racional de los parámetros del cultivo, combatiendo la recombinación homóloga y permitiendo obtener altos títulos virales.

Agradecimientos. PROMEP-UAEM.

Bibliografía.

- Nadeau I, Kamen A. (2003). Production of adenovirus vector for gene therapy. *Biotechnol Adv* 20: 475-489.
- Parks RJ, Chen L, Anton M, Sankar U, Rudnicki MA, Graham FL. (1996). A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc Natl Acad Sci*, 93; 13565 – 13570.