



SÍNTESIS DE CÁPSIDES DE VIRUS ADENO-ASOCIADO TIPO 2 EN CÉLULAS DE INSECTO: HACIA LA PRODUCCIÓN DE VECTORES PARA TERAPIA GÉNICA

Lilí E. Gallo Ramírez, Octavio Tonatiuh Ramírez, Laura A. Palomares.
IBT- UNAM, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, C.P. 62210, Cuernavaca, Morelos.
Fax: (777) 3138811. E-mail: laura@ibt.unam.mx

Palabras clave: Virus adeno-asociado tipo 2 (VAA-2), cápside, terapia génica.

Introducción. La terapia génica implica introducir ácidos nucleicos en células para corregir anomalías. Los vectores de virus adeno-asociado (vVAA) son de gran interés en terapia humana. Su producción en células de mamífero es muy ineficiente. Para producirlos en células de insecto se ha utilizado un sistema donde las proteínas de la cápside son expresadas usando el baculovirus BacCap [1, 2], reportando buenos rendimientos. La cápside de VAA-2, de 20-25 nm, está compuesta por las proteínas VP1, VP2 y VP3 en relación aproximada de 1:1:10. Se ha observado una relación directa entre el número de cápsides producidas y la multiplicidad de infección (MDI) de BacCap [2], pero aún se desconocen los parámetros cinéticos de producción de proteína VP así como los rendimientos de ensamblaje. Esta información resulta importante para sintetizar cápsides para producir vectores virales o nanomateriales. Por tanto, el propósito de este trabajo fue conocer el comportamiento cinético y los rendimientos de producción de proteína VP, así como su eficiencia de ensamblaje en células de insecto.

Metodología. Se infectaron células High Five® a 1×10^6 cél/mL usando diferentes MDI de BacCap. Se tomó muestra cada 24 h y se trataron como se describió previamente [2]. Se cuantificó VP total por densitometría de Western Blot usando el anticuerpo B1 para VP1, VP2 y VP3 (PROGEN, Biotechnik). Se cuantificó VP ensamblada usando HPLC-GP [3] y usando buffer Na_2HPO_4 10mM, pH 8. Se purificaron cápsides a partir de pellet utilizando ultracentrifugación con gradientes de CsCl y se caracterizaron por microscopía electrónica (ME) usando tinción negativa.

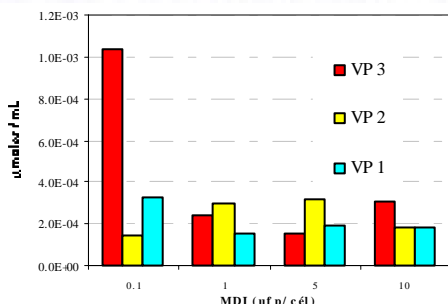


Fig. 1. Conc. máx. de VP usando distintas MDI de BacCap.

Resultados y discusión. La viabilidad de los cultivos siguió una relación inversa a la MDI usada. La proteína VP se detectó principalmente en pellet. La MDI de 0.1 ufp/cél dio los mejores rendimientos de VP total y ensamblada, no se observó diferencia para las otras MDI. Sólo para la MDI menor, la relación molar de proteína VP total fue similar a la

reportada para cápsides (fig. 1). El número de cápsides fue 10 veces menor al calculado estequiométricamente considerando que VP3 se agota, pero la concentración de cápsides a cada MDI sigue la tendencia de este cálculo. En todas las MDI la proteína ensamblada fue casi el 1% del total, lo que indica un proceso ineficiente. Usando HPLC-GP se cuantificó y purificó, sin interferencia de baculovirus, partículas de 21 nm que reaccionaron con B1 (tabla 1). Por ultracentrifugación se purificaron partículas de densidad de 1.28 g/mL, similar a la reportada para cápsides vacías [1]. La estructura y composición de las cápsides se corroboró por reacción positiva con el anticuerpo B1, y por ME donde se detectaron partículas vacías de 20-25 nm de diám. (fig. 2).

Tabla 1. Producción de cápsides y eficiencia de ensamblaje.

MDI	Cáp/mL	Error	% VP ensamblada
0.1	1.0E+12	3.9E+11	1.887 ± 0.848
1	2.3E+11	1.0E+11	0.753 ± 0.297
5	1.5E+11	4.9E+10	1.081 ± 0.356
10	3.2E+11	6.3E+10	0.880 ± 0.108

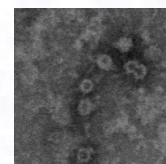


Figura 2. Microscopía electrónica de cápsides de VAA-2.

Conclusiones. Identificamos la MDI de 0.1 ufp/cél como la mejor para producir proteína VP y cápsides. Además, se calculó por primera vez la eficiencia de ensamblaje de VP, la cual fue constante para las diferentes MDI usadas. Éste es el primer repote de cinéticas de producción de VP y cápsides de VAA-2, por lo que contribuirá a mejorar la producción de cápsides para terapia génica o nanobiotecnología.

Agradecimiento. Beca CONACyT 194605, PAPIIT-UNAM IN223805 y SEP-CONACyT 46225-Z.

Bibliografía.

- Urabe, M., Ding, CH., Kotin, R. M. (2002) Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type-2 vectors. *Hum. Gene Ther.* 13: 1935-1943.
- Aucoin, M. G., Perrier, M., Kamen, A. A. (2006). Production of Adeno-associated viral vectors in insect cells using triple infection: Optimization of baculovirus concentration ratios. *Biotechnol. Bioeng.* 95(6): 1081-1092.
- Mena, J. A., Ramírez, O. T., Palomares, L. A. (2005). Quantification of rotavirus-like particles by gel permeation chromatography. *J. Chrom. B.* 824 (1-2): 267-276.