



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE VECTORES ADENOVIRALES Y ADENOASOCIADOS PARA TERAPIA GÉNICA CONTRA EL ALCOHOLISMO

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA
MENCION QUIMICA

ALICIA TRINIDAD LUCERO BAEZA

PROFESORES GUÍAS:

Dr. JUAN ASENJO DE LEUZE
Dra. BARBARA ANDREWS FARROW

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

Dr. PABLO CAVIEDES FERNÁNDEZ
Dra. ORIANA SALAZAR AGUIRRE
Dra. ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

SANTIAGO DE CHILE

2016

RESUMEN DE LA TESIS PARA OPTAR AL GRADO
DE: Doctor en Ciencias de la Ingeniería, mención
Química
POR: Alicia Trinidad Lucero Baeza
FECHA: 15/12/2016
PROFESORES GUÍA: Dr. Juan Asenjo D.
Dra. Barbara Andrews F.

Los vectores virales son un sistema de transferencia génica muy efectivo. Es por esto su amplio uso para terapia génica. Dentro del desarrollo de una terapia génica un punto muy importante a considerar es la producción y purificación de los vectores virales que transportarán dicha terapia. Su producción y purificación debe ser escalable para lograr su uso en las distintas fases de los ensayos clínicos y su posterior comercialización.

El presente estudio aborda distintas etapas de la producción y purificación de vectores virales adenovirus y adenoasociados, centrándose en su uso para una terapia génica contra el alcoholismo. Se realizó la purificación de los vectores adenovirales rAd5V que contenían la secuencia de ARN antisentido de la enzima ALDH2, y se desarrolló un pre-diseño de la purificación como base para la producción de estos vectores a mayor escala para ensayos pre-clínicos. Se pudo concluir que la columna CIM QA1 tiene rendimientos tan buenos como la columna Q-Sepharose XL, la que ha sido muy usada para esta aplicación. Sin embargo, la columna CIM QA1 puede usar flujos hasta 10 veces mayores que la columna Q-Sepharose XL, manteniendo su rendimiento. Esto implica en una reducción del tiempo de la purificación en forma considerable. Además, se desarrolló la producción y purificación de un vector alternativo para la terapia contra el alcoholismo, el vector usado fue el vector viral Adenoasociado AAV para sus serotipos 2 y 8. Se realizó la producción de los vectores AAV2 y AAV8 y su purificación se realizó usando la columna monolítica CIM QA-1. Se pudo determinar la capacidad de la columna para cada uno de los serotipos de AAV, con una capacidad de $5,2 \times 10^8$ vg/ml para AAV2 y $1,8 \times 10^{10}$ vg/ml para AAV8.

También se desarrolló un método simplificado para la producción de vectores AAV. El nuevo método simplificado utiliza una doble transfección en una línea celular recombinante de HEK293F, la que puede ser específica para cada terapia génica. Para este estudio, se desarrolló un prototipo del nuevo método utilizando el gen de la proteína GFP como gen de interés. Se logró desarrollar una línea celular HEK293F recombinante. Se logró producir vectores AAV2 y AAV8 con el nuevo método de doble transfección. Sin embargo, la producción fue 40 y 24 veces menor para AAV2 y AAV8 que el método convencional. A pesar que la visualización con TEM no entregó señales claras de problemas en la cápside, los vectores producidos con el nuevo método no fueron infectivos. Esto puede ser por una mala encapsidación de los vectores virales en el momento de la producción. Además, es necesario optimizar el método de producción con la proporción correcta de los tres elementos esenciales para la producción de AAV (ITR-Gen, Rep/Cap y genes ayudantes).

Los resultados obtenidos en el presente estudio entregan procedimientos y métodos de producción y purificación que facilitan la obtención de vectores virales para continuar con los estudios y validaciones de la terapia génica contra el alcoholismo.

A mis hijos Camila y Alfonso, a mi marido Claudio
y a mis queridos padres y suegros por su apoyo en todos estos años.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el apoyo de la Beca Doctorado Nacional 2010 de CONICYT, el Proyecto FONDEF D0811051 de CONICYT, el Instituto de Dinámica Celular y Biotecnología ICDB de la Universidad de Chile, y el Fondo Basal FB0001 CeBiB de CONICYT.

Se quiere agradecer al Laboratorio de Farmacoterapia de la Universidad de Chile y al Dr. Yedy Israel, por facilitar los plasmidios de producción de los vectores virales adenovirus y adenoasociados, conteniendo la tecnología de ARN antisentido de la enzima aldehído deshidrogenasa ALDH2 humana para terapia génica contra el alcoholismo, desarrollada por ese grupo de investigación. Además, a BIASeparation por facilitar las columnas monolíticas para cromatografía de intercambio aniónico.

También a la Dra.(c) Anamaría Sánchez, al Dr. Sergio Mercado y a la Dra. Carolina Contador por haber participado en el desarrollo de este trabajo. A Patricia Lozada por sus consejos en las técnicas de RT-PCR, a la Dra. Vida Rodríguez y al Dr. Javier Gimpel por su apoyo en Biología Molecular, a la Dra. María Cristina Ravanal, y a la Dra. Casilda Mura.

Además, los mayores agradecimientos a los Profesores guía Dr. Juan Asenjo y Dra. Barbara Andrews por su apoyo y confianza durante todos estos años.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iii
TABLA DE CONTENIDO.....	iv
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIACIONES	ix
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes Generales.....	1
1.2 Antecedentes Bibliográficos.....	2
1.2.1 Vectores Virales para Terapia Génica	2
1.2.2 Producción y Purificación de vectores virales.....	3
1.2.3 Uso de Células HEK293 para producción de biofármacos	4
1.3 Objetivos	6
2 PURIFICACIÓN DE VECTORES ADENOVIRALES SEROTIPO 5 PARA TERAPIA GÉNICA CONTRA EL ALCOHOLISMO USANDO CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO.....	7
2.1 Resumen.....	8
2.2 Introducción	9
2.3 Materiales y Métodos.....	11
2.3.1 Línea celular	11
2.3.2 Medio de cultivo y condiciones de cultivo para la línea celular HEK-293-F	11
2.3.3 Producción de vector adenoviral recombinante	11
2.3.4 Purificación de los vectores virales por cromatografía de intercambio aniónico. 11	
2.3.5 Análisis estructural del vector viral mediante TEM	12
2.3.6 Cuantificación de los vectores adenovirales mediante equipo RT-PCR	12
2.3.7 Análisis de la pureza de los vectores adenovirales purificados mediante SDS-PAGE.....	13
2.4 Resultados.....	14
2.4.1 Producción de vectores adenovirales recombinantes serotipo 5 (rAdV5).....	14
2.4.2 Comparación de los perfiles de elución de la purificación del vector adenoviral rAdV5 con cromatografía de gradiente lineal.....	15
2.4.3 Comparación de los perfiles de elución de la purificación del vector adenoviral rAdV5 con cromatografía de gradiente de dos pasos.....	17
2.4.4 Purificación de rAdV5 usando elución de gradiente de dos pasos a diferentes flujos	19
2.4.5 Purificación de rAdV5 usando gradiente de dos pasos con diferentes volúmenes de muestra.....	21
2.5 Discusión y Conclusiones	23
3 PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE VECTORES ADENOASOCIADOS AVV Y scAAV SEROTIPOS 2 Y 8 PARA TERAPIA GÉNICA CONTRA EL ALCOHOLISMO	25
3.1 Resumen.....	26
3.2 Introducción	27
3.3 Materiales y Métodos.....	30
3.3.1 Líneas Celulares y condiciones de cultivo	30
3.3.2 Vectores plasmidiales para producción de vectores AAV	30
3.3.3 Producción de vectores AAV	31

3.3.4	Purificación de los vectores AAV y scAAV usando cromatografía de intercambio aniónico	31
3.3.5	Análisis mediante TEM de los vectores virales AAV producidos y purificados ...	32
3.3.6	Cuantificación mediante RT-PCR de la producción de AAV y fracciones eluidas de las cromatografías	32
3.3.7	Análisis de pureza mediante SDS-PAGE	32
3.3.8	Transducción de células HepG2 para análisis de infectividad de los vectores virales AAV purificados	32
3.4	Resultados y Discusión.....	33
3.4.1	Producción de rAAV2, scAAV2, rAAV8 y scAAV8	33
3.4.2	Purificación de los vectores virales AAV2, scAAV2, AAV8 y scAAV8	33
3.4.3	Análisis estructural de los vectores virales AAV2 y AAV8 mediante TEM	39
3.4.4	Análisis de infectividad de vectores purificados.....	40
3.5	Conclusiones	41
4	INGENIERÍA GENÉTICA DE HEK 293 PARA PRODUCCIÓN DE VECTORES ADENO-ASOCIADOS PARA USO EN TERAPIA GÉNICA CONTRA EL ALCOHOLISMO.....	42
4.1	Resumen.....	43
4.2	Introducción	44
4.3	Materiales y Métodos.....	47
4.3.1	Línea celular y condiciones de cultivo	47
4.3.2	Ingeniería Genética de HEK293F	47
4.3.3	Producción de vectores adenoasociados AAV serotipos 2 y 8 usando HEK293F y HEK293F_ITRGFP recombinante	50
4.3.4	Cuantificación de la producción de AAV	50
4.3.5	Determinación del número de copias del fragmento de interés en el genoma de las células HEK293F-ITR_GFP	51
4.4	Resultados y Discusión.....	52
4.4.1	Generación del constructo de interés y su clonamiento en plasmidio PB510B ..	52
4.4.2	Obtención de células HEK293F_ITRGFP recombinante y comparación de su curva de crecimiento.....	54
4.4.3	Producción de vectores adeno-asociados AAV2_eGFP y AAV8_eGFP	56
4.4.4	Comparación del método de producción convencional con el nuevo método	57
4.5	Conclusiones	61
5	CONCLUSIONES GENERALES.....	62
6	BIBLIOGRAFÍA	65
7	ANEXOS	73
7.1	ANEXO I: Perfiles de elución y área de peaks para AAV y scAAV	73
7.2	ANEXO II: Geles SDS-PAGE de las fracciones eluidas de cromatografías de AAV79	
7.3	ANEXO III: Datos y Cálculos de cuantificación con RT-PCR de cromatografía de intercambio aniónico para purificación de AAV y scAAV	82
7.4	Anexo IV: Resultados de Citometría de Flujo entregados por el Servicio del Laboratorio de Inmunología de la Universidad de Chile	85

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Rendimiento de producción de rAAV con diferentes métodos	44
Tabla 2: Áreas de los peak de elución de las cromatografías de intercambio aniónico para purificar AAV serotipos 2 y 8	78
Tabla 3: Valores de Cq de RT-PCR de las fracciones eluidas en la purificación de AAV2, AAV8, scAAV2 y scAAV8	82
Tabla 4: Descripción de los tratamientos de infección con AAV2 en HEK293F realizados en cada muestra analizada por citometría de flujo	85
Tabla 5: Descripción de los tratamientos de infección con AAV2 y AAV8 en HEK293F realizados en cada muestra analizada por citometría de flujo	92

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Terapias génicas realizadas con diferentes sistema de transferencia génica...	3
Figura 2: Análisis Estructural de rAdV5 mediante TEM.....	15
Figura 3: Perfiles de Elución con gradiente lineal de cromatografías de intercambio aniónico del sobrenadante del lisado celular conteniendo rAdV5	16
Figura 4: Perfiles de Elución con gradiente de dos pasos de cromatografías de intercambio aniónico del sobrenadante del lisado celular conteniendo rAdV5	18
Figura 5: Perfiles de Elución con gradiente de dos pasos de cromatografías de intercambio aniónico y diferentes flujos usando la columna monolítica CIM QA-1.....	20
Figura 6: Análisis de la purificación de rAdV5 desde el lisado celular usando gradiente de dos pasos con un volumen mayor de muestra	22
Figura 7: Purificación en dos pasos de AAV2_antiAldh2 por cromatografía de intercambio aniónico con columna monolítica CIM QA-1	34
Figura 8: Purificación en dos pasos de scAAV8_antiAldh2 por cromatografía de intercambio aniónico con columna monolítica CIM QA-1	36
Figura 9: Purificación en dos pasos de scAAV8_eGFP por cromatografía de intercambio aniónico con columna monolítica CIM QA-1.....	37
Figura 10: Análisis mediante TEM del vector viral AAV2 purificado con la columna monolítica CIM QA-1	39
Figura 11: Análisis mediante TEM del vector viral AAV8 purificado con la columna monolítica CIM QA-1	39
Figura 12: Microscopía de fluorescencia de células HepG2 transducidas con el vector viral scAAV_GFP purificado por cromatografía de intercambio aniónico con columna monolítica CIM QA-1	40
Figura 13: Identificación de clones positivos con pGemT_ITRGFP	52
Figura 14: Identificación de clones positivos con PB510_ITRGFP.....	53
Figura 15: Curvas de Crecimiento de HEK293F normal y modificada	55
Figura 16: Distribución de células recombinantes HEK293F_ITGFP1 según emisión de fluorescencia.	55
Figura 17: Visualización mediante microscopio de las placas con HEK293F y HEK293F_ITRGFP1 a las 48 horas de producción de AAV2.....	56
Figura 18: Visualización mediante microscopio de las placas con HEK293F y HEK293F_ITRGFP1 a las 48 horas de producción de AAV8.....	56
Figura 19: Visualización mediante microscopio de las placas controles (sin transfectar) con HEK293F y HEK293F_ITRGFP1 a las 48 horas de producción.....	57
Figura 20: Análisis mediante TEM del vector viral AAV2 producido con el método convencional	59
Figura 21: Análisis mediante TEM del vector viral AAV2 producido con el nuevo método	59
Figura 22: Análisis mediante TEM del vector viral AAV8 producido con el método convencional	60

Figura 23: Fotografía de Análisis mediante TEM del vector viral AAV8 producido con el nuevo método.....	60
Figura 24: Perfil de elución purificación de AAV2_antiAldh2 por cromatografía de intercambio aniónico con columna monolítica CIM QA-1	73
Figura 25: Perfil de elución purificación del Flow Through de la cromatografía de AAV2_antiAldh2.....	74
Figura 26: Perfil de elución purificación de scAAV2_antiAldh2 por cromatografía de intercambio aniónico con columna monolítica CIM QA-1	74
Figura 27: Perfil de elución purificación del Flow Through de la cromatografía de scAAV2_antiAldh2.....	75
Figura 28: Perfil de elución purificación de scAAV2_GFP por cromatografía de intercambio aniónico con columna monolítica CIM QA-1	75
Figura 29: Perfil de elución purificación de AAV8_antiAldh2 por cromatografía de intercambio aniónico con columna monolítica CIM QA-1	76
Figura 30: Perfil de elución purificación de scAAV8_antiAldh2 por cromatografía de intercambio aniónico con columna monolítica CIM QA-1	76
Figura 31: Perfil de elución purificación de scAAV8_GFP por cromatografía de intercambio aniónico con columna monolítica CIM QA-1	77
Figura 32: Perfil de elución purificación del Flow Through de la cromatografía de scAAV8_GFP	77
Figura 33: Gel 1 SDS-Page de fracciones eluidas en purificación de AAV2_antiAldh2 .	79
Figura 34: Gel 2 SDS-Page de fracciones eluidas en purificación de AAV2_antiAldh2 y scAAV2_antiAldh2.....	79
Figura 35: Gel 3 SDS-Page de fracciones eluidas en purificación de scAAV2_antiAldh2 y scAAV2_GFP	80
Figura 36: Gel 4 SDS-Page de fracciones eluidas en purificación de scAAV2_GFP y AAV8_antiAldh2.....	80
Figura 37: Gel 5 SDS-Page de fracciones eluidas en purificación de AAV8_antiAldh2 y scAAV_antiAldh2.....	81
Figura 38: Gel 6 SDS-Page de fracciones eluidas en purificación de scAAV8_antiAldh2 y scAAV8_GFP	81

LISTA DE ABREVIACIONES

ALDH2:	Enzima mitocondrial aldehído deshidrogenasa
anti-Aldh2:	Secuencia de ARN antisentido del gen de la enzima ALDH2
AAV:	Vector viral adenoasociado
scAAV:	Self complementary Adenoassociated vector
CV:	Volúmenes de columna (Column Volumes)
FPLC:	Fast protein liquid chromatography
GFP:	Proteína fluorescente verde
GLP:	Good Laboratory Practice
hALDHfw:	Partidor forward de anti-Aldh2
hALDHrev:	Partidor reverse de anti-Aldh2
ITR:	Inverted terminal repeat
MOI:	Multiplicidad de infección (Multiplicity of infection)
rAdV5:	Adenovirus recombinante serotipo 5
RT-PCR:	PCR en tiempo real (Real time PCR)
SFB:	Suero fetal bovino
TEM:	Transmission electron microscopy
vg:	Genoma de vector viral
vp:	Partículas virales
ip:	Vectores virales infectivos (virus particle)

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes Generales

El alcoholismo es una adicción que causa problemas tanto físicos, sociales como económicos. Reducir el consumo excesivo de alcohol es una de las prioridades en políticas públicas de salud en Chile y en el mundo [1, 2]. El consumo excesivo de alcohol causa el 5,9% de las muertes en el mundo (3,3 millones de personas al año) [1]. Dentro de la estrategia mundial para combatir el alcoholismo, se encuentra el disminuir su consumo y prevenir e intervenir a tiempo en las personas más vulnerables [1]. Por lo tanto, desarrollar tratamientos farmacológicos para disminuir el consumo excesivo de alcohol, será un aporte en una de las acciones establecidas en la estrategia global contra el alcoholismo, impulsada por la Organización Mundial de la Salud [1].

Se han hecho grandes esfuerzos en desarrollar diferentes tratamientos contra el alcoholismo, ya sean tratamientos farmacológicos, psicológicos, sicosociológicos y por supuesto una combinación de ellos [3].

La FDA ha aprobado 4 fármacos para el tratamiento de la dependencia del alcohol, estos son Disulfiram, Naltrexone oral, Naltrexone inyectable, y Acamprosate [3]. El fármaco llamado Disulfiram, causa una fuerte aversión al consumo de alcohol, y ha sido usado para tratamiento de la dependencia del alcohol por más de 50 años, pero la evidencia de su efectividad es débil, debido a sus efectos colaterales. Naltrexone oral es indicado en combinación a un plan apropiado de manejo de la adicción al alcohol, reduce el consumo y ayuda a mantener la abstinencia, pero existe poca evidencia de su eficacia. Naltrexone inyectable es recomendado para tratamiento en conjunto con un soporte sicosocial, se aplica a pacientes que ya son abstinentes en etapa primaria. Y Acamprosate es indicado para ayudar a mantener la abstinencia de pacientes que mantienen simultáneamente un tratamiento sicosocial [3].

La terapia génica puede ser una alternativa de tratamiento para el consumo excesivo de alcohol [4,5,6]. Esta terapia busca inhibir la producción de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH2) de manera específica en el hígado, permitiendo que se acumule acetaldehído, el que es un producto de la oxidación del alcohol. El acetaldehído en la sangre produce efectos adversos que se manifiestan en náuseas, mareos, dolor de cabeza, entre otros [4].

Existen resultados promisorios de esta terapia génica, tanto *in vitro* como *in vivo* [4,5,6]. Se han realizado pruebas en ratas alcohólicas, donde un vector adenoviral serotipo 5, transportando un oligonucleótido con la secuencia génica que transcribe un ARN mensajero antisentido de la enzima ALDH2 (anti-Aldh2), fue inyectado vía intravenosa [4]. En ese estudio se analizó el consumo de alcohol, la actividad enzimática y la cantidad de ARN mensajero transcrito, obteniendo una disminución del consumo de alcohol en más del 50%, una disminución del 85% en la actividad enzimática de ALDH2 en el hígado, y se comprobó que la cantidad de ARN mensajero de ALDH2 era la misma, con y sin tratamiento, lo que confirma que la tecnología de ARN mensajero antisentido fue efectiva [4].

1.2 Antecedentes Bibliográficos

1.2.1 Vectores Virales para Terapia Génica

Existen dos tipos de sistemas de transferencia génica: los métodos físico-químicos y los vectores virales. Los primeros tienen varias ventajas, como su fácil preparación, gran tamaño de ADN a transferir y baja inmunogenicidad. Sin embargo, su gran inconveniente es la baja eficacia para transducir las células objetivo. Por otro lado, los vectores virales tienen alta eficacia en transducir en las células blanco en forma natural, por ello es que se han desarrollado varias técnicas para poder utilizarlos como sistema de transferencia génica, eliminando el riesgo de producir enfermedad. La desventaja mayor de los vectores virales es el tamaño limitado de ADN a transferir, dependiendo del tipo de virus [7].

Al momento presente, se han aprobado más de 2.200 ensayos clínicos para terapia génica [8]. Los sistemas de transferencia génica más usados para terapia génica han sido los vectores adenovirales, los retrovirus y el sistema de plasmidio desnudo.

Desde el año 2003, se encuentran aprobadas en China dos terapias génicas basadas en vectores adenovirales, Gendicine y Oncorine. Además, en Estados Unidos, el año 2004 fue aprobada la primera certificación GMP para producir un fármaco basado en un vector adenoviral, llamado Cerepro. Por otro lado, la agencia europea de medicamentos EMA aprobó en la Unión Europea un producto de terapia génica, basado en un vector viral adeno-asociado, Glybera [7].

De los más de 2.200 ensayos clínicos aprobados, un 57% se encuentran en Fase I y 4% se encuentra en Fase III. Los vectores de transferencia más utilizados en los ensayos clínicos de terapia génica son los adenovirus, participando en un 22% de los ensayos, seguidos por un 18% con retrovirus y 17% con plásmidos desnudos, como se muestra en la Figura 1.

Los vectores adenovirales (AdV) han sido ampliamente usados durante las últimas décadas en terapia génica. Se han reportado pruebas clínicas con más de 600 genes, donde casi un tercio de ellos usaban vectores adenovirales como medio de transferencia génica [8,9]. Se encuentran en pruebas clínicas de Fase III terapias génicas utilizando adenovirus para enfermedades como cardiopatía isquémica [9].

Los vectores virales más usados en terapia génica han sido los adenovirus y retrovirus, sin embargo en los últimos años ha crecido el uso de virus adeno-asociados y lentivirus [10].

Se han reportado pruebas clínicas que han resultado exitosas para tratar enfermedades como Hemofilia B, Inmunodeficiencia combinada severa X-linked (SCID-X1), Amaurosis congénita de Leber Tipo 2 (LCA2), y para terapia algunos tipos de leucemia usando terapia con celular T-CAR (Chimeric Antigen Receptor- T cell) [8].

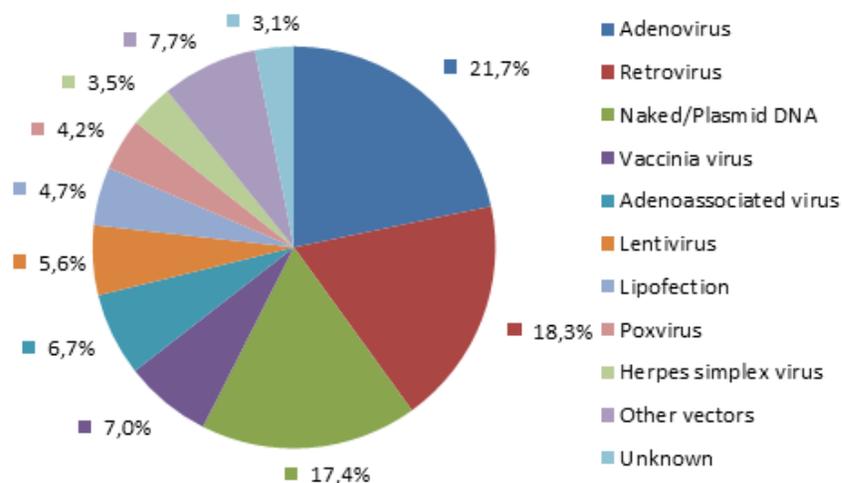


Figura 1: Terapias génicas realizadas con diferentes sistema de transferencia génica (Fuente: The Journal of Gene Medicine 2016 John Wiley and Sons Ltd., <http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/2016>)

Los adenovirus (Ad) son virus que contienen ADN de doble hebra, su diámetro es de 70-90 nm, su forma icosaédrica contiene 252 subunidades de proteínas. Se han identificado cerca de 50 serotipos, pero los más usados en aplicaciones clínicas han sido los serotipos 2 y 5 [11].

Los retrovirus son virus que contienen ARN de hebra simple, el cual se transcribe en forma reversa a ADN en la célula huésped, luego este ADN es integrado al genoma de la célula huésped. Son virus encapsulados. Su tamaño es de aproximadamente 100 nm de diámetro. Pueden transportar insertos de hasta 8 kb [12].

Los virus adeno-asociados (AAV) son virus no patogénicos y capaces de transducir células en división y células quiescentes. Los AAV tienen un tamaño pequeño, 25 a 30 nm, su ADN es de hebra simple, el tamaño de su ADN es de 4,7 kb, tiene forma icosaédrica, son virus no encapsulados. Los AAV son de la familia de Parvovirus, son virus deficientes de replicación. Requieren de un virus ayudante, como un adenovirus (Ad) o un virus herpes simplex (HSV), para completar su ciclo lítico [8]. En ausencia de virus ayudante, tienen la habilidad de hacer integración sitio-dirigida de su genoma en un locus específico (AAVS1) en el cromosoma 19 humano [13].

Los vectores lentivirales son no patogénicos, transducen células en división y quiescentes, incluyendo hepatocitos, e integran establemente el transgen en el genoma [14,15].

1.2.2 Producción y Purificación de vectores virales

Se han logrado importantes avances en la producción y purificación de vectores virales para ser usados en las distintas fases de ensayos clínicos. Para cada tipo de vector viral a ser utilizado, es necesario desarrollar procesos escalables para su producción y purificación que cumplan con los niveles de calidad requeridos [16].

La producción de vectores adenovirales, retrovirus y vectores adeno-asociados están bastante estudiados, sin embargo para producción de lentivirus está aún en etapa de desarrollo para su producción a mayor escala [17].

La purificación de vectores virales a nivel de laboratorio, sigue siendo realizada usando el método de separación con gradiente de cloruro de cesio. Este método es laborioso y no escalable, por lo tanto, para producciones de vectores virales para ensayos clínicos, se han adaptado métodos escalables ampliamente usados para purificación de proteínas. Se han podido implementar varios métodos cromatográficos, sin embargo el proceso de purificación de vectores virales sigue planteando desafíos [16].

Para el diseño de los procesos de purificación, se consideran en primer lugar las características del vector viral, esto es su fragilidad, tamaño, afinidad, carga e hidrofobicidad [16]. Otro punto importante a considerar, es el contenido de contaminantes provenientes del medio de cultivo, como también contaminantes que pudieran venir del proceso de producción, como lo son los virus ayudantes.

1.2.3 Uso de Células HEK293 para producción de biofármacos

La línea celular HEK293 se creó a partir de la transformación de células de riñón de embrión humano con fragmentos de ADN de adenovirus humano serotipo 5 (Ad5) en los años 70 [18]. Estas células incorporaron los fragmentos de ADN de Ad5 en el cromosoma 19 de su genoma. Por lo tanto, la línea celular HEK293 cuenta con el gen adenoviral E1 integrado en su genoma, lo que permite la replicación viral de adenovirus recombinante.

Además, la línea celular HEK293 es ampliamente usada para producción de proteínas recombinantes, ya que ofrece varias ventajas, tales como alto rendimiento de transfección, facilidad de crecer en suspensión, y capacidad de adaptación a crecer en medio libre de suero.

Por otro lado, las células mamíferas son las más apropiadas para producir glicoproteínas recombinantes para ser usadas en humanos, debido a la importancia de las modificaciones postraduccionales. Por ello, el uso de células mamíferas como fábricas para producir glicoproteínas para uso en medicina se ha vuelto una atractiva área de investigación [19]. Para ello, ha sido necesario realizar ingeniería genética para crear células mamíferas recombinantes para generar el producto de interés, que pueden ser por ejemplo glicoproteínas humanas o anticuerpos monoclonales.

Entre las primeras glicoproteínas recombinantes farmacéuticas producidas en células mamíferas, se encuentran tPA, la interleuquina 2 (IL-2), interferón-b (IFN-b) e interferón c (IFN-c) [19]. Anticuerpos monoclonales (Mabs) son la segunda categorías de productos biofarmacéuticos producidos en cultivo de células mamíferas. Generalmente, procesos a gran escala utilizan células CHO (Chinese Hamster Ovary), aunque también se han utilizado células linfáticas murinas como NS0 o SP2/0 [20].

Además, las células madres (*stem cells*) han sido modificadas mediante ingeniería genética para diferentes casos, por ejemplo para el uso de constructos promotores o

reporteros para el desarrollo y diferenciación de las células, la incorporación de características de seguridad en células trasplantadas, entre otros [21].

Adicionar una secuencia génica a una célula animal es posible mediante transfección de plasmidios o por medio de infección con vectores virales. La transfección puede ser estable o transitoria. Una transfección estable significa que el gen de interés se integra al genoma, en cambio una transfección transitoria mantiene en forma episomal el gen de interés. Existen sitios de integración preferentes en el cromosoma, por lo que la expresión del transgen depende de la posición de éste en el genoma. La integración al azar requiere de un método de selección exhaustivo [22].

La línea celular HEK293 ha sido usada para expresión de genes en forma estable y transitoria. Esta línea celular ha sido utilizada para producir un amplio rango de proteínas, ya sean proteínas de membrana, intracelulares y extracelulares, además se ha utilizado en producción de varios vectores virales, tales como adenovirus, vectores adeno-asociados, retrovirus y lentivirus. También, se ha usado en producción de proteínas complejas como anticuerpos monoclonales, interferon alfa y virus humanizados para vacunas, como la influenza [23].

1.3 Objetivos

El objetivo principal de esta tesis es explorar diferentes alternativas de producción y purificación de vectores virales adenovirus y adenoasociados, para su potencial uso en terapia génica contra el alcoholismo en seres humanos.

Se desarrollaron tres trabajos específicos, cuyos objetivos se nombran a continuación:

- I- Comparar la purificación con tres columnas de intercambio aniónico del vector viral Adenovirus serotipo 5 que contiene el gen antisentido de la enzima aldehído deshidrogenasa humana.
- II- Producir y purificar vectores virales Adenoasociados AAV y scAAV, serotipos 2 y 8 que contienen el gen antisentido de la enzima aldehído deshidrogenasa humana y el gen de la enzima GFP.
- III- Desarrollar un nuevo método de producción mediante ingeniería genética de HEK293F para establecer un método simplificado multiserotipo de vectores virales adenoasociados AAV para terapia génica.

Cada uno de estos trabajos se presenta a continuación en tres secciones por separado.

2 PURIFICACIÓN DE VECTORES ADENOVIRALES SEROTIPO 5 PARA TERAPIA GÉNICA CONTRA EL ALCOHOLISMO USANDO CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO

A continuación se presenta la traducción y adaptación del artículo enviado a la revista Journal of Chemical Technology and Biotechnology, que se encuentra en etapa de evaluación.

2.1 Resumen

Este estudio describe el pre-diseño de un sistema escalable para la purificación de vectores adenovirales serotipo 5 (rAd5), para ser usados en terapia génica contra el alcoholismo. Actualmente, esta terapia es la única terapia génica en desarrollo, para inhibir la síntesis de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH2), esta enzima metaboliza el acetaldehído generado en la oxidación del etanol.

Se compararon dos métodos de cromatografía de intercambio aniónico usando un equipo FPLC. Se utilizaron tres columnas cromatográficas: una columna de resina Q-Sepharose XL, y dos columnas monolíticas CIM QA-1 y CIM DEAE-1. Se logró obtener una mejor separación de los adenovirus recombinantes serotipo 5 (rAd5) usando las dos columnas de intercambio aniónico fuerte con un gradiente de dos pasos.

Al usar la columna monolítica CIM QA-1 se obtuvo el mejor rendimiento. La recuperación determinada mediante PCR en tiempo real (RT-PCR) fue de 34% con la columna CIM QA-1, en cambio con la columna Q Sepharose XL fue de 28%. A través de análisis SDS-PAGE, se calculó una pureza de 70% para la purificación con la columna monolítica CIM QA-1. El análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM), visualizó un vector estructuralmente intacto después de la purificación con cada una de las columnas utilizadas.

Esta estrategia fue base para el escalamiento del proceso de purificación realizado para la producción de los vectores virales utilizados en la primera prueba pre-clínica de esta terapia génica contra el alcoholismo.

2.2 Introducción

El alcoholismo es una enfermedad crónica que causa serios problemas económicos y sociales en todo el mundo [24]. Numerosos estudios han demostrado que sólo dos genes se asocian a factores genéticos de protección contra el alcoholismo: uno de ellos es el gen que codifica para la enzima aldehído deshidrogenasa 2 (ALDH2), y el otro gen codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) [25-27]. La enzima ALDH2 participa en la oxidación de acetaldehído a acetato. El acetaldehído es un metabolito tóxico del alcohol, pero el acetato es un metabolito que puede ser excretado del cuerpo.

Se ha encontrado que una mutación en el gen que codifica para la enzima ALDH2 mitocondrial, puede proveer protección contra el abuso en el consumo de alcohol [4]. Aquellas personas que tienen esta mutación, no pueden metabolizar el acetaldehído en acetato y muestran altos niveles de acetaldehído en la sangre cuando consumen alcohol. Esto conduce a una fuerte reacción física que disuade el consumo de alcohol. Terapias farmacológicas existentes para el tratamiento del alcoholismo incluyen la administración de fármacos que inhiben la ALDH, como el disulfiram. El Disulfiram es actualmente la droga más efectiva en el tratamiento del alcohol, y ha sido usado para tratar la dependencia del alcohol por más de 50 años [28,29]. Sin embargo, la prescripción de disulfiram ha decrecido recientemente debido a su alta toxicidad y el bajo cumplimiento del paciente [30,31].

En base a esta evidencia, una atractiva alternativa para la inhibición a largo plazo del consumo excesivo de alcohol, podría ser la administración de vectores de transferencia génica que codifiquen para moléculas de ARN antisentido del gen de la enzima ALDH2 (anti-Aldh2) para inhibir su expresión. Varios estudios *in vitro* e *in vivo* avalan esta propuesta [4,5,32]. Ocaranza y colaboradores (2008) demostró en ratas, que una única administración intravenosa del vector $\Delta E1$ -adenoviral (Ad5), conteniendo la secuencia antisentido anti-Aldh2 de rata, redujo la actividad de la enzima ALDH2 en el hígado en un 85% e inhibió el consumo voluntario de etanol de ratas dependientes del alcohol (UCHB) en un 50% durante 34 días. Estos prometedores resultados sugieren que la terapia génica, es una alternativa potente para la inhibición a largo plazo del consumo de alcohol.

Los vectores adenovirales son un atractivo vehículo para la transferencia de genes y entrega de vacunas, debido a su amplio tropismo, su capacidad de empacar transgenes de gran tamaño, y el alto nivel de expresión en la célula huésped [33]. A pesar que los adenovirus a menudo inducen respuesta inmune humoral, mucosal y celular, estos vectores se han investigado ampliamente para la entrega de genes en numerosos protocolos, y todavía son considerados entre los vectores de vacunas más eficaces [18,34-36]. Hasta hoy, aproximadamente el 22% de todos los ensayos de terapia génica han usado el vector $\Delta E1$ -adenoviral [11].

Por otro lado, un factor relevante en la producción de vectores virales es su proceso de purificación. Para ensayos clínicos, la preparación de los vectores virales necesita cumplir con estándar muy estrictos, los cuales son examinados rigurosamente por agencias reguladoras. El proceso de purificación está enfocado en eliminar contaminantes provenientes de la célula huésped o del medio de cultivo. Estos contaminantes e impurezas son removidos ya que pueden inducir respuesta

inmunológica no deseada. Además, los vectores infectivos se deben separar de las cápsidas vacías [37]. Asimismo, necesitan ser implementados procesos de producción y purificación escalables. Es por esto que el proceso de purificación debe ser diseñado para lograr altos rendimientos de vector viral cumpliendo criterios de calidad muy bien definidos [38].

El método clásico para purificar vectores virales en laboratorio, es mediante centrifugación de gradiente de densidad con cloruro de cesio (CsCl). Sin embargo, este método no es fácilmente escalable e involucra altos costos para aplicaciones de mayor escala. Por el contrario, la cromatografía líquida ofrece un escalamiento lineal directo, existiendo protocolos desarrollados para purificar 10^{14} partículas [39]. Es por esto que, cromatografía de intercambio aniónico ha sido aplicada para preparación de adenovirus a gran escala, utilizando resinas tales como Q-Sepharose XL, Resource Q y Source 15Q, siendo esta última la utilizada en forma más frecuente [38,40]. Sin embargo, se ha desarrollado una generación diferente de medio cromatográfico para procesos más efectivos de purificación de virus, VLP, fagos, pDNA y proteínas de gran tamaño [41]. Uno de ellos son las columnas monolíticas, éstas son columnas homogéneas con una matriz porosa continua entrelazadas con canales. Estos canales son de gran tamaño (1-5 μm) comparados con el tamaño de poro de resinas de esferas empacadas (5-100 nm), esto incrementa la capacidad de unión (binding capacity) de macromoléculas como adenovirus. Las columnas monolíticas se distinguen por soportar flujos altos sin afectar su desempeño. Estas columnas logran una separación, concentración y purificación de manera más rápida, cubriendo los problemas principales en el escalamiento de la producción de vectores virales [42,43]. Aun cuando varios métodos de purificación han sido descritos para vectores adenovirales, es importante optimizarlo para cada caso, para lograr el rendimiento y calidad deseados de los vectores adenovirales a ser usados [11, 38].

En la actualidad, no existe una vacuna terapéutica para el tratamiento del alcoholismo. Por lo tanto, con el fin de desarrollar y validar esta terapia génica contra el alcoholismo en humanos, es necesario desarrollar un protocolo para la purificación del vector adenoviral que codifica para el ARN antisentido anti-Aldh2 para ser usados en ensayos pre-clínicos.

El objetivo de este estudio fue diseñar un sistema escalable para la purificación de vectores adenovirales para su uso en terapia génica para tratar el alcoholismo. Se utilizaron tres columnas de intercambio aniónico para evaluar procesos de purificación y recuperación de los vectores virales usando una resina basada en esferas empacadas y dos columnas monolíticas.

2.3 Materiales y Métodos

2.3.1 Línea celular

Para la producción de los vectores adenovirales, se utilizó la línea celular de crecimiento rápido HEK-293-F (Invitrogen). Las células fueron cultivadas en una incubadora humidificada con una temperatura de 37°C y 5% de CO₂. Las células fueron cultivadas en adherencia hasta lograr 70-85% de confluencia, determinado mediante observación con microscopio, y fueron mantenidas en fase de crecimiento exponencial cada 2 días en placas de cultivo de T-75. El pasaje se registró de acuerdo a su propagación. Las células fueron subcultivadas a 0,3×10⁶ cél/ml tres veces por semana.

2.3.2 Medio de cultivo y condiciones de cultivo para la línea celular HEK-293-F

Las células HEK293-F fueron crecidas en adherencia en medio suplementado, el que consistía en DMEM/F12 (Invitrogen) con 10% (v/v) suero fetal bovino (SFB) (Invitrogen), 5 mM penicilina/estreptomina (Invitrogen), 2,44 g/l de bicarbonato de sodio (Sigma), 10 mg/l de ácido ascórbico (Sigma), 1 mg/l de putrescina (Sigma), 0,02% p/v de Pluronic F68 (Sigma), 0,01% v/v de etanolamina (Sigma), 5 mg/l de selenito de sodio (Sigma) y 1,65 ml/l de mercaptoetanol (Sigma), como ha sido descrito en otros trabajos [25]. El pH del medio fue 7, y se usó rojo fenol como indicador de pH.

La viabilidad celular fue medida usando la técnica de exclusión basada en tinción con *trypan blue* y se contaron las células vivas y muertas usando un hemocitómetro.

2.3.3 Producción de vector adenoviral recombinante

Las células fueron infectadas con una multiplicidad de infección (MOI) de 10 con un vector de primera generación rAdV5, que contiene la secuencia de ARN antisentido de la enzima aldehído deshidrogenasa 2 humana (anti-Aldh2), la cual inhibe la expresión del gen de ALDH2 bajo el control del promotor citomegalovirus (CMV). El vector rAdV5 fue provisto gentilmente por el Dr. Yedy Israel al Laboratorio de Cultivo Celular.

Se mantuvieron las células en cultivo en incubadora a 37° con 5% de CO₂. Generalmente, después de 48 horas después de la infección, las células fueron colectadas por centrifugación, resuspendidas en medio fresco y sujetas a tres ciclos de congelamiento y descongelamiento para liberar los virus. Las células y debris celular fueron removidos por centrifugación, y el sobrenadante que contienen el adenovirus liberado fue almacenado a -80°C.

2.3.4 Purificación de los vectores virales por cromatografía de intercambio aniónico

La purificación fue realizada con un equipo FPLC AKTA system (GE Healthcare). El buffer A usado contenía 20 mM Tris-HCl pH 7,5 y el buffer B contenía 20 mM Tris-HCl y 2M NaCl pH 7,5. Los vectores virales fueron purificados usando tres columnas diferentes de intercambio aniónico: Q Sepharose XL (1 ml, GE Healthcare) de intercambio aniónico fuerte, columna monolítica CIM QA-1 (1 ml, BIASeparation) de

intercambio aniónico fuerte, y columna monolítica CIM DEAE-1 (1 ml, BIASeparation) de intercambio aniónico débil. Para las columnas Q-Sepharose XL y CIM DEAE-1, las cromatografías fueron realizadas a un flujo de 1 ml/min y para la columna CIM QA-1 las cromatografías fueron realizadas a flujos de 1, 5 and 10 ml/min.

Se realizó un gradiente lineal y un gradiente de dos pasos adaptados desde literatura [40,41]. Las columnas fueron equilibradas con buffer A, y después que la muestra fue cargada, se comenzó con la elución mediante un gradiente lineal de 0M a 1M de NaCl en buffer A por 30 volúmenes de columna (CV). La elución con gradiente lineal de dos pasos consistió en un gradiente lineal de 0M a 0,35M de NaCl en buffer A por 4 CV, se mantuvo en este punto por 6 CV, luego se aplicó un segundo gradiente de 0,35M a 1,2M de NaCl en buffer A por 10 CV, y una mantención final a 1,2 M NaCl por 10 CV. Todas las muestras fueron filtradas usando filtro de 0,45 µm. Las muestras correspondían a lisado crudo filtrado de 1 o 10 ml de volumen. Después de cada corrida de purificación, las columnas se limpiaron con 2 CV de una solución 0,5 N de NaOH [44].

La cuantificación del total de partículas virales (vp) se realizó mediante la medición de absorbancia a 260 nm (A₂₆₀) y se utilizó el factor de conversión de $1,1 \times 10^{12}$ partículas virales por unidad de absorbancia a 260 nm reportado [40,45].

2.3.5 Análisis estructural del vector viral mediante TEM

La morfología del vector adenoviral y su integridad fueron evaluadas mediante la visualización de virus teñidos negativamente usando microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para ello se cargaron 15 µl de muestra sin diluir en grillas recubiertas Parlodion® por 15 segundos. Después, se tiñeron con 17 µl de acetato de uranilo al 1% por un minuto, las grillas fueron observadas mediante el equipo TEM Phillips Tecnai operado entre 12 kV a 80 kV. Las imágenes fueron obtenidas usando una cámara Kodak EM film SO-163, y escaneadas con un equipo Epson Perfection 3170 Photo a 300 dpi.

2.3.6 Cuantificación de los vectores adenovirales mediante RT-PCR

La secuencia del gen antisentido anti-aldh2 fue cuantificada mediante la técnica RT-PCR. La técnica RT-PCR fue realizada usando el equipo LightCycler® Nano System (Roche Diagnostics) con el método de fluoróforo SYBR Green (Roche Diagnostics), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. La reacción (20 µl) consistió en una mezcla de 5 µl de extracto de ADN adenoviral, 10 µl de la mezcla 2X Fast Start Essential DNA Green Master (Roche Diagnostics), 1 µl de cada uno de los partidores forward y reverse (10 µM), y 3 µl de agua libre de nucleasa. El ADN viral fue extraído usando el kit High Pure Viral Nucleic Acid (Roche Diagnostics).

El protocolo para RT-PCR fue el siguiente: 95°C por 600 segundos y 50 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturar el ADN templado, 60°C por 20 segundos para alineamiento de los partidores, y 72°C por 20 segundos para la extensión. Los partidores diseñados fueron:

Partidor forward **hALDHfw** 5'GGCTGGGCTGATAAGTACCAC3'; y Partidor reverse **hALDHrev** 5'CAGGTTGGCCACATAGACGGC3'.

El uso de estos partidores permite la amplificación de un fragmento de 200 pb. Se realizó una curva estándar usando diluciones seriadas de un plasmidio que contiene la secuencia antisentido anti-Aldh2. Todas las muestras fueron analizadas en duplicado.

2.3.7 Análisis de la pureza de los vectores adenovirales purificados mediante SDS-PAGE

Se preparó un gel de poliacrilamida al 12,5% de dodecil sulfato de sodio SDS para separar proteínas. Se cargaron en el gel 15 μ l de las muestras previamente preparadas según protocolo estándar [46]. El gel fue teñido con una solución de azul de Coomassie por 1 hora y desteñido por varios lavados con solución de destinción. Finalmente, el gel fue lavado con agua destilada y fotografiado. Se cargó en el mismo gel 5 μ l un marcador de peso molecular de proteína (Prestained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas).

2.4 Resultados

2.4.1 Producción de vectores adenovirales recombinantes serotipo 5 (rAdV5)

La producción de vectores adenovirales rAdV5 se realizó mediante la infección de células HEK293-F con un MOI de 10 desde un stock adenoviral de una producción realizada con anterioridad. Un cultivo de HEK293-F sin infectar se definió como control negativo para observar y comparar. El proceso de producción de los vectores virales rAdV5 fue observado mediante cambios fenotípicos de las células HEK293-F, y cambios de color del medio desde rojo a naranja o amarillo. Después de 24 horas, las células infectadas muestran un efecto citopático característico, no observado en el control negativo, que indica la presencia de adenovirus. Además, algunas células adoptan una forma redondeada y se despegan de la placa, flotando en el medio. Generalmente, dos días después de la infección fue el tiempo óptimo para preparar los stocks virales rAdV5 desde un cultivo con un efecto citopático substancial.

Para asegurar la integridad del virus producido, se realizó un análisis estructural mediante visualización con TEM del vector adenoviral rAdV5, contenido en el sobrenadante del lisado crudo sin purificar y purificado (Figura 2).

El análisis TEM del sobrenadante del lisado crudo reveló que los virus producidos estaban intactos, se visualizaron partículas de adenovirus características, presentando una estructura icosaédrica y un diámetro entre 85 nm y 100 nm. También se observaron pequeños agregados de virus, aproximadamente un 90% de las partículas virales se presentaron como partículas individuales, como se puede ver en la Figura 2A. También se pudo observar la presencia de debris celular y contenido proteico.

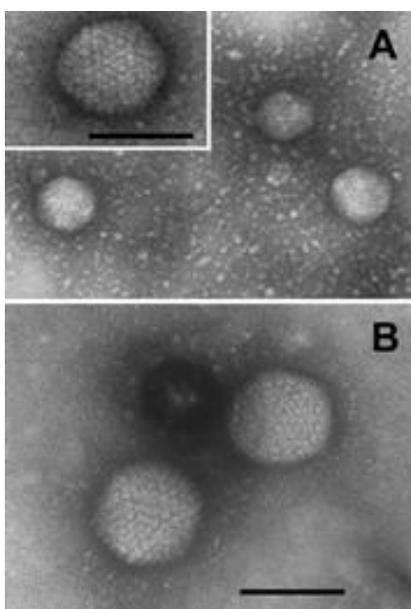


Figura 2: Análisis Estructural de rAdV5 mediante TEM. Se muestra una barra negra de 100 nm como referencia. A) Partículas virales no purificadas. B) Partículas virales purificadas usando la columna monolítica CIM QA-1 a 1 ml/min de flujo, volumen de muestra de 10 ml.

2.4.2 Comparación de los perfiles de elución de la purificación del vector adenoviral rAdV5 con cromatografía de gradiente lineal

Las tres columnas de intercambio aniónico fueron evaluadas para la purificación de rAdV5, usando como muestra el mismo stock de vector adenoviral rAdV5 para los casos de comparación. Se compararon dos diferentes métodos de purificación: gradiente lineal y gradiente de dos pasos.

En primer lugar, se realizó el método de gradiente lineal. Para este propósito, el sobrenadante del lisado celular fue inicialmente purificado con una elución de gradiente lineal usando las columnas Q-Sepharose XL, CIM QA-1 y CIM DEAE-1. Se cargaron muestras de 1 ml y se aplicó un flujo de 1 ml/min durante todo el método.

Los perfiles de elución de la purificación con cromatografía de gradiente lineal se muestran en la **Figura 3**. Los vectores adenovirales se unieron de manera inmediata a las columnas Q-Sepharose XL, CIM QA-1 y CIM DEAE-1 a pH 7,5 y su elución fue realizada a concentraciones de sal entre 0,56-0,58 M, 0,47-0,51 M y 0,52-0,59 M de NaCl para cada columna respectivamente.

Los componentes de la muestra eluyeron como múltiples peaks, como ya ha sido reportado [41], donde la razón entre absorbancias 260/280 nm indica contenido proteico y contenido de ácidos nucleicos del sobrenadante del lisado celular. El peak del flow-through (FT) tiene una razón de A₂₆₀/A₂₈₀ mayor a 1, lo que indica presencia de adenovirus y ácidos nucleicos. Esto indica que una pequeña fracción de la producción de vector adenoviral AdV5 no se unió a las columnas. Los vectores adenovirales AdV5 fueron eluidos principalmente en el último peak, como se indica en la **Figura 3**.

En la **Figura 3** se puede observar, que se obtuvo una pobre resolución del peak usando ambas columnas monolíticas en comparación con la obtenida con la columna Q-Sepharose XL para cuantificar partículas virales (vp) mediante la integración del peak obtenidos del software del equipo AKTA (Ver Anexo I) y el método de absorbancia UV260 nm ($2,2 \times 10^9$ vp fueron purificados usando Q-Sepharose XL).

Al comparar entre ambas columnas monolíticas, existe un incremento notable en la separación de la fracción de interés y el resto de los componentes usando la columna monolítica de intercambio aniónico fuerte CIM QA-1. La carga positiva de la columna monolítica CIM DEAE-1 no fue suficiente para lograr una unión óptima de los vectores adenovirales AdV5, los que se encuentran cargados negativamente a pH 7,5, debido a que es una columna de intercambio aniónico débil. En general, para purificación de adenovirus se ha logrado mejor resolución con columnas de intercambio aniónico fuertes [22,23,30].

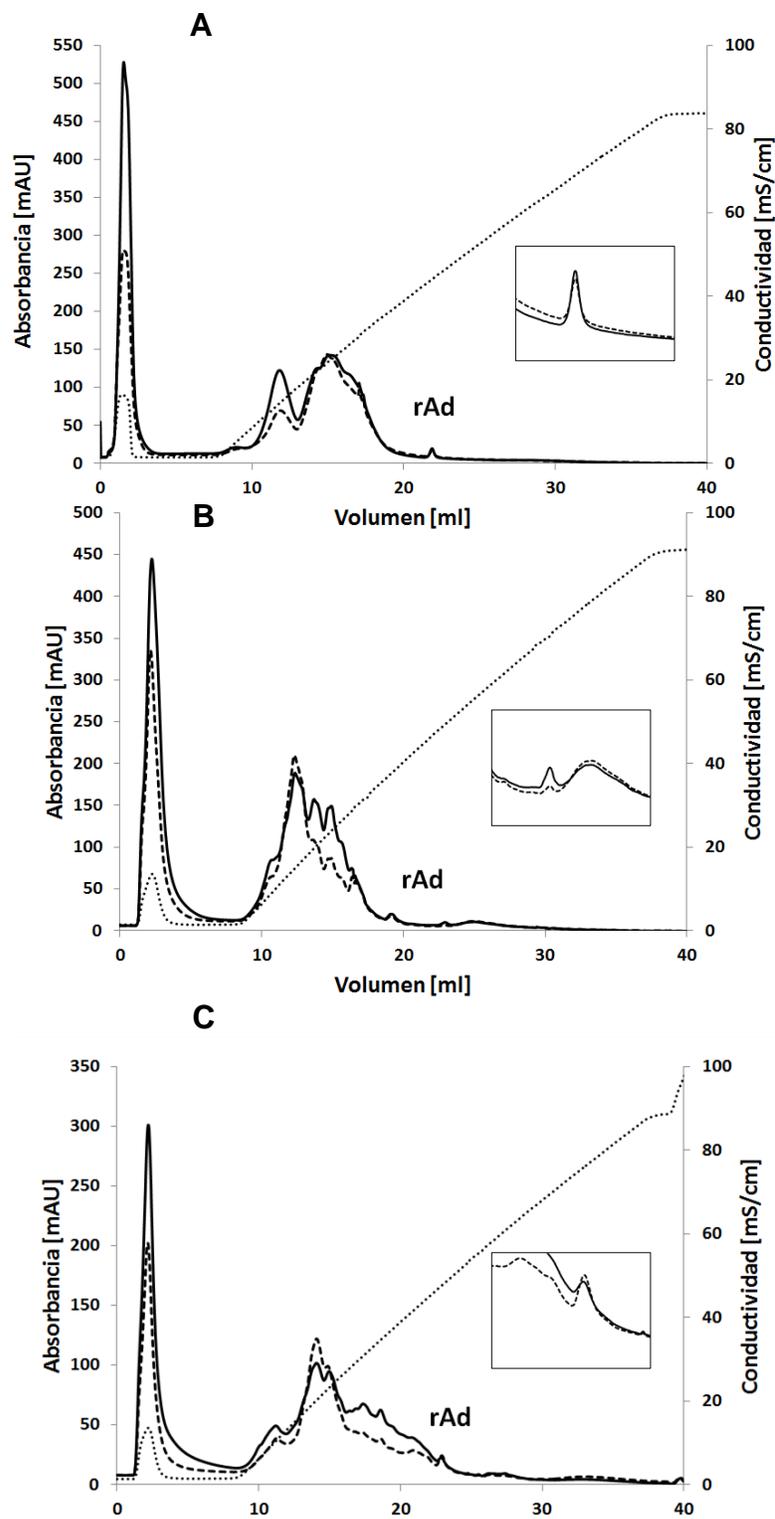


Figura 3: Perfiles de Elución con gradiente de sal en cromatografías de intercambio aniónico del sobrenadante del lisado celular conteniendo rAdV5. A) Usando la columna Q-Sepharose XL, B) usando la columna monolítica CIM QA-1, y C) usando la columna monolítica CIM DEAE-1. Flujo de 1 ml/min y volumen de muestra de 1 ml. En cada figura se señala el peak que contiene rAdV5. La línea continua muestra la absorbancia a 260 nm, la línea segmentada muestra la absorbancia a 280 nm y la línea punteada muestra la conductividad de la fase móvil.

2.4.3 Comparación de los perfiles de elución de la purificación del vector adenoviral rAdV5 con cromatografía de gradiente de dos pasos

La cromatografía de elución por gradiente lineal logró una separación limitada con las columnas monolíticas, es por esto que se usó el método de elución de gradiente de dos pasos para mejorar la resolución del peak de rAdV5, método adaptado de protocolo descrito en literatura [41].

La purificación con el método de elución de gradiente de dos pasos se realizó para las tres columnas. Los adenovirus rAdV5 se unieron a las columnas a pH 7,5 y fueron eluidas en los mismos rangos de conductividad que con el método de elución de gradiente lineal. Como se muestra en la **Figura 4**, la purificación de los vectores virales rAdV5 se logró con todas las columnas. Se observaron tres peaks distintivos en la purificación con la columna Q-Sepharose XL, el último peak es el que contiene el vector adenoviral rAdV5, obteniendo un total de $1,9 \times 10^{10}$ partículas virales. En el perfil cromatográfico de la columna monolítica CIM QA-1 se puede ver que los adenovirus fueron separados de otros contaminantes, obteniendo una mejor resolución que con el método de elución con gradiente lineal. En este caso, se obtuvieron un total de $2,5 \times 10^{10}$ partículas virales, mayor cantidad de partículas virales que las obtenidas con la columna Q-Sepharose XL. En el caso de la columna monolítica CIM DEAE-1, el peak conteniendo rAdV5 aún contenía contaminantes, ya que no se observa un peak definido en el perfil cromatográfico.

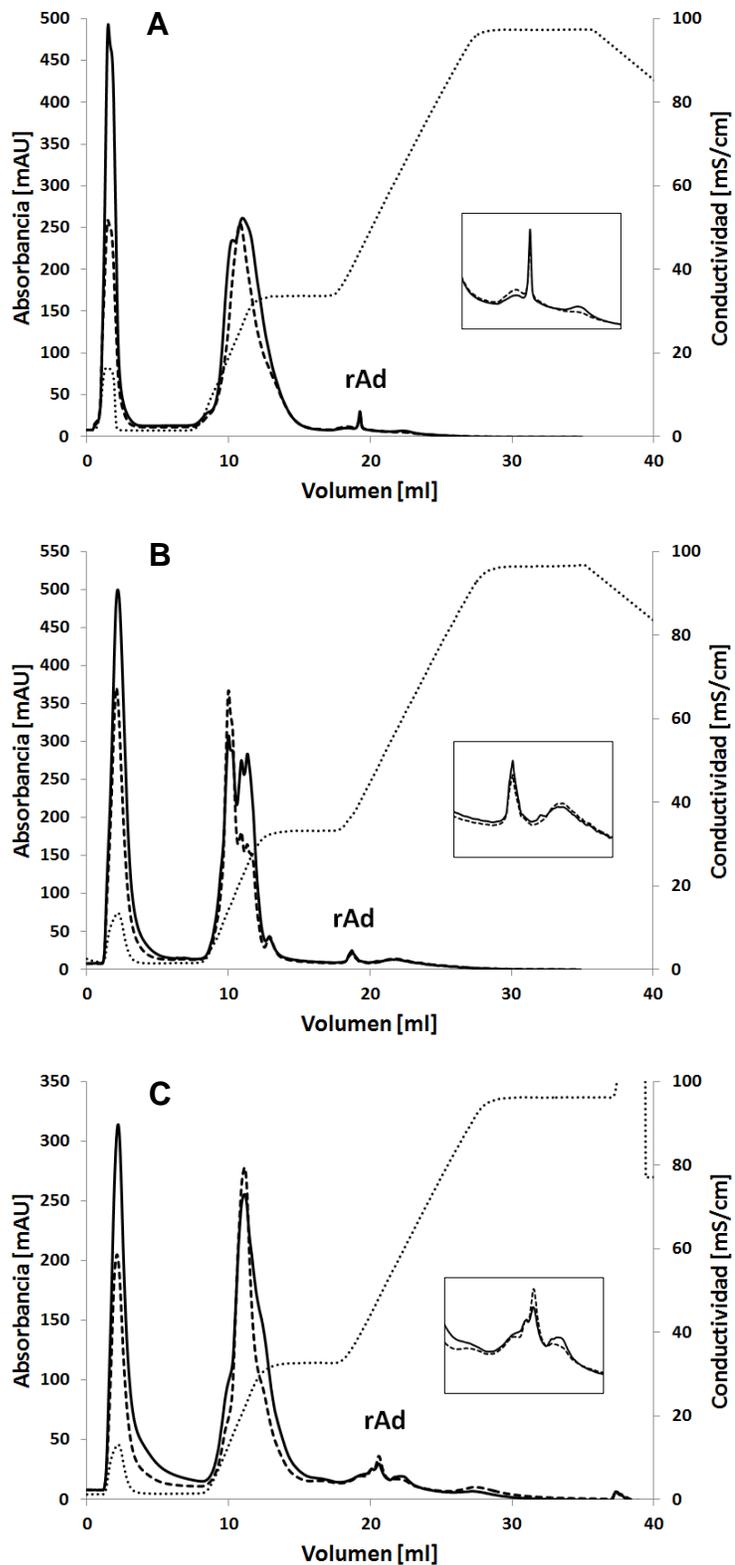


Figura 4: Perfiles de elución con gradiente de dos pasos de cromatografías de intercambio aniónico del sobrenadante del lisado celular conteniendo rAdV5. A) Usando la columna Q-Sepharose XL, B) usando la columna monolítica CIM QA-1, y C) usando la columna monolítica CIM DEAE-1. Flujo de 1ml/min y volumen de muestra de 1 ml. En cada figura se señala el peak que contiene rAdV5. La línea continua muestra la absorbancia a 260 nm, la línea segmentada muestra la absorbancia a 280 nm y la línea punteada muestra la conductividad de la fase móvil.

2.4.4 Purificación de rAdV5 usando elución de gradiente de dos pasos a diferentes flujos

Las columnas monolíticas pueden operar a altas presiones y flujos [41,42], por lo tanto se realizó la purificación del adenovirus rAdV con la columna monolítica CIM QA-1 a tres diferentes flujos para comparar los perfiles de elución. El volumen de la muestra fue de 1 ml, se utilizó el método de elución de gradiente de dos pasos con flujos de 1 ml/min, 5 ml/min y 10 ml/min (flujo máximo recomendado por el fabricante).

La **Figura 5A, 5B y 5C** muestran los perfiles de elución a los respectivos flujos. Para los tres flujos probados, la separación de partículas virales intactas fue lograda con perfiles de elución similares. Sin embargo, se pudo observar que los adenovirus eluyeron en un rango de conductividad mayor a flujos más altos. En cada caso los perfiles cromatográficos mostraron 2 peak de elución de adenovirus juntos, y pudo verse que a mayor flujo estos dos peaks se van acercando. El peak que eluyó a los 18,6 min (Figura 4A) tuvo una mejor resolución a 1ml/min que con los demás flujos probados. El segundo peak de virus presenta una concentración de virus más baja que el primer peak de virus.

A pesar de esto, los resultados obtenidos con todos los flujos probados son adecuados, ya que se separa la mayor cantidad de contaminantes, y para flujos mayores se reduce el tiempo de la cromatografía.

Además, el número de partículas virales fue 80% y 48% mayor a 5 ml/min y 10 ml/min respectivamente con respecto a la elución a 1 ml/min. El flujo máximo recomendado por el fabricante de la columna es 10 ml/min, lo que podría explicar que disminuya la recuperación con respecto a la elución a 5 ml/min.

Sin embargo, para cualquiera de los 3 flujos probados, es necesario realizar un segundo paso de purificación para lograr un nivel deseado de pureza para propósitos terapéuticos. Este podría ser realizado por cromatografía de exclusión por tamaño según se ha reportado previamente [38].

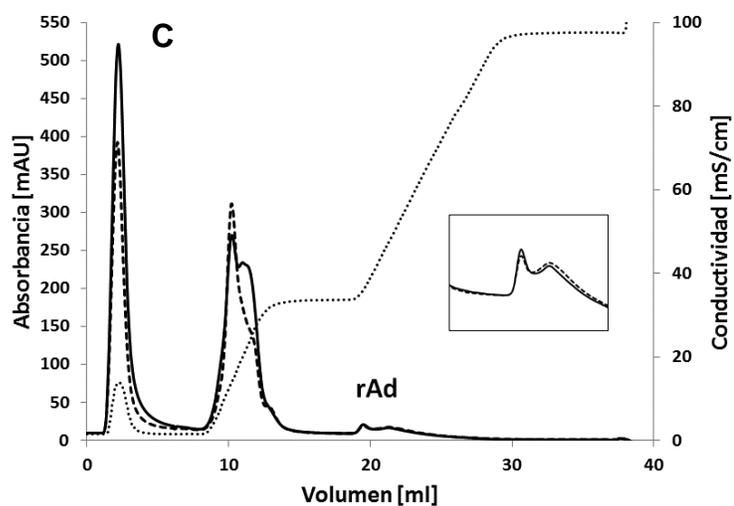
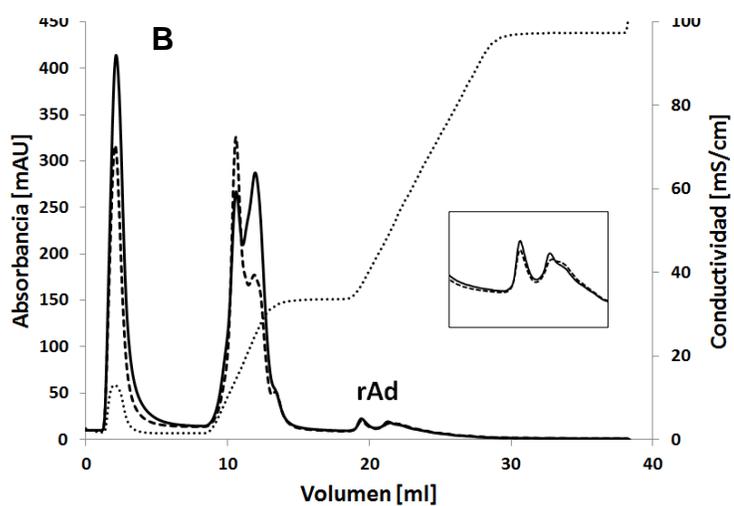
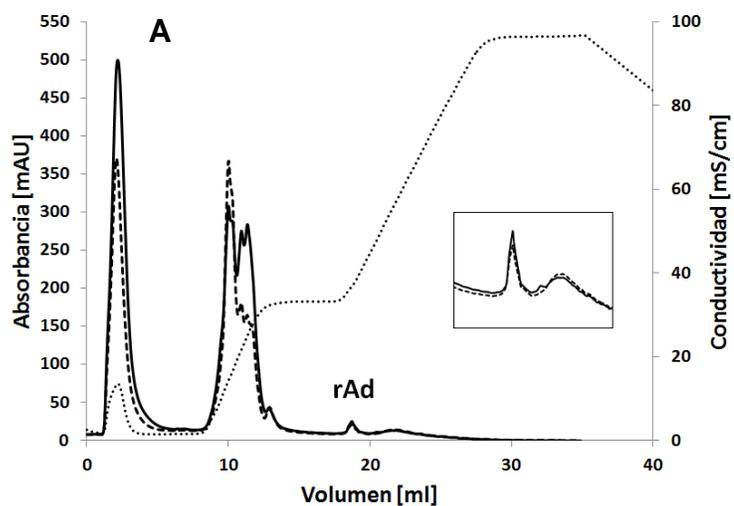


Figura 5: Perfiles de Elución con gradiente de dos pasos de cromatografías de intercambio aniónico y diferentes flujos usando la columna monolítica CIM QA-1. A) A un flujo de 1 ml/min, B) a un flujo de 5 ml/min, y C) a un flujo de 10 ml/min. En cada figura se señala el peak que contiene rAdV5. La línea continua muestra la absorbancia a 260 nm, la línea segmentada muestra la absorbancia a 280 nm y la línea punteada muestra la conductividad de la fase móvil.

2.4.5 Purificación de rAdV5 usando gradiente de dos pasos con diferentes volúmenes de muestra

Todos los análisis anteriores fueron realizados con un volumen de muestra de 1 ml, para comparar las diferentes columnas con diferentes condiciones de elución y flujos. Sin embargo, para una producción de virus a gran escala, es necesario encontrar el volumen de muestra máximo que puede ser cargado a la columna sin reducir su resolución y manteniendo su desempeño.

Por otro lado, las columnas monolíticas tienen una capacidad dinámica de unión más alta que las columnas tradicionales [41,42]. Por lo tanto, se hizo una comparación de la purificación para un volumen de muestra de 10 ml usando la columna Q-Sepharose XL y la columna monolítica CIM QA-1, con un método de elución de gradiente de dos pasos.

La muestra eluyó como múltiples peaks en ambos casos, como se muestra en las **Figuras 6A y 6B**. En un volumen de elución de 28 ml eluyeron los vectores rAdV5 usando la columna Q-Sepharose XL. En el caso de la columna monolítica CIM QA-1, los vectores rAdV5 eluyeron entre los volúmenes 27 ml y 29 ml.

Se logró una mayor recuperación usando la columna monolítica CIM QA-1 ($3,3 \times 10^{11}$ vp) comparada con la recuperación obtenida con la columna Q-Sepharose XL ($2,6 \times 10^{11}$ vp). La menor capacidad dinámica de unión de la columna Q-Sepharose XL puede ser una posible razón para esta diferencia [47].

Como se muestra en las **Figuras 4A y 6A**, el perfil de elución usando la columna Q-Sepharose XL fue similar para los volúmenes de muestra de 1 ml y 10 ml. Sin embargo, al incrementar el volumen de la muestra, se obtuvo un mayor porcentaje de recuperación. El mismo comportamiento fue observado usando la columna monolítica CIM QA-1 (**Figuras 4B y 6B**). Se obtuvo un aumento de 35% y 28% en el porcentaje de recuperación de cada columna respectivamente, cuando la muestra aumentó en 10 veces su volumen.

Los vectores **rAdV5** eluidos fueron analizados mediante SDS-PAGE. Este análisis entregó niveles de pureza de 66% y 70% de los virus purificados con las columnas Q-Sepharose XL y CIM QA-1 respectivamente (**Figura 6C**). Los vectores rAdV5 eluyeron en las fracciones indicadas en la figura como 4, 5 y 6 para la columna monolítica CIM QA-1. En los carriles 4, 5, 6, y 9 de la **Figura 6C**, se observan bandas que corresponden a proteínas características de adenovirus serotipo 5, donde se distingue la proteína hexón de 108 kDa.

Además, se realizó una cuantificación de la recuperación de las fracciones conteniendo los vectores virales mediante RT-PCR. Con lo que se pudo determinar que la recuperación se mejora de 28% al usar la columna Q-Sepharose XL a 34% al usar la columna monolítica CIM QA-1, medido como unidades de genoma de vector viral (vg). Como fue mencionado anteriormente, se pudo observar mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) que para las diferentes columnas cromatográficas y flujos, los vectores virales purificados resultaron estructuralmente intactos después de la purificación (**Figura 2B**).

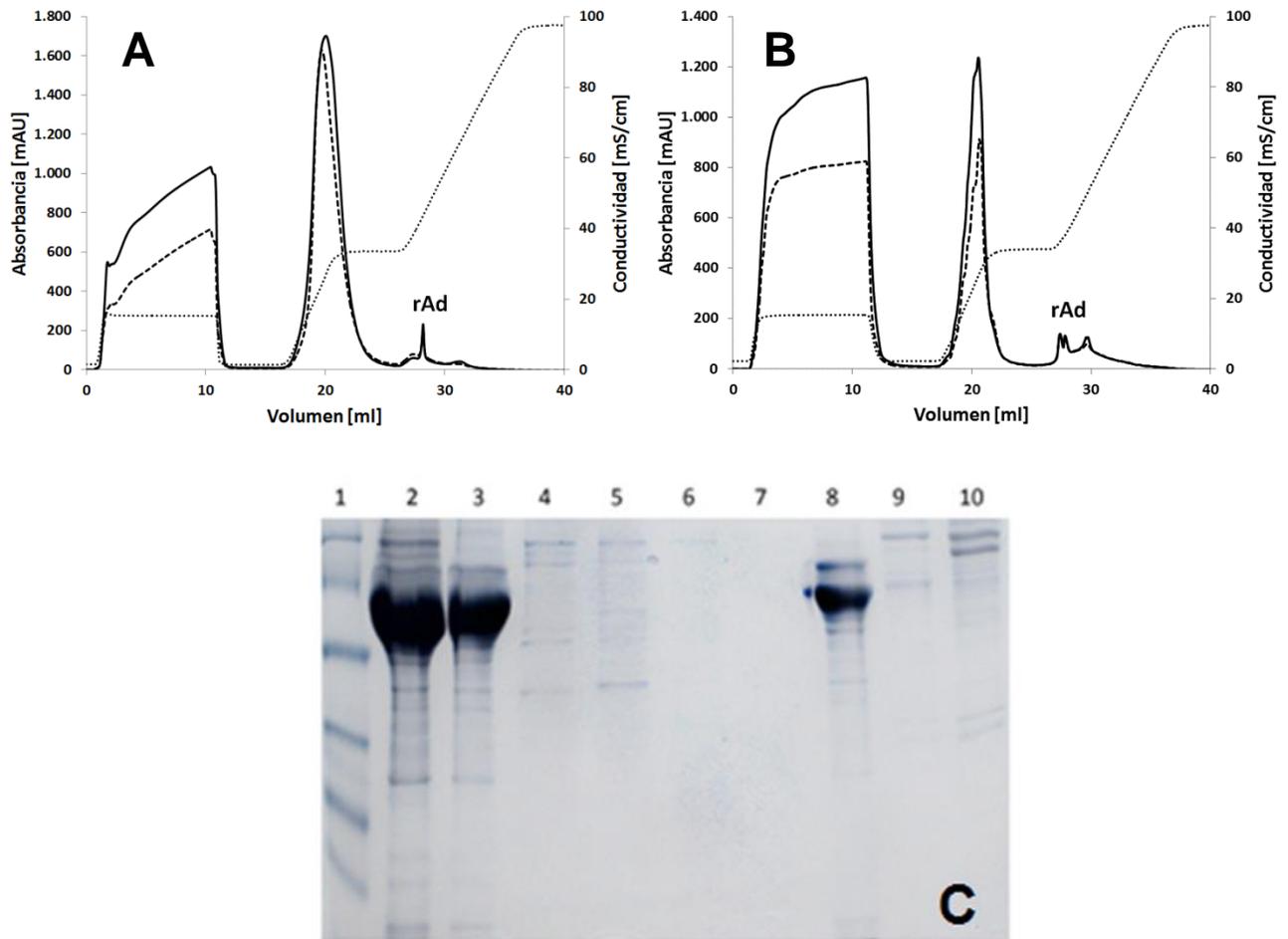


Figura 6: Análisis de la purificación de rAdV5 desde el lisado celular usando gradiente de dos pasos con un volumen mayor de muestra. A) Perfil de elución usando columna Q-Sepharose XL; B) Perfil de elución usando columna monolítica CIM QA-1. Flujo de 1 ml/min y volumen de muestra igual a 10 ml. La línea continua corresponde a la absorbancia a UV260 nm, la línea segmentada corresponde a la absorbancia a UV280 nm y la línea punteada corresponde a la conductividad de la fase móvil. C) Gel con tinción Comassie de SDS-PAGE. Carril 1: Ladder, Carril 2: sobrenadante del lisado celular, Carril 3: Flow-through de CIM QA-1, Carril 4 a 7: Fracciones de elución a 27, 28, 29 y 30 ml de CIM QA-1. Carril 8: Flow-through de Q-Sepharose XL. Carril 9 to 10: Fracciones de elución a 28 y 29 ml de Q-Sepharose XL.

2.5 Discusión y Conclusiones

En este estudio se desarrolló un método de cromatografía de intercambio aniónico para la purificación de vectores adenovirales serotipo 5 (rAdV5) para terapia génica contra el alcoholismo.

Aunque han sido reportados trabajos con membranas y columnas monolíticas para la purificación de vectores adenovirales, desarrollar una estrategia de purificación es crucial para optimizar el rendimiento y calidad de vectores adenovirales para su uso en protocolos clínicos [11,38]. De esta manera, es posible seleccionar las técnicas más apropiadas para la purificación del vector adenoviral (rAdV5) que transporta el gen antisentido de la enzima humana aldehído deshidrogenasa ALDH2.

Se realizaron diferentes experimentos usando distintos soportes cromatográficos. Se evaluaron tres columnas de intercambio aniónico para la purificación de los vectores rAdV5: la columna Q-Sepharose XL, las columnas monolíticas CIM QA-1 y CIM DEAE-1. Estas columnas tienen diferentes ligandos y matrices, fueron evaluadas bajo las mismas condiciones de elución con gradiente lineal y gradiente de dos pasos. Para que los métodos fueran comparables, se usó el mismo batch de producción como muestra para todas las corridas. Como ya se había reportado [41], se observó que para las tres columnas se mejora la separación de los vectores rAdV5 cuando se aplica el método de elución de gradiente de dos pasos, siendo además un proceso reproducible. Estos factores son cruciales para lograr altos rendimientos en la recuperación de vectores rAdV5 para aplicaciones en ensayos preclínicos y clínicos [9,48].

Los resultados muestran que la separación de los vectores rAdV5 fue mejor usando ambas columnas de intercambio aniónico fuerte con el método de elución con gradiente de dos pasos. Esto se debe a sus grupos funcionales, ya que cuando se comparan los resultados de la separación con la columna Q-Sepharose XL con los resultados de la separación usando la columna CIM QA-1, no es claro cómo el tamaño del adenovirus (90-100 nm) afecta la capacidad dinámica de las columnas. Ha sido reportado que la columna Q-Sepharose XL ofrece ventajas para la separación de adenovirus en comparación con otras columnas empacadas como la columna Source 15Q, la cual ha sido muy usada para purificar adenovirus [40]. Sin embargo, la baja capacidad dinámica ha sido asociada a la distribución de tamaño de poro [47]. Por otro lado, los canales de la columna monolítica son de gran tamaño (1,3 μm), incrementando la capacidad dinámica potencial de macromoléculas, tales como adenovirus. La capacidad dinámica de unión de la columna Q-Sepharose XL y de la columna monolítica CIM QA-1 para vector adenoviral rAd5 está reportado [49,50]. En este estudio, todos los experimentos fueron realizados dentro de los rangos de la capacidad dinámica de unión de cada columna cromatográfica.

Para los dos volúmenes de muestra ensayados, ambas columnas, columna Q-Sepharose XL y columna CIM QA-1, fueron capaces de separar los vectores rAdV5 de los contaminantes, logrando una buena pureza. Al incrementar el volumen de la muestra, los rendimientos para ambas columnas aumentaron. Por lo tanto, el volumen de la muestra es un parámetro importante para tomar en cuenta en el escalamiento del proceso. Además, se obtuvieron mejores rendimientos con la columna monolítica CIM QA-1 comparado con los obtenidos con la columna Q-Sepharose XL. Esto se puede

deber a que las columnas monolíticas tienen valores más altos valores de capacidad dinámica de unión (DBC) comparado con las columnas tradicionales [42,51].

Las columnas monolíticas logran más rápida separación, concentración y purificación, objetivos principales para el escalamiento de la producción de vectores virales. Con este método de producción se obtuvieron partículas virales estructuralmente intactas usando las distintas columnas y velocidades de flujo.

Cabe mencionar, que estos resultados obtenidos en el laboratorio fueron usados como base para la producción GLP de adenovirus, realizada en el National Research Council, Canadá, para ser usados en pruebas pre-clínicas. Este proceso consistió en la purificación mediante la columna de intercambio aniónico Q-Sepharose HP (480 ml) con una capacidad dinámica de unión de $1,04 \times 10^{12}$ vp/ml, y luego una cromatografía de exclusión por tamaño, columna Sephacryl S-400 HR. La producción de rAdV5 fue conducida en un bioreactor de 60L con un volumen de cultivo de 45L. En el cultivo se obtuvo una concentración de virus de $2,4 \times 10^{10}$ vp/ml. El vector rAdV5 purificado fue colectado en un volumen de 166 ml con una concentración de 2.4×10^{12} vp/ml, y medidas como unidades infecciosas igual a 1.8×10^{11} IU/ml. La recuperación de partículas virales del proceso fue de 37%. La razón entre VP:IU fue 13:1; este valor se encuentra dentro de rangos bien aceptados por la FDA como indicador de la potencia del producto [50].

Se están realizando pruebas pre-clínica en forma exitosa en SA-FORD, Sanctuary for Research and Development in Mumbai, India.

En conclusión, los resultados presentados en este trabajo demuestran que el uso de la columna monolítica CIM QA-1 es una mejor alternativa que la columna Q-Sepharose XL, y que la columna monolítica CIM DEAE-1 para ser usada en la purificación de vectores rAdV5 llevando el gen antisentido humano de la enzima aldehído deshidrogenasa Aldh2.

3 PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE VECTORES ADENOASOCIADOS AVV Y scAAV SEROTIPOS 2 Y 8 PARA TERAPIA GÉNICA CONTRA EL ALCOHOLISMO

3.1 Resumen

La tecnología de ARN antisentido de la enzima ALDH2 fue validada, tanto *in vitro* como *in vivo*, usando vectores adenovirales. Se planteó la alternativa de cambiar el vehículo de transferencia génica por vectores virales adenoasociados (AAV), considerando sus múltiples ventajas, que se acomodan a su uso en terapia génica contra el alcoholismo. Los vectores adenoasociados AAV transducen a células que se encuentran en división y células quiescentes, tienen una expresión génica prolongada, no son patogénicos, además son estables a mayores temperaturas que los adenovirus, resisten detergentes no iónicos y enzimas proteolíticas.

Sin embargo, en el contexto de producción de vectores virales para pruebas pre-clínicas y clínicas para uso en humanos, se requieren diseñar métodos de producción y purificación que sean escalables, reproducibles y que cumplan con los estándares de calidad requeridos.

El presente estudio se enfoca en producir y purificar vectores adenoasociados AAV y scAAV de serotipos 2 y 8 para terapia génica contra el alcoholismo.

Los vectores adenoasociados fueron producidos por el método de triple transfección libre de virus ayudante, uno de los métodos más seguros tanto en su producción como para el paciente. Se utilizó la línea celular HEK293-F creciendo en adherencia en DMEM/F12 con 5% SFB. Los vectores virales fueron purificados mediante cromatografía de intercambio aniónico, utilizando la columna monolítica CIM QA-1. Las fracciones eluidas fueron cuantificadas por RT-PCR, analizadas con SDS-Page y visualizadas con TEM. También se analizó su infectividad en células hepáticas HepG2 utilizadas como modelo de hígado.

En el proceso de producción de AAV, se obtuvieron $3,2 \times 10^9$ vg/ml; $7,8 \times 10^7$ vg/ml y $5,5 \times 10^7$ vg/ml para AAV2_antiAldh2, scAAV2_antiAldh2 y scAAV2_GFP respectivamente; y $1,9 \times 10^{11}$ vg/ml; $4,2 \times 10^{10}$ vg/ml y $1,7 \times 10^{10}$ vg/ml para AAV8_antiAldh2, scAAV8_antiAldh2 y scAAV8_GFP respectivamente.

Se logró realizar la purificación de los vectores producidos, verificar su morfología e infectividad.

Se pudo determinar que la capacidad de la columna monolítica CIM QA-1 es distinta para los vectores AAV2 y AAV8. Siendo $5,2 \times 10^8$ vg/ml la capacidad de la columna para AAV2 y $1,8 \times 10^{10}$ vg/ml para AAV8.

3.2 Introducción

El uso de los vectores virales adenoasociados (AAV) ha ido en aumento en los últimos años para aplicaciones en terapia génica. Se han aislado más de 100 serotipos desde distintas especies. Esta variedad de serotipos es muy ventajosa para aplicaciones en terapia génica en humanos, debido a la diversidad de tropismo de estos serotipos. Los virus adeno-asociados son muy resistentes a condiciones extremas de pH, detergente y temperatura, lo que los hacen de fácil manipulación [52].

El AAV serotipo 2 (AAV2) es el mejor caracterizado y más usado en estudios de transferencia génica [53]. AAV2 es uno de los cinco serotipos más conocidos. Los serotipos 1, 2 y 3 comparten el 85% de identidad de la secuencia de aminoácidos de la cápside, serotipo 4 y 5 tienen un 55% de identidad comparado con AAV2.

Los virus AAV son muy seguros para el paciente, no se ha detectado que causen alguna enfermedad en humanos, ni en simios. Provocan una baja respuesta inmune e inflamatoria. Sin embargo, su uso en aplicaciones clínicas puede verse limitado, debido al desarrollo de anticuerpos neutralizantes, puede ser necesario el uso de inmunosupresores [11].

El virus adenoasociado AAV entra a la célula a través de endosomas, y es transportado al núcleo por proteínas motoras. El receptor primario es un proteoglicano sulfato heparina [54]. Una vez que ha entrado el virus adenoasociado AAV a la célula, es transportado al núcleo, ahí su genoma de hebra simple es convertido en una molécula de doble hebra, la cual se puede replicar con la maquinaria de la célula huésped en presencia de virus ayudante. En ausencia de un virus ayudante, el genoma de AAV es integrado en el genoma de la célula huésped y persiste en forma latente.

Para la construcción del vector AAV para terapia génica sólo se requiere que las secuencias terminales repetidas invertidas (ITR) se entreguen en forma *cis*. Los dos marcos de lectura (ORF) pueden ser removidos desde el genoma y ser entregados en forma *trans*, esto permite colocar un inserto o gen de interés para la terapia génica de largo equivalente al genoma de AAV [55].

El genoma de AAV consiste en dos grandes marcos de lectura (ORF) limitados por secuencias terminales repetidas invertidas (ITR), que son necesarias para un empacamiento apropiado y sirven como origen de replicación entre otras funciones. El marco de lectura ORF izquierdo codifica para cuatro proteínas de replicación responsables de la integración sitio dirigida, responsables de cortar y de la actividad helicasa (proteínas Rep), además de la regulación de promotores en el genoma de AAV. El marco de lectura ORF derecho codifica para las proteínas estructurales (proteínas Cap), llamadas VP1, VP2 y VP3, las cuales ensambla el virión en forma icosaédrica compuesta de 60 subunidades [56].

Las proteínas Rep de mayor tamaño (Rep78 y Rep68) se encargan de las funciones de escisión del genoma viral, el rescate, la replicación y la integración, y también regulan la expresión de genes de AAV y promotores heterólogos. Las proteínas de menor tamaño

(Rep52 y Rep40) se encargan de tomar el ADN de hebra simple replicado y empacarlo [53].

A pesar de tener una capacidad para transportar insertos pequeños, el vector viral AAV es un buen candidato para terapias génicas. La ausencia de reacción inmunológica significativa por el huésped, los niveles de expresión persistente del transgen después de la administración, y la habilidad de entregar genes en una variedad de tejidos, hace muy interesante el uso de estos vectores para terapia génica [57].

Se han utilizado con éxito en modelos animales en una variedad de tejidos sin aparente toxicidad, por lo que se está comenzando a utilizar en fase de pruebas clínicas en humanos para el tratamiento de enfermedades genéticas, como por ejemplo hemofilia, distrofia muscular, amaurosis congénita de Leber y deficiencia de alfa-1 antitripsina [58].

El uso de este tipo de vector viral, puede ser una buena alternativa para una terapia génica contra el alcoholismo en base a la tecnología de ARN antisentido [4]. El tamaño de la secuencia antisentido del ARN mensajero de la enzima ALDH2 es de 1600 pb aproximadamente, menor al tamaño máximo que pueden encapsidar los vectores AAV, hasta 3000 pb de gen de interés. Existen serotipos de AAV con tropismo al hígado, como el vector AAV serotipo 8 [58], órgano donde se quiere aplicar en forma específica la inhibición de la expresión de la enzima ALDH2. Además, su ventaja en bioseguridad en la producción y para el paciente lo hace una atractiva alternativa de vector de transferencia génica para el tratamiento contra el alcoholismo.

Actualmente existen varias estrategias de producción de vectores AAV, la más usada se basa en el método de transfección transitoria libre de virus ayudante, que consiste en un sistema de tres plasmidios que se transfectan al mismo tiempo en las células HEK293. Un plasmidio contiene los genes de empaquetamiento del AAV (Rep y Cap), otro plasmidio contiene el gen de interés flanqueado con los ITR; y el tercer plasmidio contiene los genes ayudantes aislados desde adenovirus (Ad) HEK293 [55,58].

Una segunda estrategia de producción de AAV se basa en el uso de herpes simplex virus recombinante (rHSV) en una triple infección de células BHK [60, 61]. La tercera estrategia se basa en un sistema de baculovirus, el que requiere de la infección simultánea con tres baculovirus en células de insecto, llevando los diferentes genes que requiere la formación del vector AAV [62, 63]. Una cuarta estrategia se basa en una línea celular productora de AAV derivada de las líneas celulares HeLa o A549, la cual consiste en mantener en forma estable los genes de empaquetamiento de AAV (Rep/Cap) en el genoma de la célula productora [64]. Aunque este método es más fácil de escalar y produce altas titulaciones de vector AAV comparado con el método de triple transfección transitoria. Este método requiere un adenovirus nativo (o "wild-type"), lo que conlleva un potencial riesgo de contaminación con adenovirus en el producto final.

Hay una gran variedad de serotipos de virus AAV, cercano a 100, pero no todos han podido ser aislados (Serotipos 1 al 9). Por lo tanto, se han buscado métodos escalables para poder purificar esta diversidad de serotipos. Inicialmente todos son purificados con gradiente de cloruro de cesio y algunos con iodoxanol [65, 66]. Sin embargo, estos métodos no son fácilmente de escalar, por lo que el uso de cromatografía de

intercambio aniónico para la purificación de vectores AAV ha sido desarrollada para algunos de los serotipos 1, 2, 4, 5, and 8. [67-72]. También, se está incursionando en cromatografía de afinidad con ligando anti-AAV, se han hecho pruebas para purificar AAV serotipos 1, 2, 3 y 5 [73].

También, se han desarrollado varias estrategias para separar cápsidas vacías de vectores virales AAV completos, para facilitar la formulación y determinación de dosis a aplicar al paciente [74, 75].

Además, se han definido diferentes procesos para producción nivel GMP de vectores AAV para ensayos clínicos, logrando grandes avances en las limitaciones de su producción. Sin embargo, aún hay que enfocar los desarrollos en definir procesos de producción y purificación robustos y estandarizados para lograr su comercialización [76].

El objetivo de este trabajo fue definir una estrategia de producción y purificación de vectores AAV serotipos 2 y 8, que contengan la secuencia antisentido de mRNA de la enzima ALDH2, para poder ser utilizado para próximas pruebas en laboratorio, para validar su uso para terapia génica contra el alcoholismo.

3.3 Materiales y Métodos

3.3.1 Líneas Celulares y condiciones de cultivo

Las líneas celulares que se utilizaron en el trabajo fueron: la línea celular de crecimiento rápido HEK293F (Invitrogen) y la línea celular hepática HepG2 (ATCC). La línea celular de crecimiento rápido HEK-293-F se utilizó para producir los vectores adenoasociados AAV. La línea celular HepG2 se utilizó para analizar la infectividad de los vectores virales AAV producidos. Las dos líneas celulares fueron cultivadas en adherencia en placas T-75, utilizando como medio de cultivo DMEM/F12 (Invitrogen) con 10% de suero fetal bovino (SFB). Fueron mantenidas a 37°C, 85% de humedad con 5% de CO₂. Las líneas celulares fueron mantenidas en su etapa de crecimiento exponencial mediante su pasaje cada dos días, cuando lograban un 70-85% de confluencia.

Para determinar la viabilidad celular, se utilizó el equipo contador automático LUNA™ Automated Cell Counter (Logos Biosystem), el que utiliza 20 µl de una mezcla 1:1 demuestra y tripan blue, en cada una de las dos cámaras de la placa LUNA™ Cell Counting Slide.

3.3.2 Vectores plasmidiales para producción de vectores AAV

Los plasmidios utilizados para la producción de AAV y scAAV son los siguientes: **pAAV-aldh2**, **pscAAV-aldh2**, **pscAAV-GFP**, **pAAV-RC2**, **pAAVRC8** y **pHelper**.

El plasmidio **pAAV-antiAldh2** (6.231 pb), que contiene la secuencia antisentido del RNA mensajero de la enzima Aldh2 humana (antiAldh2) flanqueada por las secuencias ITR, fue elaborado por el Dr. Sergio Mercado A. en el año 2011, a partir del plasmidio pACCMVpLpARS-Aldh2 (10.392 pb) facilitado por el Dr. Yedy Israel del Laboratorio de Farmacoterapia Génica de la Universidad de Chile. Dicho plasmidio fue digerido con la enzima de restricción HindIII, y la secuencia antiAldh2 fue clonada en el plasmidio pAAV-MCS (4.650 pb, Stratagene) digerido con la misma enzima de restricción.

El plasmidio **pscAAV-antiAldh2** para producir self-complementary AAV, fue elaborado por la Dra.(c) Anamaría Sánchez D. en el año 2013, a partir del plasmidio **pAAV-antiAldh2** digerido con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI, para clonar la secuencia antiAldh2 en el plasmidio **pscAAV-GFP** (Addgene ©), al que se le retiró la secuencia de la proteína GFP mediante la digestión con las enzimas EcoRI y BspMI. El plasmidio **pscAAV-GFP** (5.370 pb) fue obtenido desde Addgene © y utilizado como control de transfección e infección.

Los plasmidios **pAAV-RC2** (7.321 pb, Stratagene), **pAAV-RC8** (7.320 pb, facilitado por el Dr. Yedy Israel del Laboratorio de Farmacoterapia de la Universidad de Chile), corresponden a los plasmidios que codifican para las proteínas Rep y Cap de los serotipos 2 y 8 de vectores AAV.

El plasmidio **pHelper** (11.600 bp, Stratagene) contiene los genes de adenovirus necesarios para la replicación de AVV (E2A, E4ORF6 y V4), a excepción de los genes

de Adenovirus EA1 y EB1, que se encuentran integrado en el genoma de las células HEK293.

Todos los plasmidios fueron amplificados mediante clonación y cultivados usando la cepa bacteriana *E.coli* Top10. Se cultivaron 500 ml en medio LB para realizar la preparación de cada plasmidio. La purificación de los plasmidios fue realizada utilizando el kit Qiagen maxiprep, logrando concentraciones de 500 ng/μl a 1.500 ng/μl.

3.3.3 Producción de vectores AAV

Se utilizó el método de triple transfección usando fosfato de calcio, el protocolo fue una adaptación del protocolo recomendado en el Manual del Sistema Libre de Virus Helper de Stratagene y el protocolo de Samulski, 2006 [55].

Se utilizaron placas de 100 mm para cultivar las células HEK293F por 48 horas. Tres horas antes de la triple transfección, se hizo un cambio de medio de cultivo a cada placa por medio fresco. Los plasmidios se ajustaron a una concentración cercana a 1 mg/ml. En un tubo de 15 ml se agregaron los tres plasmidios y se agregó 1 ml de CaCl₂ 0,3M, se mezclaron suavemente. Luego en otro tubo de 15 ml se agregó 1 ml de buffer 2xHBS. El contenido del primer tubo se agregó sobre el segundo tubo, mediante goteo con pipeta. Se mezcló e inmediatamente se aplicó sobre la placa de 100 mm por goteo con pipeta en forma homogénea y bien distribuida. Se dejaron las placas en la incubadora a 37°C por 24 horas, luego se cambió el medio por medio fresco. Se dejaron por 24 horas a 48 horas más, hasta visualizar un efecto citopático.

Pasado el tiempo de producción viral, se colectaron las células y el medio, y se aplicaron tres ciclos de congelar/descongelar para liberar los virus. Las células y debris se removieron por centrifugación y se recuperó el sobrenadante. A este sobrenadante se le agregó 200 unidades de Benzona y se dejó por una hora en agitación a 100 rpm [77, 78]. Luego, el sobrenadante fue alicuotado y almacenado a -80°C.

3.3.4 Purificación de los vectores AAV y scAAV usando cromatografía de intercambio aniónico

Los vectores virales fueron purificados usando la columna monolítica CIM QA-1 (1 ml, BioSeparation). Se utilizó el equipo FPLC AKTA (GE) para realizar las cromatografías. El buffer A fue de 50 mM Tris-HCl pH 8,5 y el buffer B fue de 50 mM Tris-HCl, 2M NaCl pH 8,5. Las purificaciones fueron realizadas a un flujo de 4 ml/min. Todas las muestras fueron filtradas en 0,45 μm. El volumen de las muestras fue de 6,5 ml. Se aplicó una elución con gradiente de tres pasos según el siguiente protocolo: 0M de NaCl por 20 CV, 0,1M de NaCl por 15 CV y 0,2M de NaCl por 15 CV, y finalmente 2M de NaCl por 10 CV (Adaptado desde un protocolo facilitado por BioSeparation para AAV). El Flow Through (FT) obtenido fue cargado a la columna repitiendo el mismo protocolo descrito.

3.3.5 Análisis mediante TEM de los vectores virales AAV producidos y purificados

La morfología e integridad de los vectores producidos y purificados fueron analizadas mediante TEM con tinción negativa de acetato de uranilo al 1%, y microfotografiado con una cámara digital.

3.3.6 Cuantificación mediante RT-PCR de la producción de AAV y fracciones eluídas de las cromatografías

El ADN de las muestras virales fueron extraídas y purificadas con el kit High Pure Viral Nucleic Acid (Roche). El protocolo y partidores para RT-PCR fueron los mismos que los descritos en la sección anterior. Se utilizó el equipo LightCycler Nano (Roche).

3.3.7 Análisis de pureza mediante SDS-PAGE

Se prepararon geles de SDS al 12,5% de poliacrilamida. Se agregaron 15 μ l de cada muestra preparada según protocolo estándar. En cada gel, se colocaron 5 μ l de un marcador de peso molecular (Prestained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas). Los geles luego fueron teñidos con Azul Coomassie como se describió en la sección anterior, y luego fueron teñidos con nitrato de plata.

3.3.8 Transducción de células HepG2 para análisis de infectividad de los vectores virales AAV purificados

Las células HepG2 fueron crecidas en placas de 100 mm y transducidas con los vectores adenoasociados purificados scAAV2_GFP y scAAV8_GFP. Se retiró el medio de cultivo de las placas, y se agregó 500 μ l de la fracción eluída de la purificación conteniendo el vector adenoasociado. Las placas fueron mantenidas a 37 °C, 5% CO₂ por 1 h. Luego se completó con el volumen de medio de cultivo correspondiente y se dejaron por 24 horas y se cambió el medio de cultivo de las placas, luego se dejaron hasta 48 horas para su posterior visualización con microscopio de fluorescencia.

3.4 Resultados y Discusión

3.4.1 Producción de rAAV2, scAAV2, rAAV8 y scAAV8

La producción de los vectores virales fue realizada utilizando 6 placas de cultivo (100 mm) con células HEK293F a 70% de confluencia en cada caso. Se realizó la producción mediante el método de triple transfección para cada uno de los 6 tipos de vector adenoasociado: **AAV2_antiAldh2**, **scAAV2_antiAldh2**, **scAAV2_GFP**, **AAV8_antiAldh2**, **scAAV8_antiAldh2** y **scAAV8_GFP**. Tres placas de cultivo se utilizaron para producir vectores virales y otras 3 placas de cultivo se utilizaron como controles negativos.

Cada placa tenía 10 ml de medio de cultivo, con aproximadamente 8×10^6 células por placa. La cuantificación de la producción de cada tipo de vector adenoasociado se midió con RT-PCR. Este método entrega el número de copias del genoma del vector viral (vg), por lo tanto cuenta los vectores virales con DNA en su interior, no incluye las cápsidas vacías. Los datos entregados por el equipo LightCycler Nano y los cálculos de la cuantificación se encuentran en el Anexo III.

El rendimiento de producción obtenido para **AAV2_antiAldh2**, **scAAV2_antiAldh2** y **scAAV2_GFP** fue de $3,2 \times 10^9$ vg/ml (**4.031 vg/célula**); $7,8 \times 10^7$ vg/ml (**98 vg/célula**) y $5,5 \times 10^7$ vg/ml (**68 vg/célula**) respectivamente.

El rendimiento de producción obtenido para **AAV8_antiAldh2**, **scAAV8_antiAldh2** y **scAAV8_GFP** fue de $1,9 \times 10^{11}$ vg/ml (**232.252 vg/célula**); $4,2 \times 10^{10}$ vg/ml (**52.785 vg/célula**) y $1,7 \times 10^{10}$ vg/ml (**20.796 vg/célula**) respectivamente.

3.4.2 Purificación de los vectores virales AAV2, scAAV2, AAV8 y scAAV8

- i) Análisis de la purificación de los vectores AAV2 y scAAV2 mediante cromatografía de intercambio aniónico usando columna monolítica CIM QA-1

En la **Figura 7** se presenta el perfil de elución de la cromatografía de intercambio aniónico para purificar los vectores virales AAV2_antiAldh2. En la **Figura 7A** se aprecian 3 peaks luego del Flow Through (FT). En el segundo y en el tercer peak eluyeron los vectores virales, que fueron identificados por RT-PCR. Se cargaron a la columna $3,2 \times 10^{10}$ vg, se pudo cuantificar que gran parte de los virus eluyeron en el Flow Through (FT), $2,6 \times 10^{10}$ vg; en el segundo peak eluyeron $2,8 \times 10^8$ vg y en el tercer y último peak eluyeron $2,4 \times 10^8$ vg. La cantidad total recuperada fue de $5,2 \times 10^8$ vg.

A partir de los datos de la **Figura 7A**, se calculó una relación entre Absorbancia y cantidad de partículas virales genómicas (vg), obteniendo en el segundo peak un factor igual a $2,3 \times 10^6$ [vg/mAU*ml], y para el tercer peak un factor igual a $1,8 \times 10^6$ [vg/mAU*ml]. Este factor se utilizó para calcular la cantidad de vector viral en los peaks de las siguientes cromatografías. La razón entre Absorbancia a 260 nm y Absorbancia a 280 nm fue de 0,89 y 0,75 respectivamente, de estos valores se puede deducir que hay mayor cantidad de vectores vacíos que vectores virales completos, según lo publicado en diferentes artículos científicos [74, 75].

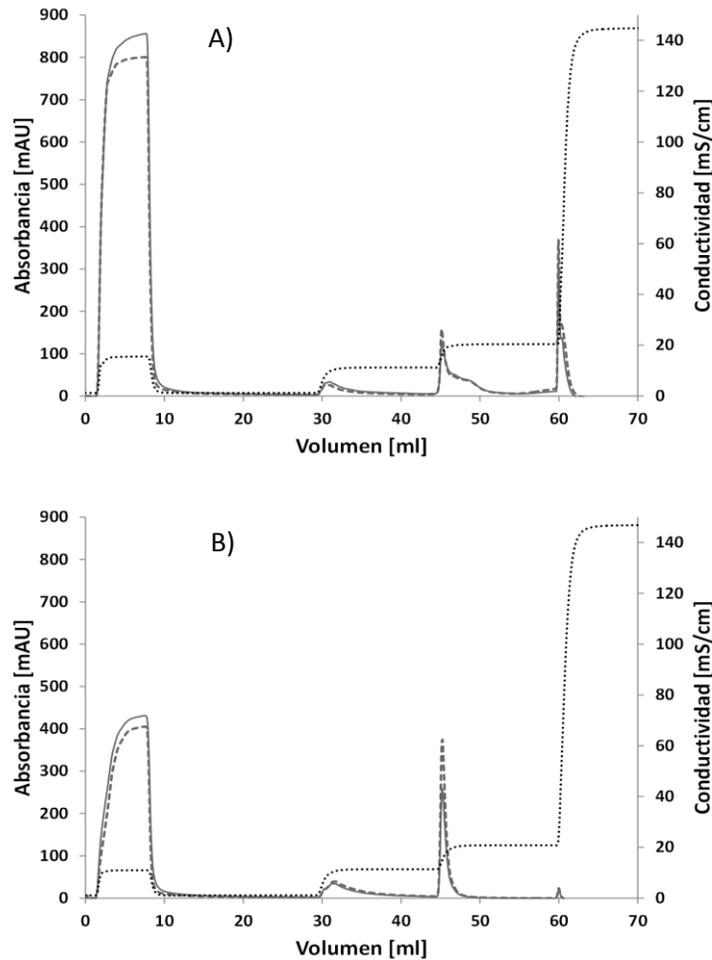


Figura 7: Purificación en dos pasos de AAV2_antiAldh2 por cromatografía de intercambio aniónico con columna monolítica CIM QA-1. A) Perfil de elución purificación de AAV2_antiAldh2. B) Purificación del Flow Through de la cromatografía de AAV2_antiAldh2. La línea continua muestra la absorbancia a 260 nm, la línea segmentada muestra la absorbancia a 280 nm y la línea punteada muestra la conductividad de la fase móvil.

El volumen de FT recuperado, fue nuevamente separado en un segundo paso de cromatografía. En la **Figura 7B** se muestra el perfil de elución de la cromatografía del FT. Se pueden apreciar sólo dos peaks. Se cargaron $1,7 \times 10^{10}$ vg, los vectores virales solamente eluyeron en el segundo peak, obteniendo $5,2 \times 10^8$ vg. El tercer peak del perfil de purificación anterior desaparece casi por completo. Se puede deducir que en el tercer peak se encontraban los virus que tenían mayor carga negativa.

En el caso de las cromatografías para purificar scAAV2_antiAldh2 y scAAV2_GFP, se presentan sus perfiles en Anexo I, se cargaron $7,8 \times 10^8$ vg y $5,5 \times 10^8$ vg respectivamente, pudiendo recuperar $3,8 \times 10^8$ vg y $3,7 \times 10^8$ vg en el último peak respectivamente.

También, para el caso de la purificación de scAAV2_antiAldh2 se realizó una segunda etapa de recuperación mediante una cromatografía del FT obtenido. Se cargaron $2,6 \times 10^8$ vg y se recuperaron en un 100% en el segundo peak.

A partir de los resultados obtenidos, es posible indicar que la capacidad de la columna está limitada a una capacidad en un rango cercano a $5,2 \times 10^8$ vg/ml de columna (volumen de la columna 1 ml). Esto explica que en las primeras cromatografías, donde la muestra era varios ordenes de magnitud mayor, se perdiera gran cantidad de los vectores virales en el FT. Por lo tanto, es necesario utilizar una columna de un volumen determinado a partir de la cantidad de vectores virales a purificar y su capacidad. Para el caso de la **Figura 7A**, sería necesario utilizar una columna de 61 ml.

Por otro lado, se hizo un análisis de la pureza de las fracciones colectadas mediante SDS-PAGE. Se corrieron 6 geles. Se hizo una tinción con Azul de Coomassie y luego una tinción con plata. Se utilizó el software Gel Analyzer para analizar las bandas de cada carril del Gel 1 teñido con plata presentado en Anexo II. Se obtuvo un 97% de pureza en la fracción que eluyó a 45 ml y 88% de pureza en la fracción que eluyó a 60 ml.

ii) Análisis de la purificación de los vectores AAV8 y scAAV8 mediante cromatografía de intercambio aniónico usando columna monolítica CIM QA-1

En la **Figura 8** se presenta el perfil de elución de la cromatografía de intercambio aniónico de los vectores virales scAAV8_antiAldh2. En la **Figura 8A** se aprecian también 3 peaks de elución. Encontrando el vector viral en el segundo y tercer peak, pero en mayor cantidad en el tercer peak.

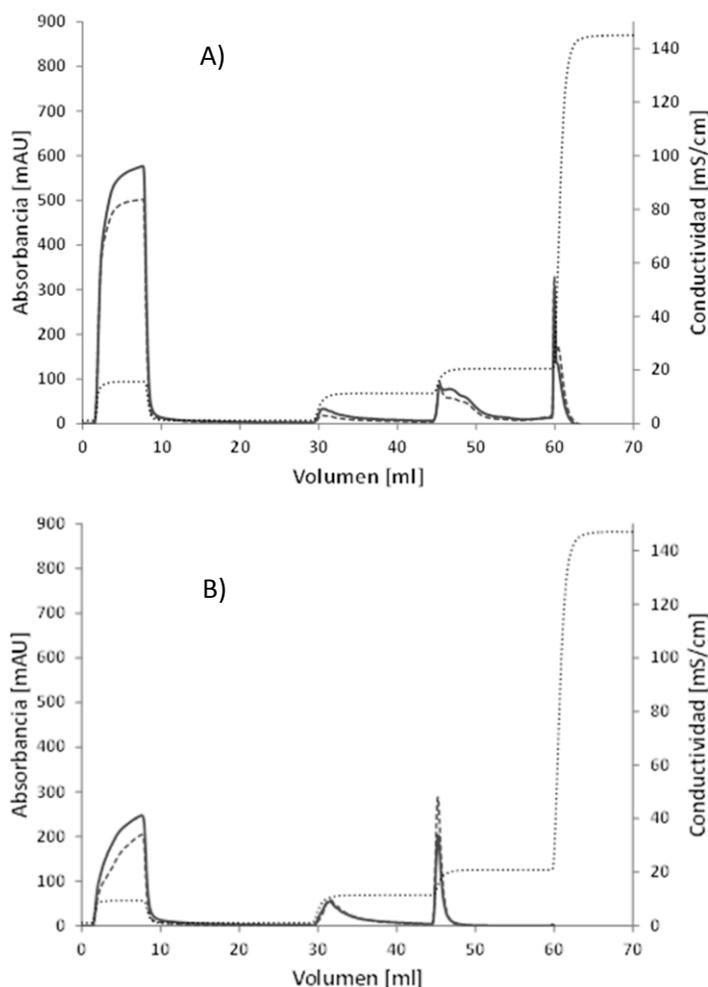


Figura 8: Purificación en dos pasos de scAAV8_antiAldh2 por cromatografía de intercambio aniónico con columna monolítica CIM QA-1. A) Perfil de elución purificación de scAAV8_antiAldh2. B) Purificación del Flow Through de la cromatografía de scAAV8_antiAldh2. La línea continua muestra la absorbancia a 260 nm, la línea segmentada muestra la absorbancia a 280 nm y la línea punteada muestra la conductividad de la fase móvil.

Se cargaron $1,9 \times 10^{12}$ vg, $4,2 \times 10^{11}$ vg y $1,7 \times 10^{11}$ vg para las cromatografías de AAV8_antiAldh2, scAAV8_antiAldh2 y scAAV8_GFP respectivamente. Los perfiles de elución de cada cromatografía se presentan en Anexo I. En el segundo peak se obtiene baja cantidad del vector viral, sin embargo en el tercer peak se obtiene un 5%, 24% y 10% de recuperación respectivamente. Recuperando en total 1×10^{11} vp y $1,1 \times 10^{11}$ vp

en el caso de la cromatografía de AAV8-antiAldh2 y scAAV8_antiAldh2 respectivamente, lo que indica que la capacidad de la columna para vectores virales AAV de serotipo 8 es de aproximadamente $1,1 \times 10^{11}$ vg/ml. Teniendo que utilizar una columna de 17 ml y 4ml de volumen para purificar la cantidad cargada de AAV8_antiAldh2 y scAAV8_antiAldh2 respectivamente.

Sin embargo, en la cromatografía para purificar scAAV8_GFP (Ver **Figura 9**), se recuperaron $1,8 \times 10^{10}$ vg en total, cantidad seis veces menor a la capacidad de la columna. Esto se puede deber a que la cantidad de contaminantes es la misma en todas las cromatografías, por lo tanto al haber menor cantidad de virus en la muestra, baja la probabilidad de poder unirse a los ligando por competencia con los contaminantes. Por lo tanto, en este caso, se considera como capacidad mínima de la columna de $1,8 \times 10^{10}$ vg/ml, tendiendo que utilizarse una columna de 9,5 ml.

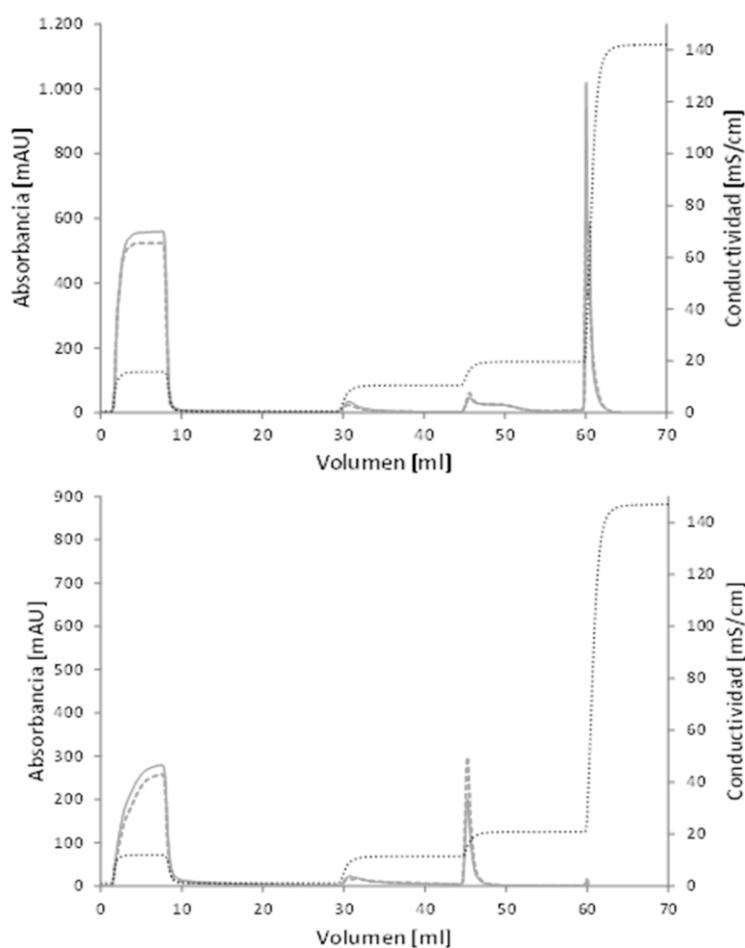


Figura 9: Purificación en dos pasos de scAAV8_eGFP por cromatografía de intercambio aniónico con columna monolítica CIM QA-1. A) Perfil de elución purificación de scAAV8_antiAldh2. B) Purificación del Flow Through de la cromatografía de scAAV8_eGFP. La línea continua muestra la absorbancia a 260 nm, la línea segmentada muestra la absorbancia a 280 nm y la línea punteada muestra la conductividad de la fase móvil.

En la **Figura 9** se muestra la purificación de scAAV8_GFP. En la **Figura 9A** se muestra la primera etapa cromatográfica, y en la **Figura 9B** se muestra la cromatografía del FT de la primera etapa. En la segunda etapa se cargaron $7,9 \times 10^8$ vg, eluyendo el 100% de ellos en el tercer peak. Esto se debe a que la cantidad de vector viral en la muestra era más de 20 veces menor que la capacidad mínima de la columna.

Se utilizó el software Gel Analyzer para analizar las bandas de cada carril del Gel 6 teñido con plata presentado en Anexo II. Se obtuvo un 94% de pureza en la fracción que eluyó a 45 ml y 73% de pureza en la fracción que eluyó a 46 ml.

3.4.3 Análisis estructural de los vectores virales AAV2 y AAV8 mediante TEM

Los vectores virales se visualizaron en un microscopio electrónico de transmisión (TEM), se mostraron como estructuras icosaédricas de 25-40 nm de tamaño para ambos serotipos de AAV, serotipos 2 y 8 (Ver Figura 10 y 11).

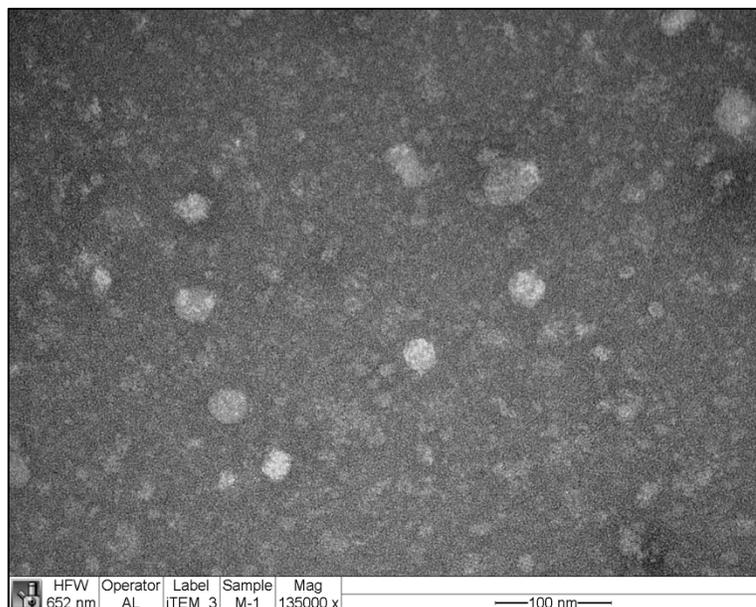


Figura 10: Análisis mediante TEM del vector viral AAV2 purificado con la columna monolítica CIM QA-1. Se muestran los vectores virales AAV2 intactos con tamaño entre 20 nm y 30 nm, forma icosaédrica característica y se aprecia presencia de contaminación celular. Magnificación 135.000x.

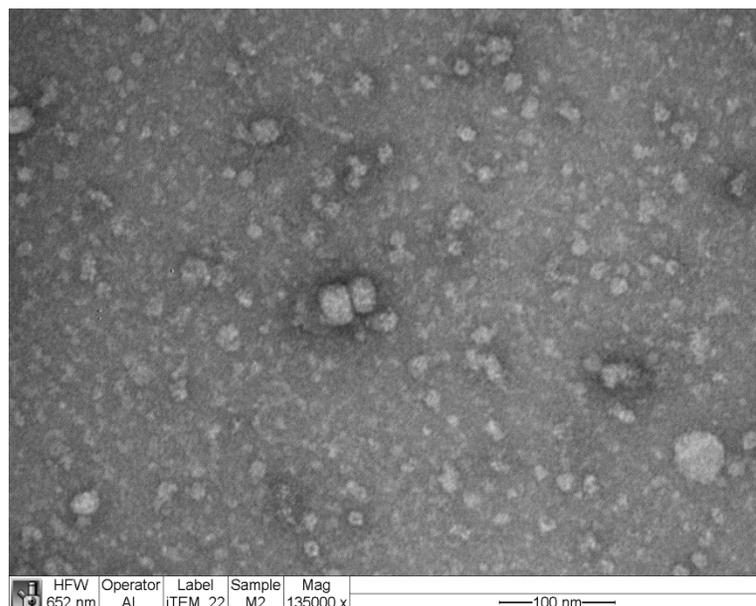


Figura 11: Análisis mediante TEM del vector viral AAV8 purificado con la columna monolítica CIM QA-1. Se muestran los vectores virales AAV8 intactos con tamaño entre 20 nm y 30 nm, forma icosaédrica característica y se aprecia presencia de contaminación celular. Magnificación 135.000x.

3.4.4 Análisis de infectividad de vectores purificados

Se hizo un análisis de la infectividad de los vectores purificados, utilizando el vector scAAV_GFP serotipo 8, el cual tiene tropismo al hígado. Se hizo una transfección en células HepG2, luego de 48 horas se realizó un análisis mediante microscopio de fluorescencia.

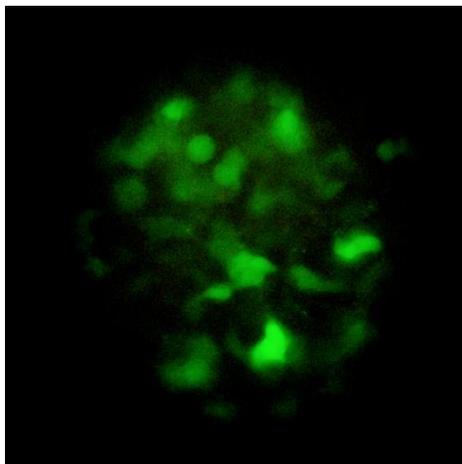


Figura 12: Microscopía de fluorescencia de células HepG2 transducidas con el vector viral scAAV_GFP purificado por cromatografía de intercambio aniónico con columna monolítica CIM QA-1.

En la Figura 12 se puede apreciar que hubo expresión de la proteína fluorescente verde GFP en las células HepG2 transducidas o infectadas, por lo tanto los virus producidos y luego purificados mantuvieron su capacidad de infección.

3.5 Conclusiones

Se lograron producir seis distintos vectores virales adenoasociados, cuatro de ellos llevaban la secuencia antisentido antiAldh2 para el tratamiento contra el alcoholismo, y dos llevaban el gen de la proteína fluorescente verde GFP como control para determinar la infectividad del virus purificado.

Los niveles de producción fueron muy variados, siendo la producción de los vectores AAV8 varios órdenes de magnitud mayor a la producción de los vectores AAV2.

En la producción de AAV8 se obtuvieron $1,9 \times 10^{11}$ vg/ml, $4,2 \times 10^{10}$ vg/ml y $1,7 \times 10^{10}$ vg/ml para AAV8_antiAldh2, scAAV8_antiAldh2 y scAAV8_GFP respectivamente.

En la producción de AAV2 se obtuvieron $3,2 \times 10^9$ vg/ml; $7,8 \times 10^7$ vg/ml y $5,5 \times 10^7$ vg/ml para AAV2_antiAldh2, scAAV2_antiAldh2 y scAAV2_GFP respectivamente.

Estos valores se encuentra dentro del rango de producción de vectores AAV publicados utilizando el método de triple transfección, donde indican que la producción debe ser mayor a 10^7 vp/ml.

Se pudo determinar que la capacidad de la columna monolítica CIM QA-1 fue menor que lo esperado. Se pudo determinar una capacidad distinta para los vectores AAV2 y AAV8, encontrándose valores de $5,2 \times 10^8$ vg/ml para AAV2 y de $1,8 \times 10^{10}$ vg/ml para AAV8.

4 INGENIERÍA GENÉTICA DE HEK 293 PARA PRODUCCIÓN DE VECTORES ADENO-ASOCIADOS PARA USO EN TERAPIA GÉNICA CONTRA EL ALCOHOLISMO

4.1 Resumen

En el presente trabajo se desarrolla un nuevo método de producción de virus AAV, que utilizaría una doble transfección en células HEK293 recombinante. Este método es una versión simplificada del método de triple transfección transitoria.

Se desarrolló una línea celular recombinante de HEK293F conteniendo uno de los tres elementos esenciales para la producción de AAV. En este caso se integró al genoma de HEK293F el fragmento que contiene los ITR y el gen de interés. Se utilizó el sistema de integración por transposones PiggyBac para obtener mayor número de copias en el genoma de HEK293F.

Se comparó la producción de AAV con el nuevo método y el método convencional, mediante cuantificación con RT-PCR, y la infectividad fue medida por citometría de flujo. Además, se hizo un análisis estructural mediante TEM.

Se logró desarrollar una línea celular HEK293F recombinante, llamada HEK293F_ITRGFP, que contiene uno de los tres elementos esenciales para la producción de vectores AAV.

Se logró producir vectores AAV2 y AAV8 con el nuevo método de doble transfección en células recombinantes HEK293F_ITRGFP. La producción de AAV2 fue de $9,4 \times 10^9$ vg/ml con el método convencional y $2,4 \times 10^8$ vg/ml con el nuevo método. La producción de AAV8 fue de $4,2 \times 10^{10}$ vg/ml con el método convencional y $1,8 \times 10^9$ vg/ml con el nuevo método. Esto es 40 y 24 veces menor que con la producción convencional.

Los vectores virales AAV2 y AAV8 producidos con el método convencional fueron infectivos, obteniendo $2,2 \times 10^8$ ip/ml (partículas infecciosas/ml) de AAV2 y $1,2 \times 10^6$ ip/ml de AAV8. Por el nuevo método se produjeron $4,7 \times 10^4$ ip/ml de AAV2 y $4,1 \times 10^4$ ip/ml de AAV8.

Por lo tanto, se puede concluir que se produjeron vectores virales AAV2 y AAV8 completos con su genoma pero que la mayoría no fueron infectivos.

4.2 Introducción

Los vectores virales representan el vehículo más efectivo de transferencia de genes para el tratamiento de disfunciones genéticas. A la fecha, sobre el 50% de todos los ensayos clínicos que se han realizado usaron vectores virales [16]. Es por ello, que varios tipos de vectores virales han sido ampliamente investigados para entrega de genes en innumerables protocolos de ensayos clínicos. Los vectores más usados son los vectores adenovirales (AdV), retrovirus, y vectores adenoasociados (AAV) principalmente. Actualmente, los vectores adenoasociados AAV son uno de los más usados para terapia génica. Esto se debe a que AAV son virus defectivos de replicación y no patogénicos, provienen de la familia de parvovirus. Este virus es capaz de transducir células en división y quiescentes, y además pueden transducir para un amplio rango de tipos de tejidos dependiendo del serotipo [55, 79].

Existen numerosos métodos de producción y caracterización de vectores AAV [52, 53, 55, 80-83]. La Tabla 1 entrega valores de rendimiento de producción de AAV para cada uno de los métodos más usados.

Tabla 1: Rendimiento de producción de rAAV con diferentes métodos [52]

Métodos de Producción	Rendimiento [vg/cel]
Transfección con plasmidios AAV en células HEK293:	
-Doble transfección y virus ayudante: HEK293 + Ad5 wt/AdDE1	10^3 - 10^4
-Triple transfección: HEK293 + plasmidio helper	10 - 10^3
Células empacadoras y virus ayudante:	
-HeLa B50+Ad5wt	6×10^3 - 2×10^4
-HeLa B50+Ad sub100r	3×10^3 - 6×10^5
-A549+Ad ts	$>10^4$
Herpes Simplex virus HSV-1:	
-Células BHK +rHSV	10^5 .
Baculovirus y células de insecto:	
-Sf9+rBac	5×10^4 - 10^5

El primer método que se presenta en la Tabla 1 consiste en usar la línea celular HEK293 junto con la transfección de dos plasmidios, uno conteniendo los genes de la cápside y replicación, otro plasmidio con el gen de interés encerrado por las secuencias ITR; y además se debe infectar con un adenovirus ayudante, deficiente de E1, para ayudar en su replicación. El segundo método considera la línea celular HEK293 y la transfección de tres plasmidios, los mismos plasmidios del método anterior, más un tercer plasmidio que contenga los genes de adenovirus ayudante deficiente de E1.

El tercer y cuarto método utilizan la línea celular HeLa empacadora más la infección con adenovirus nativo, siendo Ad5wt el adenovirus nativo serotipo 5 y Ad sub100r un adenovirus sensible a la temperatura para inactivarlo al final de la producción. El quinto

método usa la línea celular A549 empacadora más la infección con adenovirus sensible a la temperatura.

El sexto método utiliza la línea celular BHK y la triple infección con Herpes Simple virus, uno conteniendo los genes de empacamiento y replicación Rep/Cap, otro conteniendo el gen de interés encerrado por las secuencias ITR y un tercero conteniendo los genes de adenovirus para replicación. El último método de la Tabla 1 funciona en forma similar al anterior, pero utilizando células de insecto (Sf9) y la infección con tres baculovirus.

El método con mayor proyección es el método de triple transfección utilizando la línea celular HEK293, desarrollado por el grupo del Dr. Samulski, el cual requiere del uso de un plasmidio ayudante con los genes de adenovirus (E1A, E1B, E4 y E2), un plasmidio con los genes de la cápside (Cap) y los requeridos para replicación (Rep), y un plasmidio con el cassette conteniendo el transgen y las secuencias ITR. En este último se ha eliminado el 96% de los elementos virales [54]. A pesar que el método de triple transfección libre de virus ayudante minimiza la generación de adenovirus helper wild type, este método es laborioso, complejo y lento para realizarlo en mayor escala, como se requeriría para producción de virus a ser usado en estudios clínicos. Por otro lado, los sistemas existentes que usan virus helper son escalables y producen gran cantidad de vector viral.

Debido a que ninguno de los métodos convencionales usados actualmente permiten tener un producto de alta pureza y cantidad para que sea factible su producción a escala piloto o escala industrial para uso en pruebas clínicas o en tratamientos, es que diferentes grupos han realizado intentos por mejorar la producción mediante el desarrollo de líneas celulares estables productoras de AAV que sean inducibles, además se obtenga alta titulación, sea escalable y seguro para el uso en seres humanos.

Las líneas celulares de producción estable de los genes de empaquetamiento Rep/Cap que se han desarrollado, son células que no contienen los genes de adenovirus E1A/E1B en su genoma, ejemplo son HeLa y A549, por lo que requieren de la infección con adenovirus nativo para que se pueda replicar el vector AAV. Es por ello que grupos de investigadores han estudiado modificar genéticamente la línea celular HEK293, la cual contiene los genes de adenovirus E1A/E1B responsables de la replicación, y así mantener en forma estable genes de AAV para mejorar su producción, y eliminar el riesgo de contaminación [82, 83].

La mayor dificultad para crear una línea empacadora de AAV basada en HEK293 se debe a que el gen E1A de adenovirus, que se encuentra estable en esta línea celular, activa la expresión de las proteínas Rep, sin control ni regulación, siendo estas citostáticas [84] y citotóxicas [85].

Existen dos estudios del grupo de X.Xiao: en el primer estudio lograron hacer una línea celular empacadora de AAV basada en HEK293 [82] y en el segundo estudio lograron desarrollar una línea celular empacadora de AAV que mantiene en forma estable el gen de interés encerrado por las secuencias ITR [83]. Este último estudio es un gran éxito en términos de titulación, escalamiento y bioseguridad.

Varias mejoras de estos métodos han sido publicadas para producir grandes cantidades de vectores virales de alta calidad, sin embargo aún es necesario desarrollar alternativas de métodos de producción. En este trabajo se describe la producción mediante la co-transfección con dos plasmidios (Rep/Cap y Helper) en una línea celular HEK293F recombinante que contiene en su genoma varias copias del gen de interés encerrados por las secuencias ITR. Para validar la metodología propuesta de producción de vectores virales AAV, se desarrolló un sistema prototipo utilizando como gen de interés la proteína fluorescente verde (GFP) fácil de medir y cuantificar. Las pruebas se hicieron para producir vectores virales de dos serotipos: AAV2_GFP and AAV8_GFP.

4.3 Materiales y Métodos

4.3.1 Línea celular y condiciones de cultivo

Se utilizó la línea celular de crecimiento rápido HEK-293-F (Invitrogen). Esta línea celular fue utilizada para realizar ingeniería genética y modificar su genoma con la adición de un nuevo constructo. También se utilizó esta línea celular para producir vectores virales AAV con el método convencional de triple transfección; y para realizar un análisis de la infectividad de los vectores virales AAV producidos.

Las células fueron crecidas en adherencia a condiciones estándares, con medio DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB).

Para contar las células y determinar su viabilidad se utilizó el sistema de conteo automático LUNA™ Automated Cell Counter (Logos Biosystem).

4.3.2 Ingeniería Genética de HEK293F

i. Plasmidios y enzimas de restricción

Los plasmidios utilizados en la elaboración del constructo que fue integrado en HEK293F son los siguientes: El plasmidio con el gen de interés (GFP) y las secuencias ITR: pAAV_GFP (5.408 bp), el plasmidio con los genes que expresan para las proteínas que participan en la replicación (Rep) y las proteínas estructurales de la cápside (Cap) serotipos 2 y 8: pAAV_RC2 (7.321 bp), pAAV-RC8 (7.320 bp), y el plasmidio pHelper (11.600 bp) con los genes de adenovirus VA, E2A y E4 que ayudan a la replicación. Todos ellos fueron facilitados por el Laboratorio de Farmacoterapia de la Universidad de Chile. Las proteínas de adenovirus E1A y E1B, necesarias también para la replicación de los vectores virales, son expresadas en forma estable en las células HEK293.

El plasmidio pAAV_GFP contiene el promotor fuerte de citomegalovirus CMV, y elementos para obtener altos niveles de expresión, como lo son el intrón de β -globina y la señal poliA de la hormona del crecimiento humana (hGH pA). Este plasmidio contiene las secuencias ITR del vector viral AAV serotipo 2, que dirigen la replicación y encapsidación viral. Estas secuencias pueden usarse también para producir vectores virales de otros serotipos, como el vector AAV8 utilizado en este trabajo, obteniéndose un vector viral híbrido AAV2/8.

El plasmidio pAAV_GFP tiene un sitio de múltiple clonamiento, donde se insertó la secuencia de la proteína GFP, en este sitio se pueden colocar genes o secuencias génicas de hasta 3.000 pb. Por lo tanto, es posible utilizarse para la terapia génica contra el alcoholismo, la cual tiene una secuencia de 1.600 pb aproximadamente, que transcribe una secuencia antisentido del ARN mensajero de la enzima aldehído deshidrogenasa ALDH2, descrita en las secciones anteriores.

Este prototipo utilizó el gen de la proteína GFP como un gen reportero de la eficiencia de transfección durante la producción, además como identificador de células HEK293F modificadas genéticamente y como señal de su expresión luego de la infección viral.

Para realizar la modificación genética de HEK293F, a través de la integración de un constructo de interés en su genoma, se utilizó el sistema PiggyBac Transposon Vector (SBI System Biosciences). Este sistema consiste en dos plásmidos que se transfectan al mismo tiempo, uno de ellos contiene la secuencia que expresa la enzima transposasa de PiggyBac (PB210PA-1); y el otro plásmido se utiliza para entregar el gen de interés a integrar en el genoma (PB510B-1). El plásmido B510B-1 (6.456 bp) tiene también el promotor fuerte CMV, un sitio de múltiple clonamiento (MCS), además contiene dentro del fragmento a insertar al genoma, un marcador de selección por antibiótico puromicina dirigido con el promotor EF1alpha. Este fragmento a insertar al genoma se encuentra flanqueado por las secuencias ITR específicas de PiggyBac, que permiten su integración en sitios del genoma donde se encuentre la secuencia nucleotídica TTAA, además de su movilización y escisión. El plásmido PB210PA-1 (6.964 bp) tiene el promotor CMV, el intrón SV40, el gen que expresa la enzima Transposasa Super PiggyBac y una secuencia poliA SV40.

Además, se utilizó el plásmido pGEMTeasy (Promega) para el clonamiento del constructo de interés como paso intermedio, por sus numerosas regiones de sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, para encontrar homología con el plásmido PB510B-1 del sistema de modificación genética PiggyBac Transposon Vector.

La amplificación de los plásmidos pAAV_GFP, pAAV_RC2, pAAV_RC8, pAAV_Helper y pGemT-Easy, se realizaron en la cepa bacteriana *E.coli* Top10 en cultivo LB a 37°C con 100 µg/ml de ampicilina. Para el plásmido PB510B-1 se cultivó en medio LB a 30°C y 50 µg/ml de ampicilina según recomendaciones del fabricante. El plásmido comercial PB210PA-1 no puede ser amplificado, se usa directamente del stock plasmidial comercial.

ii. Clonamiento del fragmento de interés

Las enzimas de restricción utilizadas fueron las siguientes: AanI (PstI), PstI (PciI) y SmaI (SwaI) de Thermo Scientific, y SpeI, NotI, NheI, SacI y SmaI de NEB.

El nuevo método de producción requiere que uno de los elementos para la producción de AAV se encuentre integrado en el genoma de HEK293F. Por lo tanto, se propuso integrar el fragmento de interés que se encuentra en el plásmido pAAV-GFP, el cual contiene las secuencias ITR que encierran al gen de interés.

Los pasos a seguir fueron los siguientes:

- 1) Digestión del plásmido **pAAV_GFP** con las enzimas AanI (extremos romos) y PstI (extremos cohesivos). El fragmento generado fue de 2.000 pb.
- 2) Clonamiento del fragmento deseado en pGEMT-easy mediante la generación de extremos romos y adenilación, para posterior clonamiento en pGemT-Easy según instrucciones del fabricante. Se seleccionaron los clones positivos y se generó un stock glicerol. El plásmido generado fue llamado **pGemT_ITR_GFP**.
- 3) Este nuevo plásmido fue digerido con las enzimas SpeI y AanI, que fueron las únicas que producían extremos compatibles con dos sitios de reconocimiento del plásmido final de integración PB510B-1. El fragmento generado fue de 2600 pb, conteniendo las secuencias ITR, el gen GFP y parte del plásmido de pGemT-Easy.

- 4) El plasmidio PB510B-1 fue digerido en su sitio de múltiple clonamiento MCS con SmaI (extremos romos) y NheI (extremos cohesivos), los extremos generados son compatibles con los extremos generados por AatII y SpeI. Esta digestión linealiza el plasmidio.
- 5) El fragmento obtenido en el paso 3 fue ligado mediante T4 DNA ligasa al plasmidio PB510B-1 digerido. Se transformó la cepa *E.coli* Top10 y se seleccionaron varias las colonias, las cuales se identificaron las colonias positivas por medio de patrón de digestión con NotI. Este plasmidio fue llamado **PB510_ITR_GFP**.

Todos los fragmentos y plasmidios linealizados fueron separados y purificados desde un gel de agarosa de electroforesis, utilizando un kit disponible comercialmente para purificación desde gel.

Todos los constructos fueron verificados mediante secuenciación. Se envió a secuenciar el plasmidio **pGEMT_ITR_GFP** y el plasmidio **PB510_ITR_GFP**, para varios clones seleccionados.

iii. Modificación genética de HEK293F mediante sistema PiggyBac

Para realizar la integración del constructo de interés en el genoma de HEK293F, se utilizó el sistema PiggyBac Transposon Vector, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se utilizaron los plasmidio **PB510_ITR_GFP** con el constructo deseado y el plasmidio comercial con el gen de la enzima transposasa, **PB210PA-1**.

Las células HEK293F fueron crecidas en adherencia en placas de 6 pocillos hasta una confluencia de 60-80%.

Para cada pocillo se preparó una mezcla con 0,5 µg del plasmidio **PB510B_ITR_GFP**, 0,2 µg del plasmidio **PB210PA-1**, 8,0 µl del reactivo de transfección Viafect (Promega), y 50 µl DMEM/F12 sin SFB. Se mezclaron por vortex y se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 minutos. Luego, se agregó el volumen correspondiente a cada pocillo mediante dispersión y goteo. La actividad transposasa de PiggyBac termina a las 72 horas.

Al tercer día post-transfección, se cambió el medio de cultivo y se agregó medio DMEM/F12 con 3% SFB y 1 µg/ml de puomicina por 5 días. Las células que sobrevivieron también se pudieron identificar por medio de la fluorescencia emitida a luz visible, signo de la expresión de la proteína GFP. Luego de varios pasajes, se volvió a hacer una selección con una concentración de 6,7 µg/ml y 13,4 µg/ml de puomicina.

Las células HEK293F modificadas que sobrevivieron a las tres concentraciones de puomicina, fueron congeladas y almacenadas en nitrógeno líquido. Estos tres grupos de células modificadas fueron llamadas **HEK293F_ITRGFP_puro1**, **HEK293F_ITRGFP_puro6** y **HEK293F_ITRGFP_puro13**. Luego de varios pasajes, las células **HEK293F_ITRGFP_puro1** y **HEK293F_ITRGFP_puro13** fueron caracterizadas mediante una curva de crecimiento por 10 días para comparar su viabilidad.

4.3.3 Producción de vectores adenoasociados AAV serotipos 2 y 8 usando HEK293F y HEK293F_ITRGFP recombinante

La producción de AAV, se realizó utilizando la línea celular **HEK293F** y la línea celular recombinante **HEK293F_ITRGFP_puro1**. Las células fueron cultivadas en adherencia en placas de 100 mm, como fue explicado en la sección anterior. Se utilizó el método de transfección basado en fosfato de calcio. Se realizó el método de producción convencional de triple transfección en células **HEK293F**, y el nuevo método propuesto de doble transfección en células **HEK293F_ITRGFP_puro1**.

Luego de 48 horas, se recolectaron las células junto con el medio de cultivo, y se aplicaron tres ciclos de congelar/descongelar para liberar los vectores virales producidos. El debris celular fue descartado y el sobrenadante fue recolectado, se adicionó Benzona a una concentración de 200 unidades/ml por una hora. Luego, se almacenó a -80°C el sobrenadante alicuotado.

Se realizó un control negativo de la producción para observación simultánea. Los vectores virales producidos por **HEK293F** y **HEK293F_ITRGFP_puro1** fueron analizados por microscopía electrónica de transmisión TEM. El análisis mediante TEM de los vectores virales AAV producidos se realizó con tinción negativa de acetato de uranilo al 1% y microfotografiado con una cámara digital.

4.3.4 Cuantificación de la producción de AAV

i. Cuantificación con RT-PCR

En este caso se realizó un protocolo adaptado desde el Laboratorio de Richard Jude Samulski. Este protocolo no necesita el uso del kit de extracción de ADN viral usado en las secciones anteriores.

Se agregaron 10 μl de vector viral producido y 90 μl de una mezcla de DNase (100 mg de DNaseI, Tris-HCl 10 mM pH7,5, 2 mM CaCl_2 , 100 mM MgCl_2 para un volumen final de 1 ml), se mezcló y dejó incubando a 37°C por 1 hora. Luego, se adicionaron 6 μl de 0,5M EDTA, se mezcló por vortex y se agregaron 120 μl de una mezcla de Proteinasa K (1 M NaCl, 1% Sarcocyl, 0,1 mg/ml Proteinasa K agregar agua para completar 1 ml de solución). Se dejó incubando a 55°C por 2,5 horas. Luego se inactivó la Proteinasa K a 95°C por 10 minutos.

La curva standard fue preparada con 7 diluciones seriadas de 1:5 del plasmidio pAAV_GFP, partiendo por una dilución 100x.

El protocolo para la reacción de RT-PCR fue el siguiente: 95°C por 600 segundos y 45 ciclos de 95°C por 10 segundos para denaturar el ADN templado, 59°C por 10 segundos para el alineamiento de los partidores, y 72°C por 15 segundos para la extensión.

Los partidores utilizados fueron los siguientes:

Partidor forward **GFPfw** 5'-AAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGC-3'; y Partidor reverse **GFPrev** 5'-CTTGTAGTTGCCGTCGTCCTTGAA-3'.

ii. Cuantificación usando Citometría de Flujo

Para cuantificar los vectores infectivos AAV producidos, es necesario hacer una infección en las células HEK293F con diferentes diluciones del stock viral producido, y luego medir la cantidad de células que fluorescen al expresar la proteína GFP para cada dilución.

Se cultivaron las células HEK293F en placas de 6 pocillos, inoculando $2,5 \times 10^5$ células por pocillo, y se agregaron 2,5 ml de medio de cultivo DMEM/F12 con 10% SFB. Se dejó cultivando por 24 horas.

Se realizó una dilución del stock de vector viral AAV de 10 veces, luego se hizo una dilución seriada desde 2×10^{-2} a 8×10^{-4} . Se retiró el medio de los pocillos completamente y se agregó 1 ml de cada dilución en cada pocillo en duplicado. Se dejó incubando por 90 minutos a 37°C. Luego, se completó el medio de cultivo a 2,5 ml y se dejó incubando por 3 días.

Al tercer día, las células fueron despegadas con el método de Tripsina/EDTA y lavadas con PBS dos veces. Se resuspendieron en 1 ml de Paraformaldehído 1% en PBS. Luego, fueron transferidas a tubos de citometría de flujo de 5ml.

Finalmente, las células fueron filtradas y medidas en un equipo Citómetro de Flujo FACSCanto II (BD Biosciences) del Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Los resultados fueron entregados como el porcentaje de células fluorescentes en 1 ml de muestra.

Se escogieron para el cálculo de la titulación las diluciones que tenían entre 1% a 20% fluorescencia por GFP. Bajo 1% el equipo no es muy preciso para la determinación de número de células fluorescentes; y sobre 20% hay alta probabilidad que células fluorescentes hayan sido transducidas por dos vectores virales, resultando una subestimación de total de virus infectivos [86].

4.3.5 Determinación del número de copias del fragmento de interés en el genoma de las células HEK293F-ITR_GFP

Se hizo una extracción del genoma de **HEK293F_ITRGFP_puro1**, **HEK293F_ITRGFP_puro13** y **HEK293F** normal como control. Se utilizó el kit de extracción genómica DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Se realizó una dilución de la extracción genómica 1:10 y 1:100. Se utilizó el mismo protocolo y curva estándar descrito anteriormente para la cuantificación por RT-PCR de los vectores virales AAV producidos.

4.4 Resultados y Discusión

4.4.1 Generación del constructo de interés y su clonamiento en plasmidio PB510B

El plasmidio pAAV_GFP fue digerido y clonado en el plasmidio pGEMTeasy. Se seleccionaron algunas colonias, luego se dejaron cultivando y se realizó la digestión con las enzimas *SacI* y *SpeI* para identificar los clones con el constructo de interés correcto.

El constructo de interés corresponde a:



I. Clonamiento del fragmento de interés en pGemT-Easy:

En la Figura 13, se presenta un gel de electroforesis con los fragmentos digeridos con *SacI* y *SpeI*. Resultando los clones llamados PGHR1 y PGHR2 con patrones de digestión esperados para *SacI* y *SpeI*.

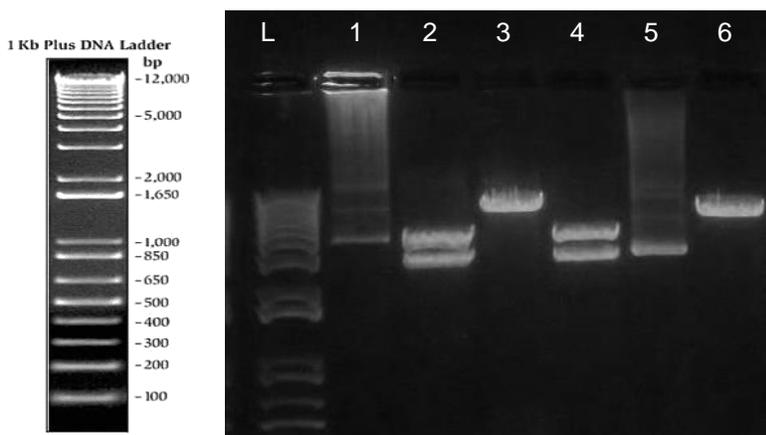


Figura 13: Identificación de clones positivos con pGemT_ITRGFP. Gel de electroforesis mostrando patrones de cortes con enzimas de restricción. L: Ladder 1 kb Plus, 1: PGHR2 sin dig, 2: PGHR2 *SacI*, 3: PGHR2 *SpeI*, 4: PGHR1 *SacI*, 5: PGHR3 sin dig, 6: PGHR3 *SacI*.

De los ocho clones seleccionados, sólo el clon llamado P1T3 no presentó el patrón de corte esperado con *NotI*. Los clones que resultaron positivos en la digestión con *NotI* se confirmaron mediante secuenciación con partidores Forward β -globin 5'-ATTCTGAGTCCAAGCTAGGC-3' y Reverse hGH polyA 5'-TAGAAGGACACCTAGTCAGA-3'.

II. Clonamiento del fragmento de interés en PB510B:

Desde el plasmidio del clon **PGHR2**, se obtuvo el fragmento de interés para ser clonado en el plasmidio **PB510B**. Para ello se realizó la digestión del plasmidio **pPGHR2** con *SpeI* y *AanI*. El plasmidio **PB510B** fue digerido con las enzimas *NheI* y *SmaI*. Se ligaron y transformaron en *E.coli* Top10. Se seleccionaron los clones y se identificaron los clones positivos mediante el patrón de digestión con *NotI* (Ver Figura 14).

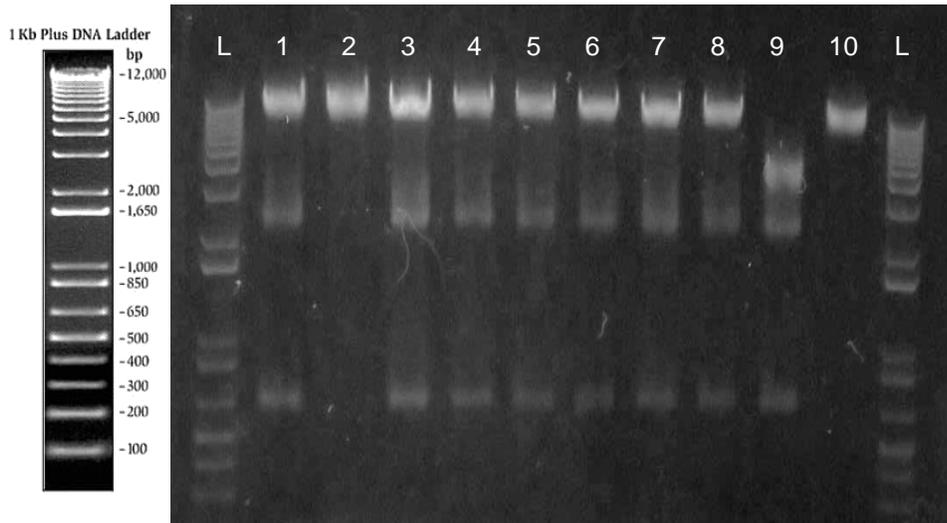


Figura 14: Identificación de clones positivos con PB510_ITRGFP. Gel de electroforesis mostrando patrones de cortes con enzimas de restricción. L: Lader 1 kb plus, 1:P1T2, 2:P1T3, 3:P1T4, 4:P2T1, 5:P2T3, 6: P2T3, 7:P2T4 8:P3T1, 9:PGHR1 (Control), 10: PB510 (Control)

De los ocho clones seleccionados, sólo uno de ellos no presentó el patrón de corte esperado con *NotI*, el clon llamado P1T3. Los clones P1T2, P2T1, P1T3 y P3T1 que resultaron positivos en la digestión con *NotI*, se confirmaron mediante secuenciación con partidores Forward β -globin 5'- ATTCTGAGTCCAAGCTAGGC-3' y Reverse hGH polyA 5'- TAGAAGGACACCTAGTCAGA-3'.

Se escogió trabajar con el clon P2T1 para propagar el plasmidio PB510_ITRGFP.

4.4.2 Obtención de células HEK293F_ITRGFP recombinante y comparación de su curva de crecimiento

Se realizó la transfección de los plasmidios PB510_ITRGFP y PB210A del sistema PiggyBac Transposon Vector en células HEK293F. Luego de 3 días se hizo una selección con antibiótico puromicina a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ por 5 días. El conjunto de células que sobrevivieron a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ de puromicina, se mantuvieron en crecimiento por varias semanas con esa misma concentración de puromicina, luego se generó un banco de células para posteriores análisis.

Después de varias semanas, se aumentó la concentración de puromicina a 6,7 $\mu\text{g/ml}$ y 13,4 $\mu\text{g/ml}$, generándose dos conjuntos de células adicionales. Se obtuvieron 3 conjuntos de células HEK293F recombinantes, las que fueron denominadas como **HEK293F_ITRGFP_puro1**, **HEK293F_ITRGFP_puro6** y **HEK_ITRGFP_puro13**.

Se hizo una comparación de las curvas de crecimiento **HEK293F_ITGFP_puro1**, **HEK293F_ITRGFP_puro13** con las células **HEK293F** no modificadas. Las curvas de crecimiento y la viabilidad se entregan en el gráfico de la Figura 15. La densidad celular corresponde a las células viables, y la viabilidad es el porcentaje de células vivas medidas mediante el método de exclusión por tinción con trypan blue.

En la **Figura 15** se puede apreciar que las células modificadas **HEK293F_ITRGFP_puro1** y **HEK293F_ITRGFP_puro13** son muy similares en los primeros estados del crecimiento con respecto a las células HEK293F no modificadas. Tienen una curva de crecimiento normal, con una velocidad de crecimiento muy parecida en la fase exponencial, y logran concentraciones celulares cercanas a 1×10^6 células/ml. La velocidad máxima específica de crecimiento (μ_{max}) fue 0,0323 1/h, 0,0345 1/h y 0,0298 1/h para HEK293F, HEK293F_ITRGFP_puro1 y HEK293F_ITRGFP_puro13 respectivamente. El tiempo de duplicación T_d para cada uno fue de 21 h, 20 h y 23 h respectivamente. Cuando se llega al estado estacionario, las células modificadas tienen una viabilidad más baja que las células HEK293F no modificadas.

Esta diferencia no es importante para la producción de vectores AAV, ya que se requiere que las células se encuentren en su fase exponencial para realizar la producción viral, donde las curvas son muy similares.

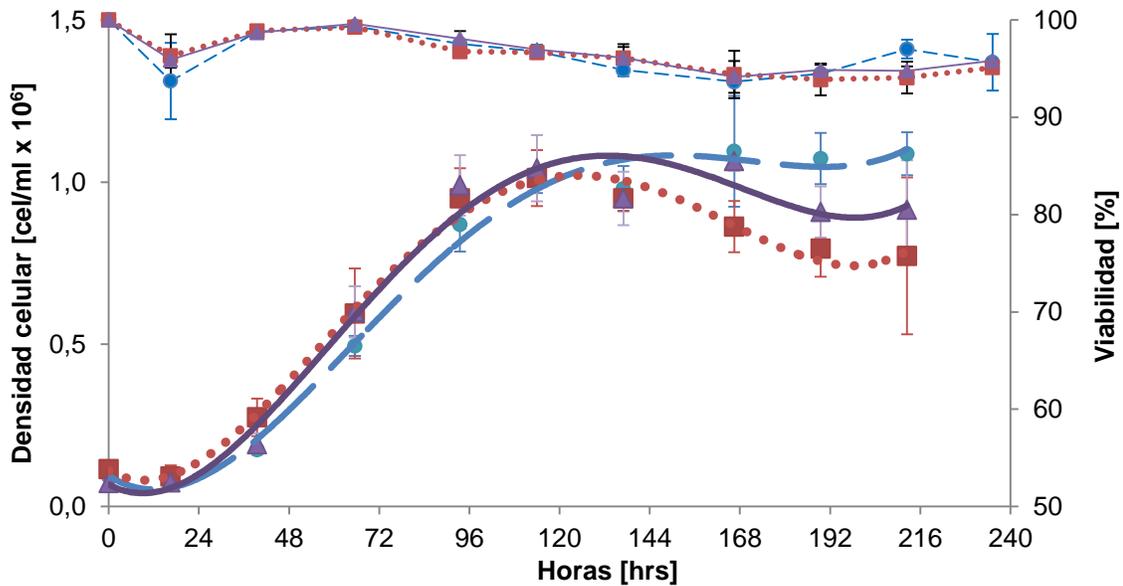


Figura 15: Curvas de Crecimiento de HEK293F normal y modificada. Los círculos y línea segmentada corresponden a la curva de crecimiento y viabilidad de HEK293F normal. Los triángulos y línea continua corresponden a la curva de crecimiento y viabilidad de HEK293F_ITRGFP1. Los cuadrados y línea punteada corresponden a la curva de crecimiento y viabilidad de HEK293F_ITRGFP13.

Por otro lado, mediante citometría de flujo se midió la fluorescencia de las células recombinantes HEK293F_ITRGFP_puro1. La citometría encontró que el 96,8% de las células emitían fluorescencia, por lo tanto se pudo corroborar que la gran mayoría del stock de células recombinantes HEK293F_ITRGFP_puro1 tiene en su genoma integrado el constructo de interés. La Figura 16 entrega el resultado de esta medición, donde se muestra un histograma de la distribución de células según su intensidad de fluorescencia.

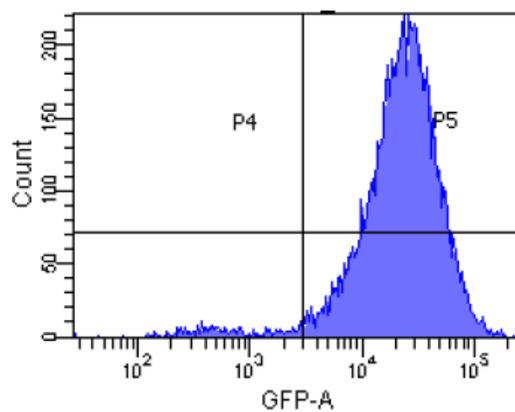


Figura 16: Distribución de células recombinantes HEK293F_ITGFP1 según emisión de fluorescencia.

Además, mediante RT-PCR se cuantificó el número de copias del constructo de interés en el genoma de HEK293F_ITRGFP_puro1 y HEK293F_ITRGFP_puro13. Se extrajo el genoma de 1×10^6 células en 200 μ l, se sacaron 5 μ l de ese stock y se midió la cantidad de copias del gen de GFP, resultando 1,3 copias para HEK293F_ITRGFP_puro1 y 16,3 copias para HEK293F_ITRGFP_puro13.

4.4.3 Producción de vectores adeno-asociados AAV2_eGFP y AAV8_eGFP

La producción de AAV2 y AAV8 fue realizada en forma exitosa en las células HEK293F con el método de triple transfección, y en las células recombinantes **HEK293F_ITRGFP_puro1** con el nuevo método de doble transfección. Para ambos casos se presentó un efecto citopático característico pasadas las 48 horas. Se observaron bajo microscopio espacios vacíos entre células y algunas células flotando (Ver Figura 17 y Figura 18). Los controles negativos, que eran células **HEK293F** y células **HEK293F_ITRGFP_puro1** sin transfectar, se mostraron confluentes con una alta viabilidad (Ver Figura 19).

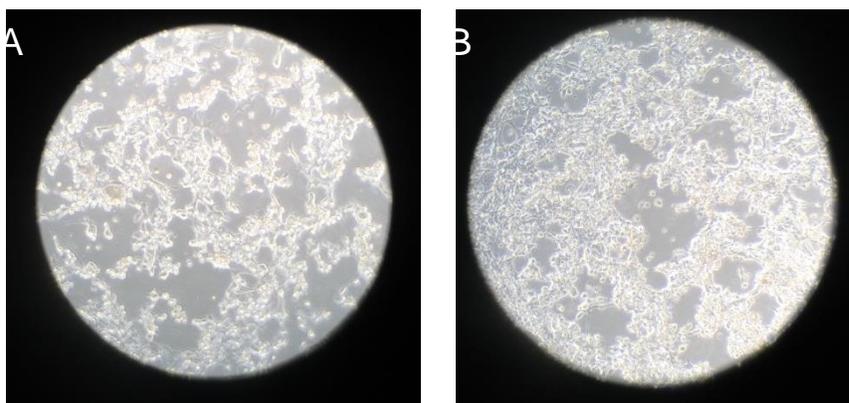


Figura 17: Visualización mediante microscopio de las placas con HEK293F (A) y HEK293F_ITRGFP1 (B) a las 48 horas de producción. Se puede visualizar el efecto citopático generado por los vectores virales AAV2 producidos.

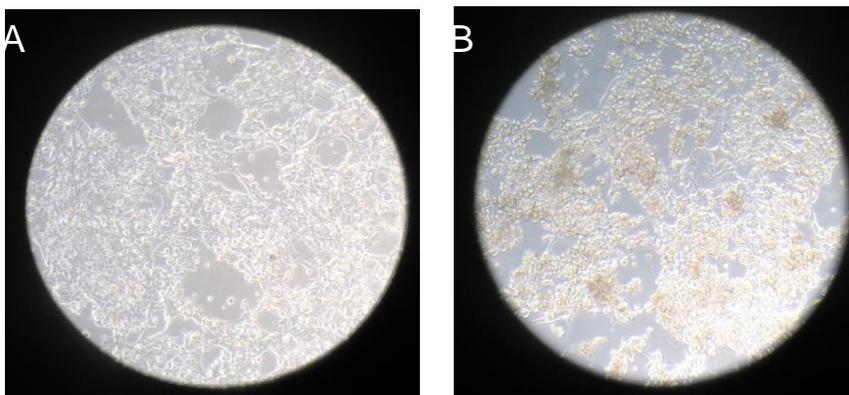


Figura 18: Visualización mediante microscopio de las placas con HEK293F (A) y HEK293F_ITRGFP1 (B) a las 48 horas de producción. Se puede visualizar el efecto citopático generado por los vectores virales AAV8 producidos.

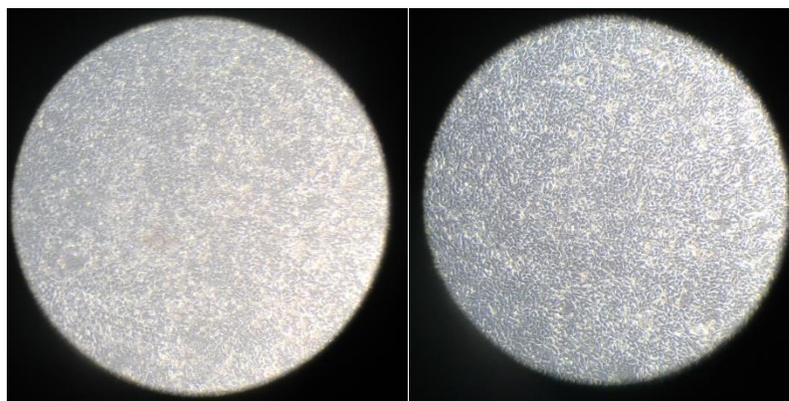


Figura 19: Visualización mediante microscopio de las placas controles (sin transfectar) con HEK293F (A) y HEK293F_ITRGFP1 (B) a las 48 horas de producción. Ambas células se encontraban confluentes, sin presencia considerable de células muertas.

4.4.4 Comparación del método de producción convencional con el nuevo método

Para comparar el método convencional con el método nuevo, se cuantificaron los vectores virales infectivos mediante la transducción de los vectores virales en células HEK293F, y se contaron las células que expresaban la proteína GFP por medio de un Citómetro de Flujo. Luego, se visualizaron los vectores virales producidos por ambos métodos con TEM, los que finalmente se cuantificaron usando RT-PCR.

I. Medición de la infectividad de los vectores virales AAV producidos

Se contaron las células HEK293F que emitían fluorescencia para todos los casos de infección con los vectores virales AAV2 y AAV8 producidos con el método convencional y el nuevo método. Se infectó con distintas diluciones de cada stock viral para lograr identificar la dilución que permiten obtener un entre 1% y 20% de células fluorescentes.

Según los resultados medidos por citometría de flujo (Ver Anexo IV), se produjeron $2,2 \times 10^8$ partículas infecciosas (ip) de AAV2 por 1 ml de medio de cultivo y $1,2 \times 10^6$ ip de AAV8 por 1 ml de medio de cultivo con el método convencional.

Por el nuevo método se produjeron $4,7 \times 10^4$ partículas infecciosas (ip) de AAV2 por 1 ml de medio de cultivo y $4,1 \times 10^4$ ip de AAV8 por 1 ml de medio de cultivo con el método convencional. En este caso el porcentaje de células fluorescente fue de 0,9% y 1,4% respectivamente para AAV2 y AAV8, valores que se encuentran en el límite de detección.

Por lo tanto, con el nuevo método es posible producir vectores virales AAV2 y AAV8, sin embargo estos vectores virales no fueron infectivos. Para descartar que los virus se encuentren vacíos, se realizó un análisis TEM a cada una de las producciones.

II. Visualización mediante TEM de los vectores virales producidos

Se realizó una dilución de 10 veces de la solución sobrenadante que contenía los virus producidos por ambos métodos y para los dos serotipos AAV2 y AAV8. En las Figuras 20, 21, 22 y 23 se puede apreciar presencia de virus completos, se encontraron muy pocos vacíos para todos los casos. Las Figuras 20 y 22 muestran los vectores AAV2 y AAV8 producidos con el método convencional, y las Figura 21 y 23 muestran los vectores AAV2 y AAV8 producidos mediante el nuevo método desarrollado.

En general, se presenta la misma cantidad de vector viral AAV por unidad de superficie. Por lo tanto, se puede concluir que los vectores fueron producidos por el nuevo método en una cantidad similar que con el método convencional. También, se puede concluir que los vectores producidos por el nuevo método estaban completos. Sin embargo, no son infectivos según se determinó por citometría de flujo. Es posible que el gen de GFP haya sido mutado en el proceso de producción de los vectores virales o que los vectores virales hayan encapsidado una fracción de ADN diferente a la del constructo de interés.

Para poder determinar si dentro de los vectores virales se encontraba el gen de interés, se realizó una cuantificación de las producciones con el método convencional y el nuevo método mediante RT-PCR.

La producción de AAV2 fue de $9,4 \times 10^9$ vg/ml y de AAV8 fue de $4,2 \times 10^{10}$ vg/ml, con el método convencional. La producción de AAV2 fue de $2,4 \times 10^8$ vg/ml y de AAV8 fue de $1,8 \times 10^9$ vg/ml, con el nuevo método.

La producción de AAV2 fue 40 veces menor con el nuevo método, y para AAV8 fue 24 veces menor con el nuevo método. Sin embargo, la cantidad de virus infectivo fue muy baja, 4 y 2 órdenes de magnitud menor para AAV2 y AAV8 respectivamente, valores que pueden estar en el límite de detección del equipo. Por lo tanto, es necesario purificar y concentrar los virus producidos para poder obtener niveles de titulación y aplicar un MOI adecuado para medir su infectividad.

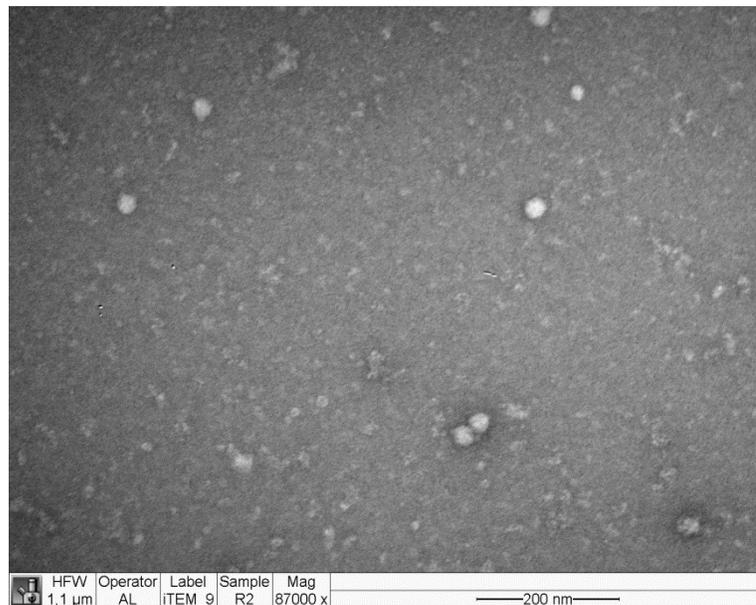


Figura 20: Análisis mediante TEM del vector viral AAV2 producido con el método convencional. Se aprecian los vectores AAV2 completos con tamaño entre 20 nm y 30 nm, forma icosaédrica. Magnificación 87.000x.

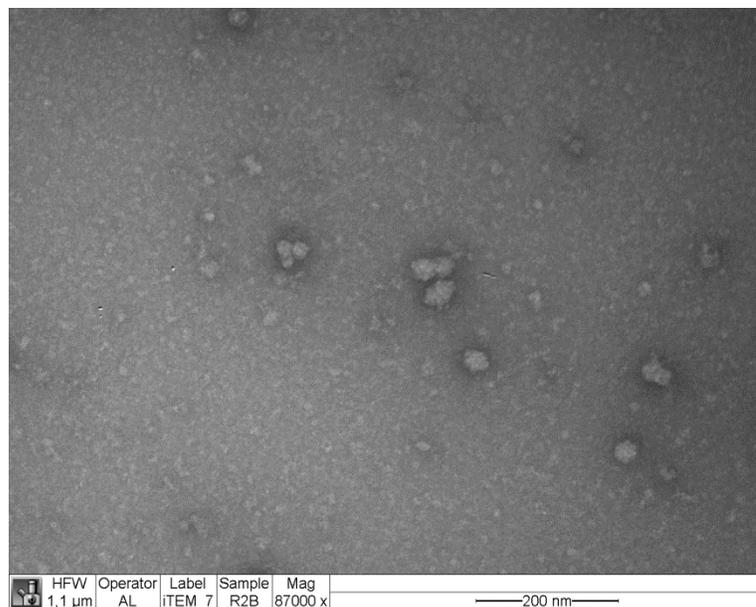


Figura 21: Análisis mediante TEM del vector viral AAV2 producido con el nuevo método. Se aprecian los vectores AAV2 completos con tamaño entre 20 nm y 30 nm, forma icosaédrica. Magnificación 87.000x.

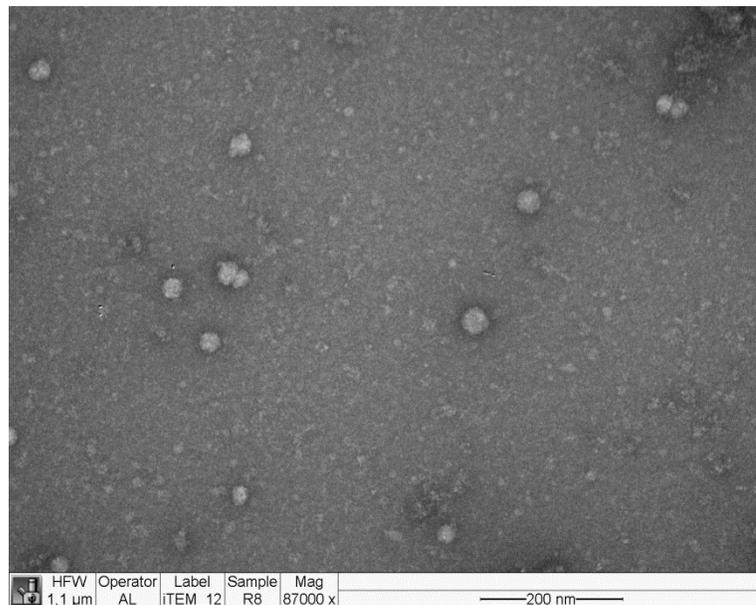


Figura 22: Análisis mediante TEM del vector viral AAV8 producido con el método convencional. Se aprecian los vectores AAV8 completos con tamaño entre 20 nm y 30 nm, forma icosaédrica. Magnificación 87.000x

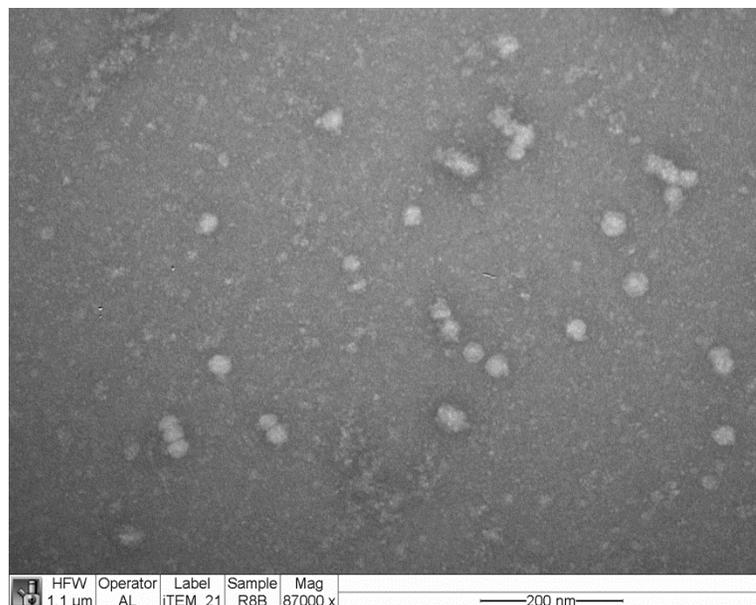


Figura 23: Análisis mediante TEM del vector viral AAV8 producido con el nuevo método. Se aprecian los vectores AAV8 completos con tamaño entre 20 nm y 30 nm, forma icosaédrica. Magnificación 87.000x.

4.5 Conclusiones

Se logró desarrollar una línea celular HEK293F recombinante, llamada HEK293F_ITRGFP, que contiene uno de los tres elementos esenciales para la producción de vectores AAV.

Se verificó que el constructo estuviese en el genoma de la célula HEK293F recombinantes mediante RT-PCR, obteniendo 1,3 copias en promedio para las células HEK293F_ITRGFP_puro 1 y 16 copias en promedio para las células HEK293F_ITRGFP_puro16.

Se logró producir vectores AAV2 y AAV8 con el nuevo método de doble transfección en células recombinantes HEK293F_ITRGFP. Hubo clara presencia de efecto citopático, lo que es un indicio de una producción viral exitosa. Esto pudo ser corroborado al visualizar cada una de las producciones con TEM, donde aparecen los virus con su forma característica y tamaño.

La producción de AAV2 fue de $9,4 \times 10^9$ vg/ml con el método convencional y $2,4 \times 10^8$ vg/ml con el nuevo método. La producción de AAV8 fue de $4,2 \times 10^{10}$ vg/ml con el método convencional y $1,8 \times 10^9$ vg/ml con el nuevo método. Esto es 40 y 24 veces menor que con la producción convencional. Se cree que esta diferencia se debe al bajo número de copias que tenían las células recombinantes HEK293F_ITRGFP_puro1. Se propone aclarar esta hipótesis mediante la selección de clones con mayor número de copias para realizar la producción con el nuevo método.

Los vectores virales AAV2 y AAV8 producidos con el método convencional fueron infectivos, obteniendo $2,2 \times 10^8$ ip/ml (partículas infecciosas/ml) de AAV2 y $1,2 \times 10^6$ ip/ml de AAV8 con el método convencional.

Por el nuevo método se produjeron $4,7 \times 10^4$ ip/ml de AAV2 y $4,1 \times 10^4$ ip/ml de AAV8. Valores muy bajos con respecto a la cantidad de virus que contiene el gen de interés indicado anteriormente ($9,4 \times 10^9$ vg/ml y $2,4 \times 10^8$ vg/ml para AAV2 y AAV8).

Por lo tanto, se puede concluir que se produjeron vectores virales AAV2 y AAV8 completos con su genoma pero no fue posible determinar su infectividad debido a la baja titulación obtenida.

5 CONCLUSIONES GENERALES

La producción y purificación de vectores virales para terapia génica es uno de los puntos relevantes para poder realizar los ensayos de las distintas fases clínicas y para su posterior comercialización.

Actualmente, hay gran expectación en los resultados que se tendrá con el gran número de terapias génicas en desarrollo, debido a que varias terapias están logrando pasar a las últimas fases de pruebas clínicas. El desafío es lograr tener una capacidad de producción de vectores virales que respondan a la creciente demanda por estos productos. Para ello, la academia con la industria se han unido y están haciendo grandes esfuerzos en desarrollar tecnologías para lograr niveles de producción acorde a los requerimientos de calidad y cantidad que se requerirán [8].

El presente estudio se basa en producir vectores virales para terapia génica contra el alcoholismo, enfocándose principalmente en mejorar los procesos de producción y purificación de los vectores virales. Es por esto, que los resultados obtenidos se pueden extrapolar al uso de vectores virales conteniendo otro gen terapéutico. Para el caso en estudio, el gen terapéutico es una secuencia nucleotídica que codifica para el ARN antisentido de la enzima ALDH2 para inhibir su traducción. El uso de vectores adenovirales y adenoasociados son ventajosos para este tipo de terapia, debido a su amplio uso, bioseguridad y que no se integran en el genoma de las células blanco.

Para la producción de vectores virales para terapia génica contra el alcoholismo para pruebas clínicas, se deben optimizar los costos de producción, debido a la gran cantidad de virus que serán requeridos. Es por esto, que el presente estudio se enfoca en abordar dos etapas cruciales en la producción de vectores virales, estas etapas son el cultivo de vector viral y la purificación primaria, cuyo objetivo es capturar la mayor cantidad de los vectores virales producidos.

En el primer trabajo se determinó que la columna monolítica CIM QA-1 tiene un rendimiento similar a la columna convencional Q-Sepharose XL para la purificación de vectores AdV5. Por lo tanto, la columna CIM QA-1 es una buena alternativa para ser usada para producción a mayor escala, pudiendo operar a flujos 5 a 10 veces mayores que las columnas convencionales, sin perder su rendimiento, y de esta manera reducir tiempos y costos de producción.

Para las primeras pruebas de validación de la terapia génica contra el alcoholismo, se usó un vector viral AdV5 [4,5]. Una alternativa al vector adenoviral AdV5 son los vectores virales adenoasociados AAV, que han sido muy estudiados y usados en aplicaciones clínicas durante las últimas décadas. La gran ventaja de estos vectores se debe a sus virtudes en bioseguridad tanto en la producción como para el paciente. Además, su versatilidad de tropismos permite múltiples aplicaciones. La gran desventaja de los vectores AAV es su capacidad de clonación (hasta 4000 pb).

En este trabajo se realizó por primera vez, la producción y purificación de vectores AAV y scAAV serotipos 2 y 8 llevando la secuencia de ARN antisentido de la enzima ALDH2, proyectando su uso en terapia génica contra el alcoholismo.

Para obtener vectores AAV para uso en pruebas clínicas, aún es necesario desarrollar métodos de producción y purificación simples, escalables y de bajo costo [8].

En este trabajo se definió un método de purificación de vectores AAV, donde con 1 paso de cromatografía se logra obtener el virus con un nivel de pureza suficiente para su uso en laboratorio, pudiendo reemplazar el uso de purificación por gradiente de CsCl, el cual es laborioso, tóxico y no es escalable [38].

Se observó que con esta estrategia de purificación se requiere sobredimensionar la columna, ya que los experimentos indican una capacidad limitada de unión de virus AAV, menor a la reportada. Para la columna QA-1 se estimó una capacidad de unión de virus de $5,2 \times 10^8$ vp/ml para AAV2 y $1,1 \times 10^{11}$ vp/ml para AAV8.

Además, siendo la producción y cultivo de vectores virales una etapa relevante para el escalamiento y reducción de tiempo y costos. Se logró simplificar el método de producción de triple transfección ampliamente usado. Se desarrolló un nuevo método simplificado que utiliza una doble transfección en una línea celular recombinante específica para cada terapia de HEK293F.

Se desarrolló un prototipo del nuevo método propuesto, usando el gen de la proteína GFP como gen de interés. Se logró desarrollar una línea celular HEK293F recombinante, llamada HEK293F_ITRGFP, que contiene uno de los tres elementos esenciales para la producción de vectores AAV. Con esta línea celular fue posible producir virus que contenían el gen GFP, sin embargo los niveles de titulación obtenidos fueron bajos y no se logró determinar su infectividad.

La producción de los vectores AAV fue menor con el nuevo método de producción que con el método convencional, casi 40 y 24 veces menor para AAV2 y AAV8 respectivamente.

No se pudo determinar la infectividad de los vectores virales AAV2 y AAV8 producidos con el nuevo método, obteniendo $4,7 \times 10^4$ ip/ml de AAV2 y $4,1 \times 10^4$ ip/ml de AAV8, estos valores podrían estar en el límite de detección del equipo. Además, estos valores son muy bajos con respecto a la cantidad de virus completos determinados mediante RT-PCR ($2,4 \times 10^8$ vg/ml y $1,8 \times 10^9$ vg/ml para AAV2 y AAV8). Durante la visualización con TEM de los vectores virales producidos, se observó que tenían una estructura correcta y se encontraban intactos, al igual que los vectores virales producidos con el método convencional.

Por lo tanto, para obtener mayores titulaciones, es necesario optimizar el método de producción, modificando distintas variables, donde la proporción correcta de los tres elementos esenciales para la producción de AAV juega un papel fundamental. Además, se propone seleccionar células recombinantes con mayor número de copias que las utilizadas en este trabajo para aumentar la cantidad del elemento que contiene el gen de interés a empacar.

Estos resultados contribuyen a esta área de estudio, tanto para la producción de vectores AAV como para la purificación de vectores AdV5 y AAV. De esta manera, se puede lograr mejorar los costos y reducir los tiempos de producción de vectores virales para su aplicación tanto a nivel de laboratorio como para pruebas clínicas.

Cabe mencionar que con la autorización de la primera terapia génica en Europa, Glybera, ha habido un aumento sostenido de aplicaciones en este campo de investigación. Con este escenario planteado, se abre la necesidad de desarrollar tecnologías de producción escalables y que cumplan con estándares de calidad muy estrictos [16].

Es posible concluir que los resultados obtenidos en el presente estudio entregan procedimientos y métodos de producción y purificación que facilitan la obtención de vectores virales para continuar con los estudios y validaciones de la terapia génica contra el alcoholismo, que ha logrado resultados exitosos en una primera etapa en pruebas pre-clínicas utilizando el vector viral AdV5. Por lo tanto, será posible optimizar los tiempos de producción y purificación tanto de los vectores AdV5 como AAV.

Los resultados obtenidos no se limitan al gen transportado por los vectores virales utilizados en este trabajo, pudiendo ser reemplazado por otro gen terapéutico que cumpla con las características requeridas en tamaño y modo de administración. Por lo que se hace evidente que la tecnología de ARN antisentido puede fácilmente ser reemplazada por la tecnología siRNA que ha sido desarrollada en los últimos años para silenciar la expresión de la enzima ALDH2 [85].

6 BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization, 2014. Global status report on alcohol and health.
2. Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol (SENDA) – Ministerio de Salud, 2016. El Consumo de Alcohol en Chile: Situación Epidemiológica.
3. Popova S., Mohapatra S., Patra J., Duhig A., 2011. A Literature Review of Cost-Benefit Analyses for the Treatment of Alcohol Dependence, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 3351-3364.
4. Ocaranza, P., Quintanilla, M. E., Tampier, L., Karahanian, E., Sapag, A., Israel, Y. 2008. Gene therapy reduces ethanol intake in an animal model of alcohol dependence. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 32, 52-57.
5. Karahanian, E., Ocaranza, P., Israel, Y. 2005. Aldehyde dehydrogenase (ALDH2) activity in hepatoma cells is reduced by an adenoviral vector coding for an ALDH2 antisense mRNA. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 29, 1384-1389.
6. Martinez, V., Gerdtzen, Z. P., Andrews, B. A., Asenjo, J. A. (2010). Viral vectors for the treatment of alcoholism: use of metabolic flux analysis for cell cultivation and vector production. *Metabolic engineering*, 12, 129-137.
7. Wirth, T. y Ylä-Herttua, S., 2014. Gene therapy used in cancer treatment. *Biomedicines*, 149-162.
8. Van der Loo, J. C., Wright, J. F. 2016. Progress and challenges in viral vector manufacturing. *Human molecular genetics*, 25, R42-R52.
9. Kamen, A., Henry, O. 2004. Development and optimization of an adenovirus production process. *The Journal of Gene Medicine*, 6, S184-S192.
10. Atchison R.W., Casto B.C., Hammon W. McD., 1965. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles, *Science*, 754-755.
11. Burova, E., & Ioffe, E. 2005. Chromatographic purification of recombinant adenoviral and adeno-associated viral vectors: methods and implications. *Gene therapy*, 12, S5-S17.
12. Andreadis, S.T., Roth, C.M., Le Doux, J.M., Morgan, J.R., Yarmush, M.L., 1999. Large-Scale Processing of Recombinant Retroviruses for Gene Therapy. *Biotechnology Progress*, 1-11.

13. Schnepf B.C., Jensen R.L., Chen Ch-L, Johnson P. R., Clark K. R., Characterization of Adeno-Associated Virus Genomes Isolated from Human Tissues, *Journal of Virology*, 14793–14803, 2005.
14. Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D. y Naldini, L., 1998. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of Virology*, 8463-8471.
15. Vandendriessche, T., Thorrez, L., Acosta-Sanchez, A., Petrus, I., Wang, L., Ma, L., De Waele, L., Iwasaki, Y., Gillijns, V., Wilson, J.M. y Collen, D., 2007. Efficacy and safety of adeno-associated viral vectors based on serotype 8 and 9 vs. lentiviral vectors for hemophilia B gene therapy. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 16-24.
16. Merten, O.W., Schweizer, M., Chahal, P., Kamen, A.A., 2014. Manufacturing of viral vectors for gene therapy: part I. Upstream processing. *Pharmaceutical Bioprocessing*, 183-203.
17. Stornaiuolo, A., Piovani, B.M., Bossi, S., Zucchelli, E., Corna, S., Salvatori, F., Mavilio, F., Bordignon, C., Rizzardi, G.P. y Bovolenta, C., 2013. RD2-MolPack-Chim3, a packaging cell line for stable production of lentiviral vectors for anti-HIV gene therapy. *Human Gene Therapy Methods*, 228-240.
18. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., Nairn, R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*, 36, 59-72.
19. Grabenhorst E., Schlenke P., Pohl S., Nimtz M., Conradt H.S., 1999. Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells, *Glycoconjugate Journal*, 81-97.
20. Dinnis D.M., James D.C., 2005. Engineering Mammalian Cell Factories for Improved Recombinant Monoclonal Antibody Production: Lessons From Nature?, *Biotechnology and Bioengineering*, 180-189.
21. Suter D.M., Dubois-Dauphin M., Krause K-H., 2006. Genetic engineering of embryonic stem cells, *Swiss Medical Weekly*, 413-415.
22. Wirth, M., Hauser, H., 2008. Genetic Engineering of Animal Cells, en *Biotechnology Set*, Segunda Edición, Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH.
23. Cote J., Garnier A., Massie B., Kamen A., 1998. Serum-Free Production of Recombinant Proteins and Adenoviral Vectors by 293SF-3F6 Cells, *Biotechnology and Bioengineering*, 567-575.
24. To, S.E., Vega, C.P. 2006. Alcoholism and pathways to recovery: new survey results on views and treatment options. *Medscape General Medicine*, 8, 2.

25. Tu, G.C., Israel, Y. 1995. Alcohol consumption by Orientals in North America is predicted largely by a single gene. *Behavior Genetics*, 25, 59–66.
26. Thomasson, H.R., Edenberg, H.J., Crabb, D.W., Mai, X.L. 1991. Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and alcoholism in Chinese men. *The American Journal of Human Genetics*, 48, 677–81.
27. Neumark, Y. D., Friedlander, Y., Durst, R., Leitersdorf, E., Jaffe, D., Ramchandani, V. A. 2004. Alcohol Dehydrogenase Polymorphisms Influence Alcohol- Elimination Rates in a Male Jewish Population. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 28, 10-14.
28. Fuller, R. K., Branchey, L., Brightwell, D. R., Derman, R. M., Emrick, C. D., Iber, F. L., Maany, I. 1986. Disulfiram treatment of alcoholism: a Veterans Administration cooperative study. *Jama*, 25611, 1449-1455.
29. Chick, J., Gough, K., Falkowski, W., Kershaw, P., Hore, B., Mehta, B., ... & Torley, D. 1992. Disulfiram treatment of alcoholism. *The British Journal of Psychiatry*, 161, 84-89.
30. F Fuller, R. K., & Gordis, E. 2004. Does disulfiram have a role in alcoholism treatment today?. *Addiction*, 99, 21-24.
31. Mark, T. L., Kranzler, H. R., Song, X., Bransberger, P., Poole, V. H., & Crosse, S. 2003. Physicians' opinions about medications to treat alcoholism. *Addiction*, 98, 617-626.
32. Quintanilla, M. E., Tampier, L., Valle-Prieto, A., Sapag, A., Israel, Y. 2005. Complex I regulates mutant mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity and voluntary ethanol consumption in rats. *The FASEB journal*, 19, 36-42.
33. Strachan, T., Read, A. 1999. Gene therapy and other molecular genetic-based therapeutic approaches, en: *Human Molecular Genetics*. Wiley-Liss, New York.
34. Danthinne, X., Imperiale, M. J. 2000. Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Therapy*, 720, 1707-1714.
35. Volpers, C., Kochanek, S. 2004. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *The Journal of Gene Medicine*, 6, S164-S171.
36. St George, J. A. 2003. Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene Therapy*, 10, 1135-1141.
37. Qu, G., Bahr-Davidson, J., Prado, J., Tai, A., Cataniag, F., McDonnell, J., Smith, P. 2007. Separation of adeno-associated virus type 2 empty particles from genome containing vectors by anion-exchange column chromatography. *Journal of virological methods*, 140, 183-192.

38. Merten, O. W., Schweizer, M., Chahal, P., Kamen, A. 2014. Manufacturing of viral vectors: part II. Downstream processing and safety aspects. *Pharmaceutical Bioprocessing*, 2, 237-251.
39. Green, A. P., Huang, J. J., Scott, M. O., Kierstead, T. D., Beaupré, I., Gao, G. P., Wilson, J. M. 2002. A new scalable method for the purification of recombinant adenovirus vectors. *Human Gene Therapy*, 13, 1921-1934.
40. Blanche, F., Cameron, B., Barbot, A., Ferrero, L., Guillemin, T., Guyot, S., Bisch, D. 2000. An improved anion-exchange HPLC method for the detection and purification of adenoviral particles. *Gene therapy*, 7, 1055–1062.
41. Whitfield, R. J., Battom, S. E., Barut, M., Gilham, D. E., Ball, P. D. 2009. Rapid high-performance liquid chromatographic analysis of adenovirus type 5 particles with a prototype anion-exchange analytical monolith column. *Journal of Chromatography A*, 1216, 2725-2729.
42. Jungbauer, A., & Hahn, R. 2004. Monoliths for fast bioseparation and bioconversion and their applications in biotechnology. *Journal of separation science*, 27, 767-778.
43. Strancar, A., Podgornik, A., Barut, M., Necina, R. 2002. Short monolithic columns as stationary phases for biochromatography. *Modern Advances in Chromatography*. 76, 49-85.
44. McElrath, M. J., De Rosa, S. C., Moodie, Z., Dubey, S., Kierstead, L., Janes, H., Buchbinder, S. P. 2008. HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. *The Lancet*, 372, 1894-1905.
45. Maizel, J., White, D., Scharff, M. 1968. The Polypeptides of Adenovirus. *Virology*, 36, 115–125.
46. Bollag, D. M., Rozycki, M. D., and Edelstein, S. J., 1996. Preparation for protein isolation. *Protein Methods*. 20-35.
47. Bo, H., Chen, J., Liang, T., Li, S., Shao, H., Huang, S. 2015. Chromatographic purification of adenoviral vectors on anion-exchange resins. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67, 119-125.
48. Wolf, M. W., & Reichl, U. 2011. Downstream processing of cell culture-derived virus particles. *Expert Review of Vaccines*, 10, 1451-1475.
49. Trilisky, E. I., & Lenhoff, A. M. 2007. Sorption processes in ion-exchange chromatography of viruses. *Journal of Chromatography A*, 1142, 2-12.
50. Kramberger, P., Urbas, L., Štrancar, A. 2015. Downstream processing and chromatography based analytical methods for production of vaccines, gene

- therapy vectors, and bacteriophages. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 11, 1010-1021.
51. Peixoto, C., Ferreira, T. B., Carrondo, M. J. T., Cruz, P. E., Alves, P. M. 2006. Purification of adenoviral vectors using expanded bed chromatography. *Journal of Virological Methods*, 132, 121-126.
 52. Merten, O. W., Geny-Fiamma, C., Douar, A. M. 2005. Current issues in adeno-associated viral vector production. *Gene Therapy*, 12, S51-S61.
 53. Samulski, R. J., Chang, L. S., Shenk, T. 1989. Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *Journal of Virology*, 63, 3822-3828.
 54. Xie Q., Bu W., Bhatia S., Hare J., Somasundaram T., Azzi A., Chapman M.S. 2002. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy, *PNAS*, 10405-10410.
 55. Grieger J.C., Choi V.W., Samulski R.J., 2006. Production and characterization of adeno-associated viral vectors, *Nature Protocols*, 1412-1428.
 56. Wu Z., Asokan A., Samulski R.J. 2006. Adeno-associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy, *Molecular Therapy*, 316-327.
 57. Aucoin M.G., Perrier M., Kamen A.A. 2008. Critical assessment of current adeno-associated viral vector production and quantification methods, *Biotechnology Advances*, 73-88.
 58. Durocher Y., Pham P.L., St-Laurent G., Jacob D., Cass B., Chahal P., Lau C.J., Nalbantoglu J., Kamen A. 2007. Scalable serum-free production of recombinant adeno-associated virus type 2 by transfection of 293 suspension cells, *Journal of Virological Method*, 32-40.
 59. Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., Rabinowitz, J.E. 2008. Analysis of AAV serotypes 1–9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Molecular Therapy*, 1073-1080.
 60. Kang W., Wang L., Harrell H., Liu J., Thomas D.L., Mayfield T.L., Scotti M.M., Ye G.J., Veres G., Knop D.R. 2009. An efficient rHSV-based complementation system for the production of multiple rAAV vector serotypes, *Gene Therapy*, 229-239
 61. Thomas D.L., Wang L., Niamke J., Liu J., Kang W., Scotti M.M., Ye G.J., Veres G., Knop D.R. 2009. Scalable Recombinant Adeno-Associated Virus Production Using Recombinant Herpes Simplex Virus Type 1 Coinfection of Suspension-Adapted Mammalian Cells, *Human Gene Therapy*, 861-870.

62. Aslanidi, G., Lamb, K., Zolotukhin, S. 2009. An inducible system for highly efficient production of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors in insect Sf9 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 5059-5064.
63. Chahal P.S., Aucoin M.G., Kamen A. 2007. Primary recovery and chromatographic purification of adeno-associated virus type 2 produced by baculovirus/insect cell system, *Journal of Virology Method*, 61-70.
64. Chadeuf, G., Favre, D., Tessier, J., Provost, N., Nony, P., Kleinschmidt, J., Moullier, P., Salvetti, A. 2000. Efficient recombinant adeno-associated virus production by a stable rep-cap HeLa cell line correlates with adenovirus-induced amplification of the integrated rep-cap genome. *The journal of gene medicine*, 2, 260-268.
65. Gao, G., Qu, G., Burnham, M.S., Huang, J., Chirmule, N., Joshi, B., Yu, Q.C., Marsh, J.A., Conceicao, C.M., Wilson, J.M. 2000. Purification of recombinant adeno-associated virus vectors by column chromatography and its performance in vivo. *Human Gene Therapy*, 11, 2079-2091.
66. Zolotukhin, S., Potter, M., Zolotukhin, I., Sakai, Y., Loiler, S., Fraitess, T.J., Chiodo, V.A., Phillipsberg, T., Muzyczka, N., Hauswirth, W.W. y Flotte, T.R. 2002. Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors. *Methods*, 28, 158-167.
67. Kaludov, N., Handelman, B., Chiorini, J.A. 2002. Scalable purification of adeno-associated virus type 2, 4, or 5 using ion-exchange chromatography. *Human Gene Therapy*, 13, 1235-1243.
68. Brument, N., Morenweiser, R., Blouin, V., Toubanc, E., Raimbaud, I., Chérel, Y., Folliot, S., Gaden, F., Boulanger, P., Kroner-Lux, G., Moullier, P. 2002. A versatile and scalable two-step ion-exchange chromatography process for the purification of recombinant adeno-associated virus serotypes-2 and-5. *Molecular Therapy*, 6, 678.
69. Okada, T., Nonaka-Sarukawa, M., Uchibori, R., Kinoshita, K., Hayashita-Kinoh, H., Nitahara-Kasahara, Y., Takeda, S.I., Ozawa, K. 2009. Scalable purification of adeno-associated virus serotype 1 (AAV1) and AAV8 vectors, using dual ion-exchange adsorptive membranes. *Human Gene Therapy*, 20, 1013-1021.
70. Davidoff, A.M., Ng, C.Y., Sleep, S., Gray, J., Azam, S., Zhao, Y., McIntosh, J.H., Karimipoor, M., Nathwani, A.C. 2004. Purification of recombinant adeno-associated virus type 8 vectors by ion exchange chromatography generates clinical grade vector stock. *Journal of Virological Methods*, 121, 209-215.
71. Smith, R.H., Ding, C., Kotin, R.M. 2003. Serum-free production and column purification of adeno-associated virus type 5. *Journal of Virological Methods*, 114, 115-124.

72. Urabe, M., Xin, K.Q., Obara, Y., Nakakura, T., Mizukami, H., Kume, A., Okuda, K., Ozawa, K. 2006. Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. *Molecular Therapy*, 13, 823-828.
73. Potter, M., Lins, B., Mietzsch, M., Heilbronn, R., Van Vliet, K., Chipman, P., Agbandje-McKenna, M., Cleaver, B.D., Clément, N., Byrne, B.J., Zolotukhin, S. 2014. A simplified purification protocol for recombinant adeno-associated virus vectors. *Molecular Therapy, Methods & Clinical Development*, 1.
74. Qu, G., Bahr-Davidson, J., Prado, J., Tai, A., Cataniag, F., McDonnell, J., Zhou, J., Hauck, B., Luna, J., Sommer, J.M., Smith, P. 2007. Separation of adeno-associated virus type 2 empty particles from genome containing vectors by anion-exchange column chromatography. *Journal of Virological Methods*, 183-192.
75. Lock, M., Alvira, M.R., Wilson, J.M. 2012. Analysis of particle content of recombinant adeno-associated virus serotype 8 vectors by ion-exchange chromatography. *Human Gene Therapy, Part B: Methods*, 23, 56-64.
76. Clément, N., Grieger, J.C. 2016. Manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors for clinical trials. *Molecular therapy. Methods & Clinical Development*, 3, 16002.
77. Transfiguracion, J., Bernier, A., Arcand, N., Chahal, P., Kamen, A. 2001. Validation of a high-performance liquid chromatographic assay for the quantification of adenovirus type 5 particles. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 187-194.
78. Transfiguracion, J., Jaalouk, D. E., Ghani, K., Galipeau, J., Kamen, A. 2003. Size-exclusion chromatography purification of high-titer vesicular stomatitis virus G glycoprotein-pseudotyped retrovectors for cell and gene therapy applications. *Human Gene Therapy*, 1139-1153.
79. Wu, Z., Asokan, A., Samulski, R. J. 2006. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Molecular Therapy*, 14, 316-327.
80. Clark, K. R. 2002. Recent advances in recombinant adeno-associated virus vector production. *Kidney International*, 61, S9-S15.
81. Gao, G. P., Qu, G., Faust, L. Z., Engdahl, R. K., Xiao, W., Hughes, J. V., Zoltick P., Wilson, J. M. 1998. High-titer adeno-associated viral vectors from a Rep/Cap cell line and hybrid shuttle virus. *Human Gene Therapy*, 9, 2353-2362.
82. Qiao, C., Wang, B., Zhu, X., Li, J., Xiao, X. 2002. A novel gene expression control system and its use in stable, high-titer 293 cell-based adeno-associated virus packaging cell lines. *Journal of Virology*, 76, 13015-13027.

83. Yuan, Z., Qiao, C., Hu, P., Li, J., Xiao, X. 2010. A versatile adeno-associated virus vector producer cell line method for scalable vector production of different serotypes. *Human Gene Therapy*, 22, 613-624.
84. Yang, Q., Chen, F., Trempe, J. P. 1994. Characterization of cell lines that inducibly express the adeno-associated virus Rep proteins. *Journal of virology*, 68, 4847-4856.
85. Schmidt, M., Afione, S., Kotin, R. M. 2000. Adeno-associated virus type 2 Rep78 induces apoptosis through caspase activation independently of p53. *Journal of virology*, 74, 9441-9450.
86. Barde, I., Salmon, P., Trono, D. 2010. Production and titration of lentiviral vectors. *Current protocols in neuroscience*, 4-21.
87. Cortínez, G., Sapag, A., Israel, Y. (2009). RNA interference against aldehyde dehydrogenase-2: development of tools for alcohol research. *Alcohol*, 43(2), 97-104.

7 ANEXOS

7.1 ANEXO I: Perfiles de elución y área de peaks para AAV y scAAV

- I- Perfiles de Elución de cromatografía de intercambio aniónico con columna monolítica CIM QA-1 para purificación de los vectores virales AAV2 y scAA2

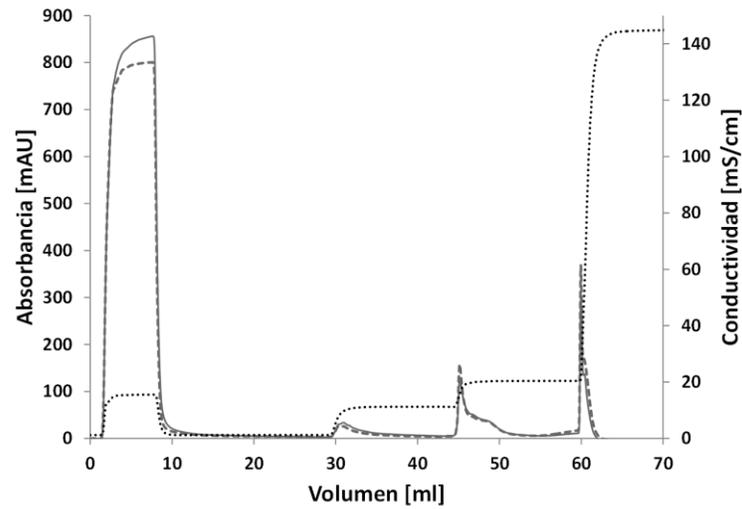


Figura 24: Perfil de elución purificación de AAV2_antiAldh2 por cromatografía de intercambio aniónico con columna monolítica CIM QA-1. La línea continua muestra la absorbancia a 260 nm, la línea segmentada muestra la absorbancia a 280 nm y la línea punteada muestra la conductividad de la fase móvil.

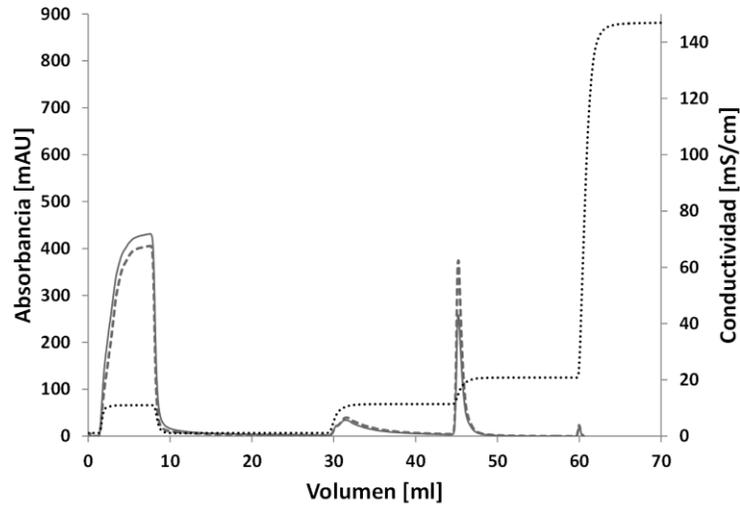


Figura 25: Perfil de elución purificación del Flow Through de la cromatografía de AAV2_antiAldh2. La línea continua muestra la absorbancia a 260 nm, la línea segmentada muestra la absorbancia a 280 nm y la línea punteada muestra la conductividad de la fase móvil.

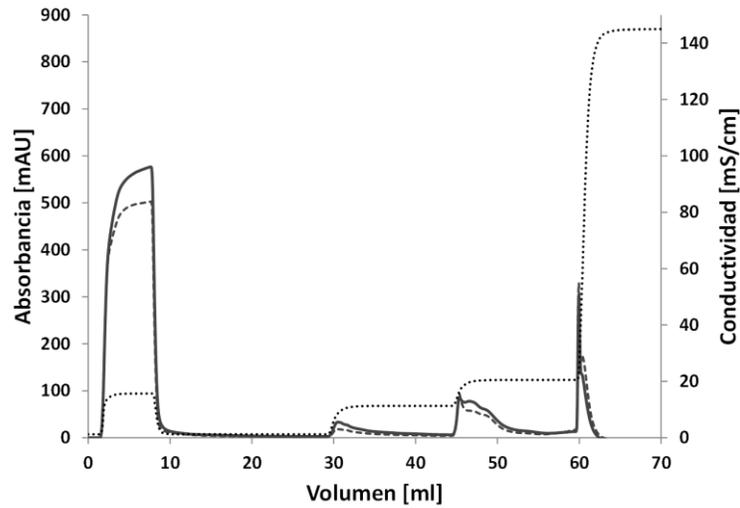


Figura 26: Perfil de elución purificación de sCAAV2_antiAldh2 por cromatografía de intercambio aniónico con columna monolítica CIM QA-1. La línea continua muestra la absorbancia a 260 nm, la línea segmentada muestra la absorbancia a 280 nm y la línea punteada muestra la conductividad de la fase móvil.

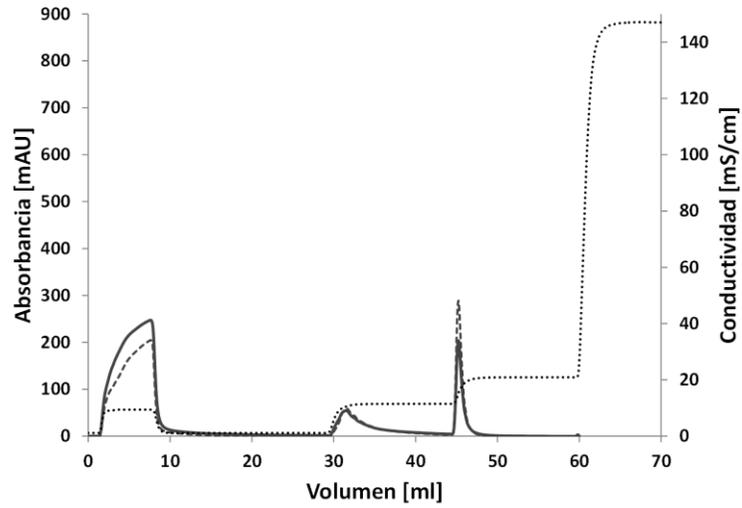


Figura 27: Perfil de elución purificación del Flow Through de la cromatografía de scAAV2_antiAldh2. La línea continua muestra la absorbancia a 260 nm, la línea segmentada muestra la absorbancia a 280 nm y la línea punteada muestra la conductividad de la fase móvil.

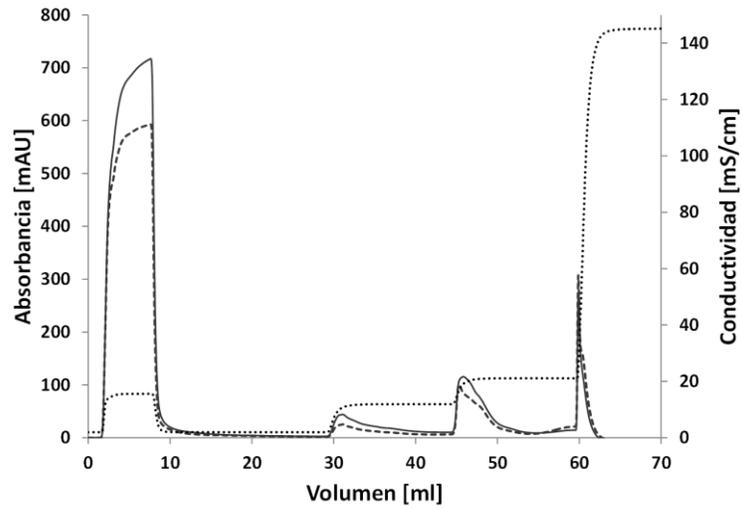


Figura 28: Perfil de elución purificación de scAAV2_GFP por cromatografía de intercambio aniónico con columna monolítica CIM QA-1. La línea continua muestra la absorbancia a 260 nm, la línea segmentada muestra la absorbancia a 280 nm y la línea punteada muestra la conductividad de la fase móvil.

II- Perfiles de Elución de cromatografía de intercambio aniónico con columna monolítica CIM QA-1 para purificación de los vectores virales AAV8 y scAA8

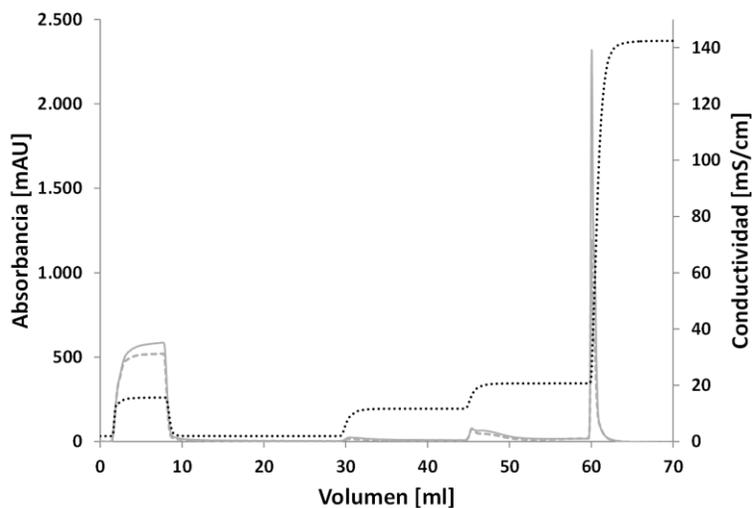


Figura 29: Perfil de elución purificación de AAV8_antiAldh2 por cromatografía de intercambio aniónico con columna monolítica CIM QA-1. La línea continua muestra la absorbancia a 260 nm, la línea segmentada muestra la absorbancia a 280 nm y la línea punteada muestra la conductividad de la fase móvil.

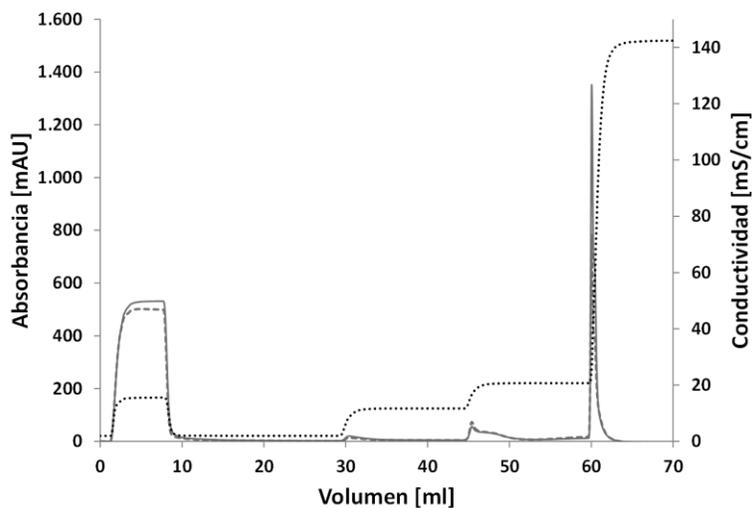


Figura 30: Perfil de elución purificación de scAAV8_antiAldh2 por cromatografía de intercambio aniónico con columna monolítica CIM QA-1. La línea continua muestra la absorbancia a 260 nm, la línea segmentada muestra la absorbancia a 280 nm y la línea punteada muestra la conductividad de la fase móvil.

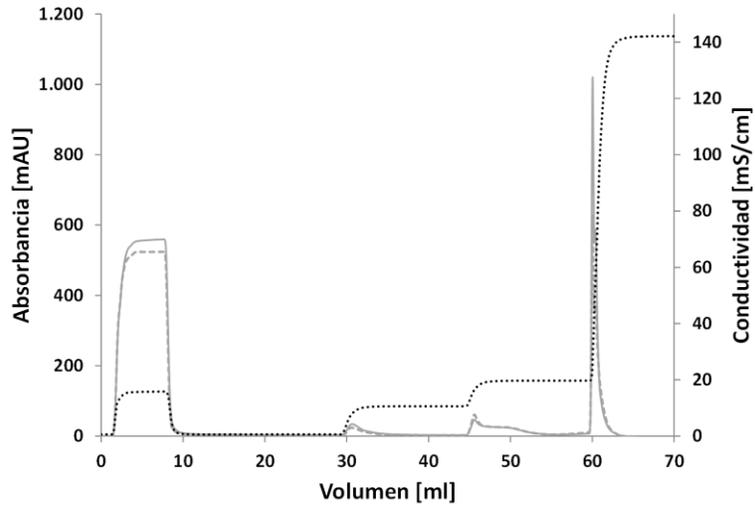


Figura 31: Perfil de elución purificación de sCAAV8_GFP por cromatografía de intercambio aniónico con columna monolítica CIM QA-1. La línea continua muestra la absorbancia a 260 nm, la línea segmentada muestra la absorbancia a 280 nm y la línea punteada muestra la conductividad de la fase móvil.

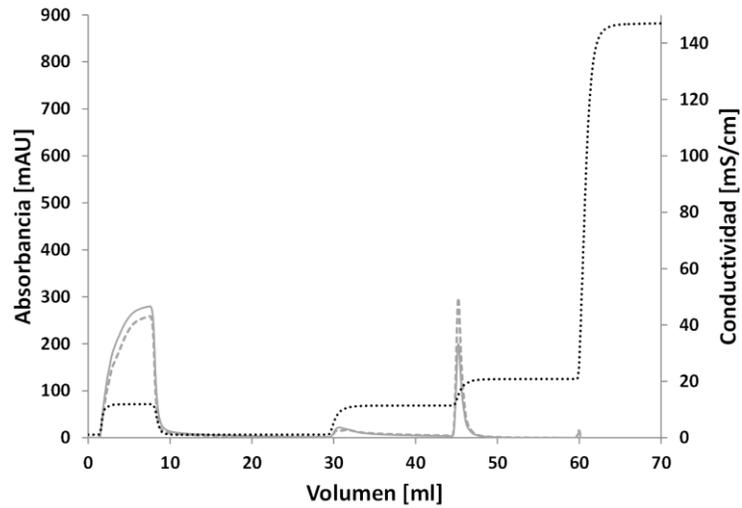


Figura 32: Perfil de elución purificación del Flow Through de la cromatografía de sCAAV8_GFP. La línea continua muestra la absorbancia a 260 nm, la línea segmentada muestra la absorbancia a 280 nm y la línea punteada muestra la conductividad de la fase móvil.

III- Valores de las áreas de los peaks de elución de cada cromatografía

Tabla 2: Áreas de los peak de elución de las cromatografías de intercambio aniónico para purificar AAV serotipos 2 y 8

N°	Vector Viral	Corrida	Fracción	Volumen Inicial	Volumen Final	Delta	Área 260 nm	Área 280 nm	Razón 260/280
			ml	ml	ml	ml	mAU ml	mAU ml	
1	AA2-antiAldh2	1	Total eluido	0,0	62	62	5.997	5.730	1,0
			FT	0,0	10,0	10,0	4.594	4.392	1,0
			15	44,6	45,9	1,3	105	118	0,9
			26	59,6	61,6	2,1	189	253	0,7
		FT de 1	Carga	0,0	6,5	6,5	2.986	2.855	1,0
			Total eluido	0,0	62	62,0	2.943	2.794	1,1
			FT	0,0	10	10,0	2.068	1.864	1,1
			FT fracción 15	44,4	47,14	2,8	227	321	0,7
2	scAA2-antiAldh2	1	Total eluido	0,0	62	62,0	4.282	3.793	1,1
			FT	0,0	10	10,0	3.298	2.927	1,1
			27	59,4	62,27	2,8	214	283	0,8
		FT de 1	Carga	0,0	6,50	6,5	2.144	1.903	1,1
			Total eluido	0,0	62,00	62,0	1.848	1.524	1,2
			Pegado en columna				296	379	0,8
			FT	0,0	10,0	10,0	1.317	1.000	1,3
			FT fracción 15	44,6	47,0	2,4	185	252	0,7
3	scAA2-GFP	1	Total eluido	0,0	62,0	62,0	5.099	4.301	1,1
			FT	0,0	10,0	10,0	3.948	3.347	1,1
			16,17,18,19,20	44,0	52,3	8,3	805	349	0,8
			26	59,3	61,8	2,6	210	264	0,8
4	AA8-antiAldh2	1	Total eluido	0,0	62,0	62,0	5.386	4.377	1,2
			FT	0,0	10,0	10,0	3.469	3.137	1,1
			27	59,4	61,3	1,9	1.137	650	1,7
5	scAA8-antiAldh2	1	Total eluido	0,0	62,0	62,0	4.452	4.028	1,1
			FT	0,0	10,0	10,0	3.272	3.091	1,1
			27	59,7	61,4	1,7	704	467	1,5
6	scAA8-GFP	1	Total eluido	0,0	62,0	62,0	4.339	3.981	1,1
			FT	0,0	10,0	10,0	3.390	3.190	1,1
			16	44,9	46,3	1,4	50	61	0,8
			27	59,6	61,4	1,8	601	449	1,3
		FT de 1	Carga	0,0	6,5	6,5	2.203	2.074	1,1
			Total eluido	0,0	62,0	62,0	1.712	1.598	1,1
			Pegado en columna				491	476	1,0
			FT	0,0	10,0	10,0	1.534	1.346	1,1
			FT fracción 15	44,4	46,9	2,5	171	250	0,7

7.2 ANEXO II: Geles SDS-PAGE de las fracciones eluidas de cromatografías de AAV

I- Fotografías de geles SDS-PAGE teñidos con Azul Comassie y Nitrato de Plata

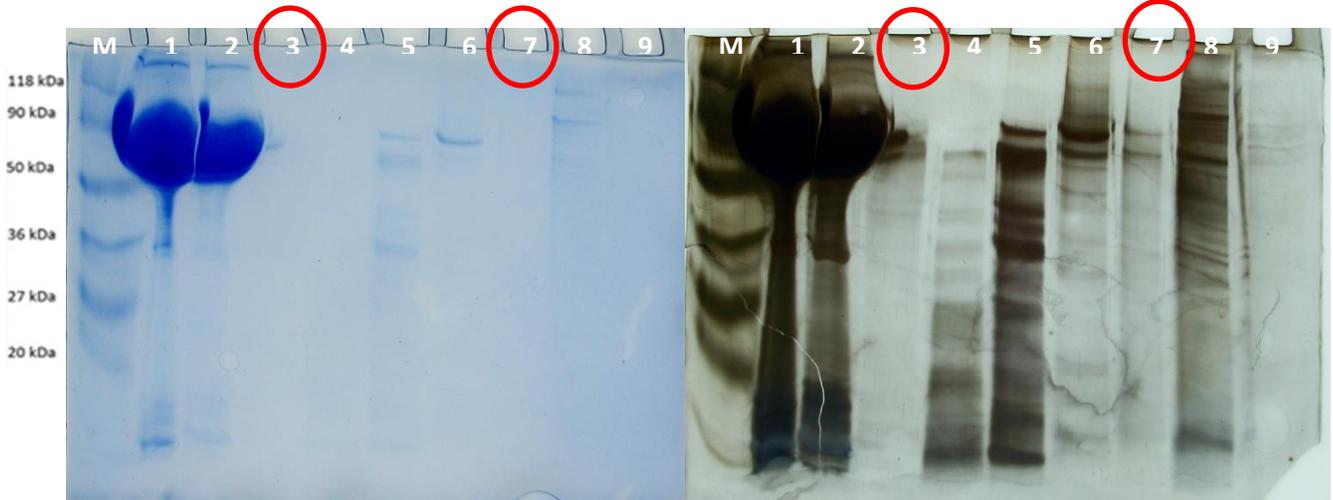


Figura 33: Gel 1 SDS-Page de fracciones eluidas en purificación de AAV2_antiAldh2. A) Tinción Azul Comassie, B) Tinción nitrato de plata. M: Marcador de peso molecular, 1: Crudo AAV2, 2: FT AAV2; 3: Peak 15A AAV2; 4: Peak 26A AAV2; 5: Peak 5A AAV2; 6: Peak 6A AAV2; 7: Peak 27A AAV2; 8: Peak 16A AAV2; 9: Peak 17A AAV2.

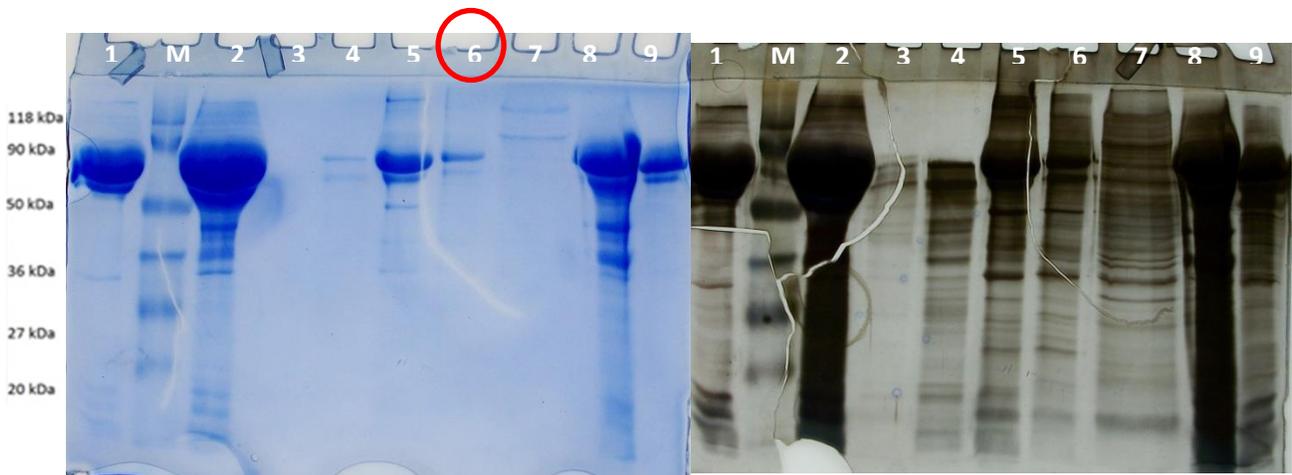


Figura 34: Gel 2 SDS-Page de fracciones eluidas en purificación de AAV2_antiAldh2 y scAAV2_antiAldh2. A) Tinción Azul Comassie, B) Tinción nitrato de plata. M: Marcador de peso molecular, 1: FT AAV2(II), 2: Crudo AAV2(II) 3: Peak 5B; 4: Peak 6B; 5: Peak 27B; 6: peak 17B; 7: Peak 16B; 8: Crudo scAAV2; 9: FT scAAV2.

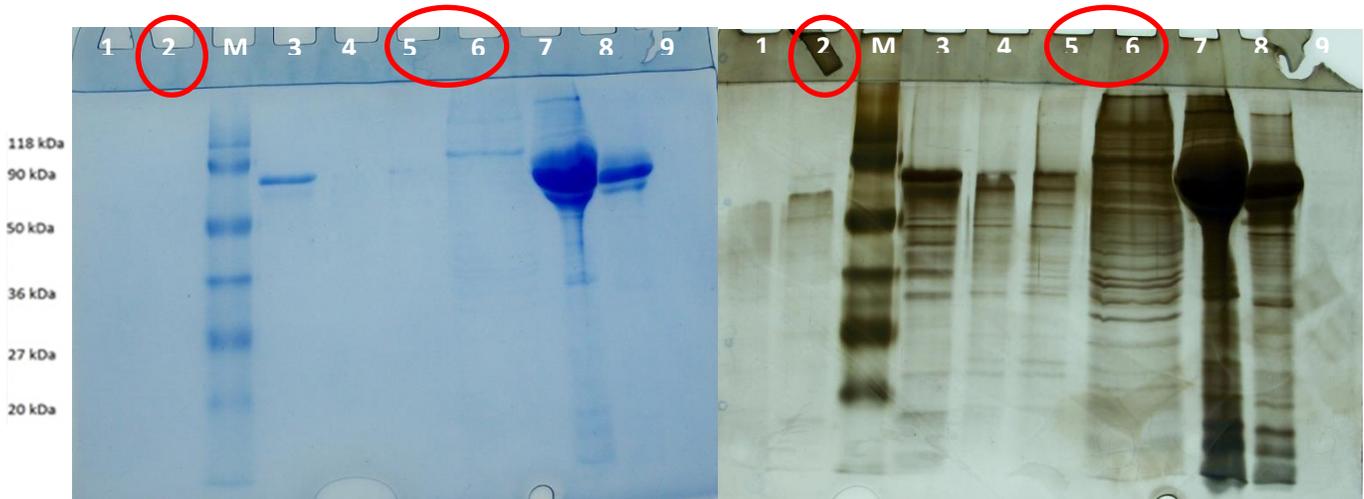


Figura 35: Gel 3 SDS-Page de fracciones eluidas en purificación de scAAV2_antiAldh2 y scAAV2_GFP. A) Tinción Azul Comassie, B) Tinción nitrato de plata. M: Marcador de peso molecular, 1:Peak 27D scAAV2, 2: Peak 16D scAAV2 3: Peak 5D scAAV2; 4: Peak 6D scAAV2; 5: Peak 17D scAAV2; 6: peak 18D scAAV2; 7: Crudo scAAV2_GFP; 8: FT scAAV2_GFP; 9: Peak 5E scAAV2_GFP.



Figura 36: Gel 4 SDS-Page de fracciones eluidas en purificación de scAAV2_GFP y AAV8_antiAldh2. A) Tinción Azul Comassie, B) Tinción nitrato de plata. M: Marcador de peso molecular, 1:Peak 6E scAAV2_GFP, 2: Peak 16E scAAV2_GFP; 3: Peak 17E scAAV2_GFP; 4: Peak 18E scAAV2_GFP; 5: Peak 27E scAAV2_GFP; 6: Crudo AAV8; 7: FT AAV8; 8:Peak 5 AAV8; 9: Peak 6 AAV8.

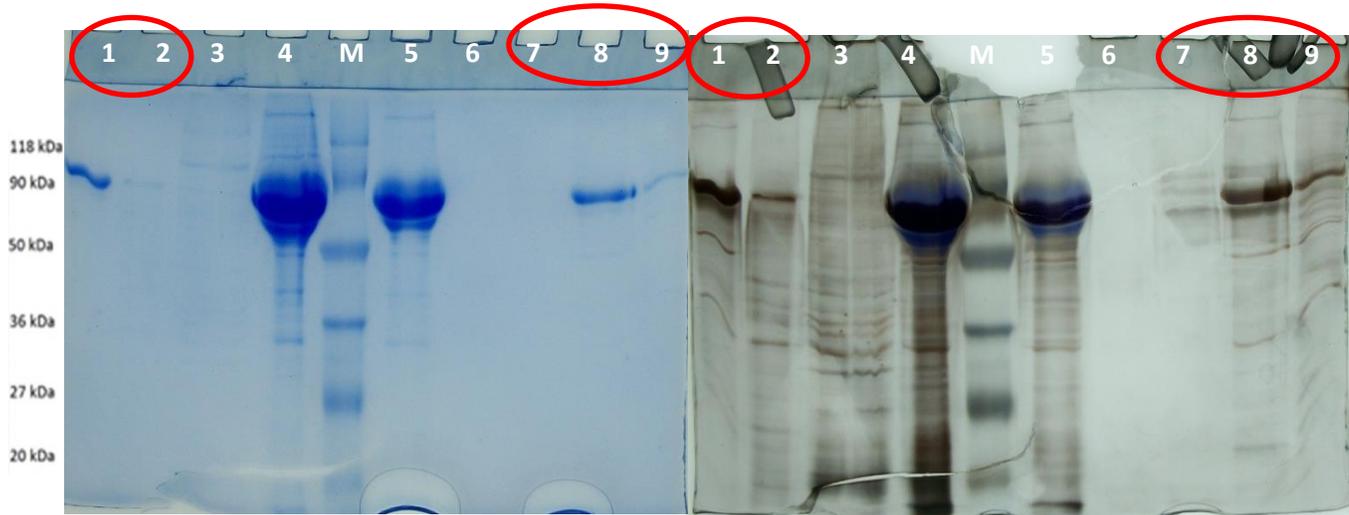


Figura 37: Gel 5 SDS-Page de fracciones eluidas en purificación de AAV8_antiAldh2 y scAAV_antiAldh2. A) Tinción Azul Comassie, B) Tinción nitrato de plata. M: Marcador de peso; 1:Peak 16E AAV8; 2: Peak 17 AAV8; 3: Peak 27 AAV8; 4: Crudo scAAV8_antiAldh2; 5: FT scAAV8_antiAldh2; 6: Peak 5 scAAV8_antiAldh2; 7: Peak 16 scAAV8_antiAldh2; 8:Peak 17 scAAV8_antiAldh2; 9: Peak 18 scAAV8_antiAldh2.

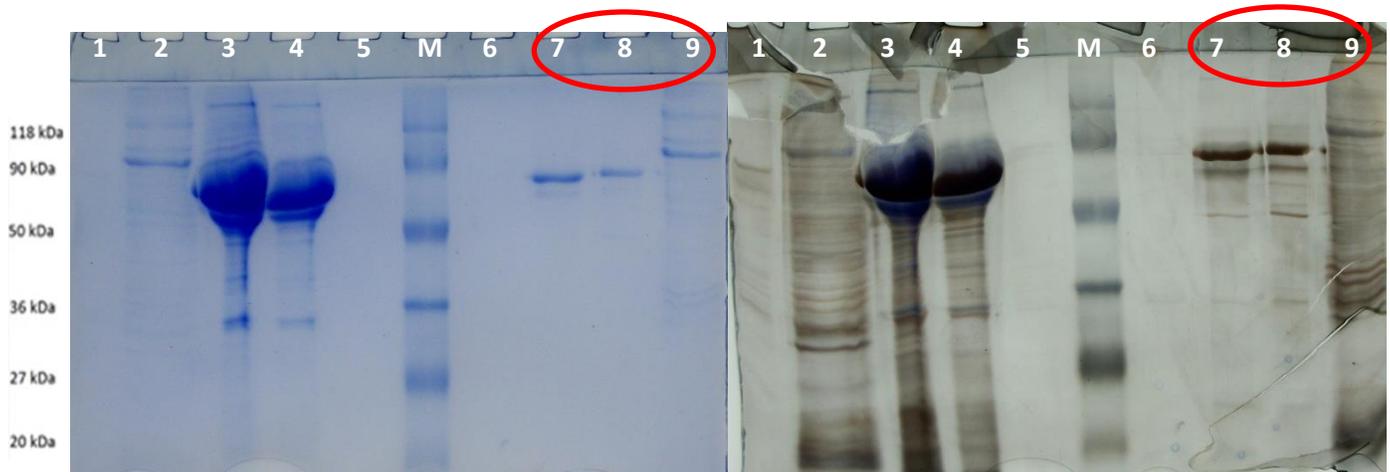


Figura 38: Gel 6 SDS-Page de fracciones eluidas en purificación de scAAV8_antiAldh2 y scAAV8_GFP. A) Tinción Azul Comassie, B) Tinción nitrato de plata. M: Marcador de peso molecular; 1:Peak 27 scAAV8_antiAldh2; 2: Peak 28 scAAV8_antiAldh2; 3: Crudo scAAV8_GFP; 4: FT scAAV8_GFP; 5: Peak 5 scAAV8_GFP; 6: Peak 6 scAAV8_GFP; 7: Peak 16 scAAV8_GFP; 8:Peak 17 scAAV8_GFP; 9: Peak 27 scAAV8_GFP.

7.3 ANEXO III: Datos y Cálculos de cuantificación con RT-PCR de cromatografía de intercambio aniónico para purificación de AAV y scAAV

Tabla 3: Valores de Cq de RT-PCR de las fracciones eluidas en la purificación de AAV2, AAV8, scAAV2 y scAAV8

N°	Nombre Muestra	Cq	Quantity	Dilución	Cantidad extraída (50 ul)	Cantidad para extraer (200 ul)	Vol. (ml)	Partículas virales (vp)	Prom. (vp)	Porcent. (%)
1	Crudo AAV2	10,4	6,1E+07	6,1E+07	1,2E+09	1,2E+09	6,5	4,0E+10	3,2E+10	100%
2	Crudo AAV2	11,1	3,8E+07	3,8E+07	7,6E+08	7,6E+08	6,5	2,5E+10		
3	FT AAV2	11,8	2,5E+07	2,5E+07	5,1E+08	5,1E+08	10,0	2,5E+10	2,6E+10	80%
4	FT AAV2	11,7	2,6E+07	2,6E+07	5,3E+08	5,3E+08	10,0	2,6E+10		
5	Fracción 15A AAV2	16,0	1,7E+06	1,7E+06	3,5E+07	3,5E+07	1,5	2,6E+08	2,8E+08	0,87%
6	Fracción 15A AAV2	15,7	2,0E+06	2,0E+06	4,0E+07	4,0E+07	1,5	3,0E+08		
7	Fracción 16A AAV2	26,7	1,8E+03	1,8E+03	3,6E+04	3,6E+04	1,5	2,7E+05	4,6E+07	0,14%
8	Fracción 16A AAV2	17,6	6,1E+05	6,1E+05	1,2E+07	1,2E+07	1,5	9,1E+07		
9	Fracción 17A AAV2	19,2	2,1E+05	2,1E+05	4,3E+06	4,3E+06	1,5	3,2E+07	3,1E+07	0,10%
10	Fracción 17A AAV2	19,3	2,0E+05	2,0E+05	4,1E+06	4,1E+06	1,5	3,1E+07		
11	Fracción 26A AAV2	16,0	1,7E+06	1,7E+06	3,5E+07	3,5E+07	1,5	2,6E+08	2,5E+08	0,76%
12	Fracción 26A AAV2	16,2	1,5E+06	1,5E+06	3,1E+07	3,1E+07	1,5	2,3E+08		
13	Fracción 27A AAV2	19,8	1,5E+05	1,5E+05	3,1E+06	3,1E+06	1,5	2,3E+07	2,4E+07	0,07%
14	Fracción 27A AAV2	19,6	1,6E+05	1,6E+05	3,3E+06	3,3E+06	1,5	2,5E+07		
15	Crudo scAAV2	16,7	1,1E+06	1,1E+06	2,1E+07	2,1E+07	6,5	6,9E+08	7,8E+08	100%
16	Crudo scAAV2	16,4	1,3E+06	1,3E+06	2,7E+07	2,7E+07	6,5	8,7E+08		
17	FT scAAV2	No amplificó			0,0E+00	0,0E+00	10,0			
18	FT scAAV2	No amplificó			0,0E+00	0,0E+00	10,0			
19	Fracción 16D scAAV2	21,6	4,6E+04	4,6E+04	9,2E+05	9,2E+05	1,5	6,9E+06	6,8E+06	0,88%
20	Fracción 16D scAAV2	21,7	4,5E+04	4,5E+04	9,0E+05	9,0E+05	1,5	6,7E+06		
21	Fracción 17D scAAV2	24,1	9,3E+03	9,3E+03	1,9E+05	1,9E+05	1,5	1,4E+06	1,5E+06	0,20%
22	Fracción 17D scAAV2	23,8	1,1E+04	1,1E+04	2,2E+05	2,2E+05	1,5	1,7E+06		
23	Fracción 18D scAAV2	23,6	1,3E+04	1,3E+04	2,6E+05	2,6E+05	1,5	1,9E+06	2,1E+06	0,26%
24	Fracción 18D scAAV2	23,4	1,5E+04	1,5E+04	2,9E+05	2,9E+05	1,5	2,2E+06		
25	Fracción 27D scAAV2	20,0	1,3E+05	1,3E+05	2,6E+06	2,6E+06	1,5	2,0E+07	2,0E+07	2,52%
26	Fracción 27D scAAV2	20,0	1,3E+05	1,3E+05	2,6E+06	2,6E+06	1,5	2,0E+07		
27	Crudo scAAV2_GFP	16,8	1,0E+06	1,0E+06	2,0E+07	2,0E+07	6,5	6,6E+08	5,5E+08	100,00%
28	Crudo scAAV2_GFP	17,4	6,7E+05	6,7E+05	1,3E+07	1,3E+07	6,5	4,4E+08		
29	FTAV2_GFP	17,1	8,6E+05	8,6E+05	1,7E+07	1,7E+07	10,0	8,6E+08	8,1E+08	149,03%
30	FTAV2_GFP	17,2	7,7E+05	7,7E+05	1,5E+07	1,5E+07	10,0	7,7E+08		
31	Fracción 16E scAAV2_GFP	24,6	6,8E+03	6,8E+03	1,4E+05	1,4E+05	1,5	1,0E+06	8,2E+05	0,15%

32	Fracción 16E scAAV2_GFP	25,4	4,2E+03	4,2E+03	8,5E+04	8,5E+04	1,5	6,3E+05		
33	Fracción 17E scAAV2_GFP	24,1	9,5E+03	9,5E+03	1,9E+05	1,9E+05	1,5	1,4E+06	1,3E+06	0,24%
34	Fracción 17E scAAV2_GFP	24,3	8,2E+03	8,2E+03	1,6E+05	1,6E+05	1,5	1,2E+06		
35	Fracción 18E scAAV2_GFP	24,7	6,3E+03	6,3E+03	1,3E+05	1,3E+05	1,5	9,4E+05	9,8E+05	0,18%
36	Fracción 18E scAAV2_GFP	24,6	6,8E+03	6,8E+03	1,4E+05	1,4E+05	1,5	1,0E+06		
37	Fracción 26E scAAV2_GFP	24,9	5,5E+03	5,5E+03	1,1E+05	1,1E+05	1,5	8,3E+05	8,32E+05	0,15%
38	Crudo AVV8	No amplificó					6,5		1,9E+12	100%
39	Crudo AVV8	6,2	8,9E+08	8,9E+08	1,8E+10	1,8E+10	6,5	5,8E+11		
40	Crudo AVV8/10	8,1	2,7E+08	2,7E+09	5,4E+10	5,4E+10	6,5	1,8E+12		
41	Crudo AVV8/10	8,2	2,5E+08	2,5E+09	5,1E+10	5,1E+10	6,5	1,7E+12		
42	Crudo AAV8/100	11,1	3,9E+07	3,9E+09	7,8E+10	7,8E+10	6,5	2,5E+12		
43	Crudo AAV8/100	11,0	4,3E+07	4,3E+09	8,5E+10	8,5E+10	6,5	2,8E+12		
44	FT AVV8	5,7	1,3E+09	1,3E+09	2,6E+10	2,6E+10	10,0	1,3E+12	1,3E+12	71%
45	FT AVV8	5,6	1,4E+09	1,4E+09	2,7E+10	2,7E+10	10,0	1,4E+12		
46	Fracción 16 AAV8	11,6	2,8E+07	2,8E+07	5,7E+08	5,7E+08	1,5	4,3E+09	3,9E+09	0,21%
47	Fracción 16 AAV8	11,9	2,4E+07	2,4E+07	4,7E+08	4,7E+08	1,5	3,6E+09		
48	Fracción 17 AAV8	12,0	2,2E+07	2,2E+07	4,3E+08	4,3E+08	1,5	3,2E+09	2,7E+09	0,15%
49	Fracción 17 AAV8	12,6	1,5E+07	1,5E+07	2,9E+08	2,9E+08	1,5	2,2E+09		
50	Fracción 27 AAV8	6,8	6,4E+08	6,4E+08	1,3E+10	1,3E+10	1,5	9,6E+10	9,9E+10	5,31%
51	Fracción 27 AAV8	6,7	6,8E+08	6,8E+08	1,4E+10	1,4E+10	1,5	1,0E+11		
52	Crudo scAAV8	6,6	7,0E+08	7,0E+08	1,4E+10	1,4E+10	6,5	4,5E+11	4,2E+11	100%
53	Crudo scAAV8	6,8	6,1E+08	6,1E+08	1,2E+10	1,2E+10	6,5	4,0E+11		
54	Crudo scAAV8/10	10,9	4,4E+07	4,4E+08	8,8E+09	8,8E+09	6,5	2,9E+11		
55	Crudo scAAV8/10	10,9	4,3E+07	4,3E+08	8,7E+09	8,7E+09	6,5	2,8E+11		
56	Crudo scAAV8/100	13,5	8,7E+06	8,7E+08	1,7E+10	1,7E+10	6,5	5,7E+11		
57	Crudo scAAV8/100	13,5	8,5E+06	8,5E+08	1,7E+10	1,7E+10	6,5	5,5E+11		
58	FT scAAV8	17,0	9,1E+05	9,1E+05	1,8E+07	1,8E+07	10,0	9,1E+08	8,2E+08	0,19%
59	FT scAAV8	17,3	7,3E+05	7,3E+05	1,5E+07	1,5E+07	10,0	7,3E+08		
60	Fracción 16 scAAV8	13,2	1,0E+07	1,0E+07	2,0E+08	2,0E+08	1,5	1,5E+09	1,4E+09	0,34%
61	Fracción 16 scAAV8	13,4	8,9E+06	8,9E+06	1,8E+08	1,8E+08	1,5	1,3E+09		
62	Fracción 17 scAAV8	13,7	7,4E+06	7,4E+06	1,5E+08	1,5E+08	1,5	1,1E+09	1,0E+09	0,24%
63	Fracción 17 scAAV8	14,0	6,2E+06	6,2E+06	1,2E+08	1,2E+08	1,5	9,3E+08		
64	Fracción 18 scAAV8	15,1	3,0E+06	3,0E+06	6,1E+07	6,1E+07	1,5	4,6E+08	4,7E+08	0,11%
65	Fracción 18 scAAV8	15,0	3,2E+06	3,2E+06	6,3E+07	6,3E+07	1,5	4,7E+08		
66	Fracción 27 scAAV8	6,7	6,7E+08	6,7E+08	1,3E+10	1,3E+10	1,5	1,0E+11	1,0E+11	24,61%
67	Fracción 27 scAAV8	6,6	7,1E+08	7,1E+08	1,4E+10	1,4E+10	1,5	1,1E+11		

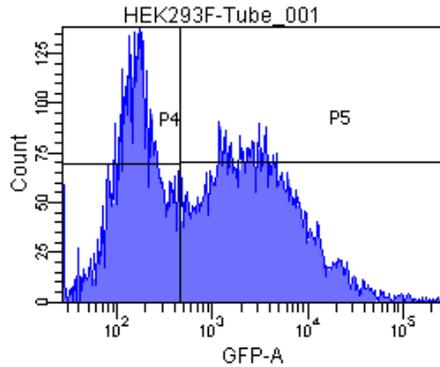
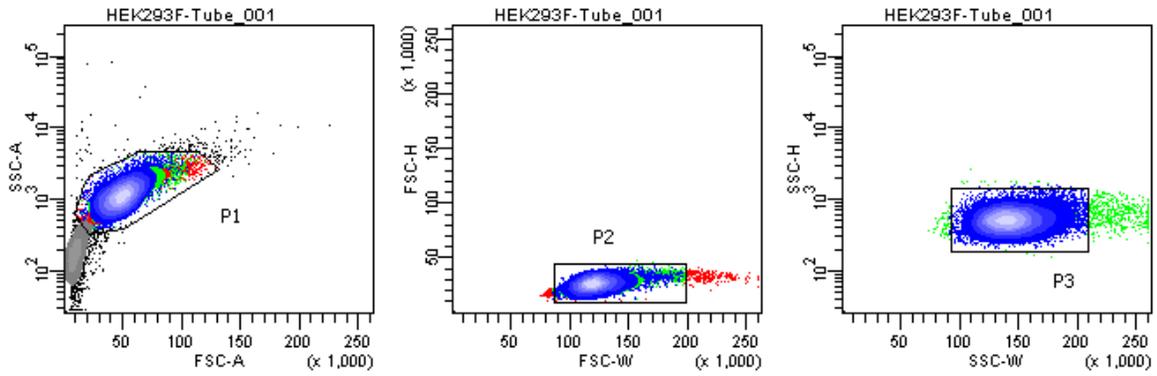
68	Crudo scAAV8_GFP	8,3	2,4E+08	2,4E+08	4,8E+09	4,8E+09	6,5	1,6E+11	1,7E+11	100%
69	Crudo scAAV8_GFP	7,7	3,5E+08	3,5E+08	7,0E+09	7,0E+09	6,5	2,3E+11		
70	Crudo scAAV8_GFP Dil 1/10	11,6	2,9E+07	2,9E+08	5,8E+09	5,8E+09	6,5	1,9E+11		
71	Crudo scAAV8_GFP Dil 1/10	11,6	2,8E+07	2,8E+08	5,6E+09	5,6E+09	6,5	1,8E+11		
72	Crudo scAAV8_GFP Dil 1/100	16,6	1,2E+06	1,2E+08	2,3E+09	2,3E+09	6,5	7,5E+10		
73	Crudo scAAV8_GFP Dil 1/100						6,5			
74	FT scAAV8_GFP	16,5	1,3E+06	1,3E+06	2,5E+07	2,5E+07	10,0	1,3E+09	1,2E+09	0,73%
75	FT scAAV8_GFP	16,6	1,2E+06	1,2E+06	2,3E+07	2,3E+07	10,0	1,2E+09		
76	Fracción 16 scAAV8_GFP	16,3	1,4E+06	1,4E+06	2,9E+07	2,9E+07	1,5	2,1E+08	3,1E+08	0,19%
77	Fracción 16 scAAV8_GFP	15,3	2,7E+06	2,7E+06	5,4E+07	5,4E+07	1,5	4,1E+08		
78	Fracción 17 scAAV8_GFP	15,9	1,8E+06	1,8E+06	3,6E+07	3,6E+07	1,5	2,7E+08	2,7E+08	0,16%
79	Fracción 17 scAAV8_GFP	16,0	1,7E+06	1,7E+06	3,5E+07	3,5E+07	1,5	2,6E+08		
80	Fracción 18 scAAV8_GFP	19,2	2,2E+05	2,2E+05	4,4E+06	4,4E+06	1,5	3,3E+07	3,2E+07	0,02%
81	Fracción 18 scAAV8_GFP	19,3	2,1E+05	2,1E+05	4,1E+06	4,1E+06	1,5	3,1E+07		
82	Fracción 27 scAAV8_GFP	9,5	1,1E+08	1,1E+08	2,1E+09	2,1E+09	1,5	1,6E+10	1,7E+10	10%
83	Fracción 27 scAAV8_GFP	9,3	1,2E+08	1,2E+08	2,4E+09	2,4E+09	1,5	1,8E+10		

7.4 Anexo IV: Resultados de Citometría de Flujo entregados por el Servicio del Laboratorio de Inmunología de la Universidad de Chile

En las siguientes figuras se entregan los resultados de la citometría de flujo de infección de HEK293F con distintas diluciones de los vectores virales AAV2 producidos. En la Tabla 4 se detalla lo que corresponde a cada tubo indicado en los resultados de citometría de flujo.

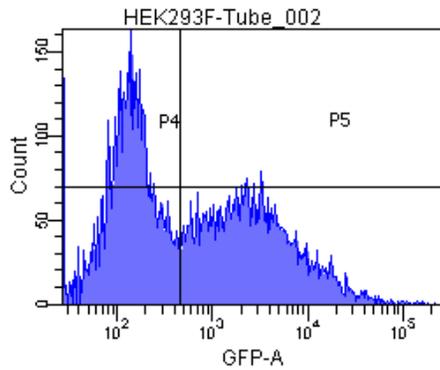
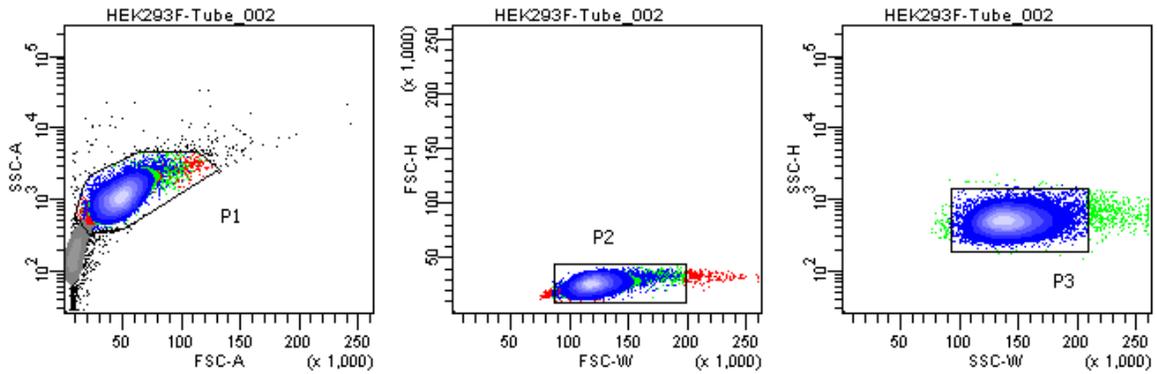
Tabla 4: Descripción de los tratamientos de infección con AAV2 en HEK293F realizados en cada muestra analizada por citometría de flujo

Tubo	Tratamiento	Línea celular	Proteína	Producción
1	Dilución 10E-1 de AAVR2	HEK293F	eGFP	Prod. Standard
2	Dilución 2x10E-2 de AAVR2	HEK293F	eGFP	Prod. Standard
3	Dilución 4x10E-3 de AAVR2	HEK293F	eGFP	Prod. Standard
4	Dilución 8x10E-4 de AAVR2	HEK293F	eGFP	Prod. Standard
5	Dilución 1,6x10E-5 de AAVR2	HEK293F	Nada	Prod. Standard
6	Control Negativo 1	HEK293F	Nada	Prod. Standard
7	Dilución 10E-1 de AAVR2	HEK293F	eGFP	Prod. Standard
8	Dilución 2x10E-2 de AAVR2	HEK293F	eGFP	Prod. Standard
9	Dilución 4x10E-3 de AAVR2	HEK293F	eGFP	Prod. Standard
10	Dilución 8x10E-4 de AAVR2	HEK293F	eGFP	Prod. Standard
11	Dilución 1,6x10E-5 de AAVR2	HEK293F	eGFP	Prod. Standard
12	Control Negativo 1	HEK293F	Nada	Prod. Standard



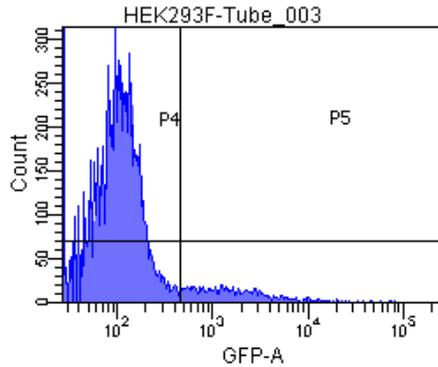
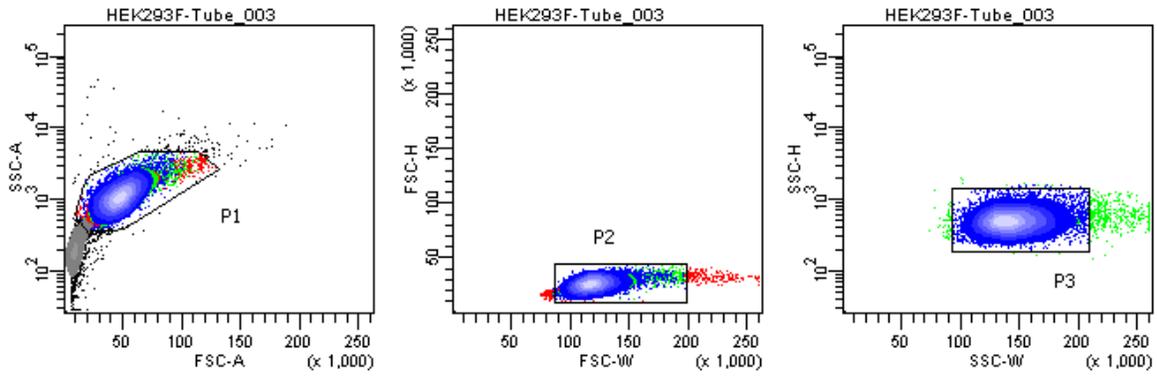
Experiment Name: ALB002
 Specimen Name: HEK293F
 Tube Name: Tube_001
 Record Date: Aug 29, 2016 3:53:33 PM

Population	Parent Name	#Events	%Parent	%Total	GFP-A Mean
All Events	####	13,998	####	100.0	3,686
P1	All Events	11,603	82.9	82.9	4,029
P2	P1	11,235	96.8	80.3	3,946
P3	P2	10,631	94.6	75.9	3,749
P4	P3	4,470	42.0	31.9	180
P5	P3	6,179	58.1	44.1	6,322



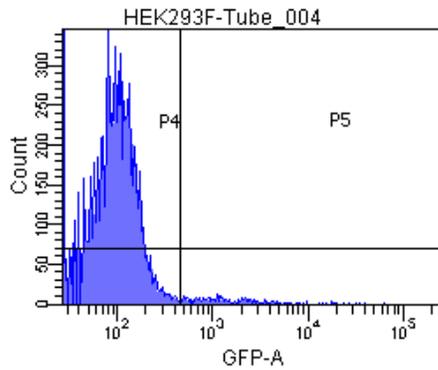
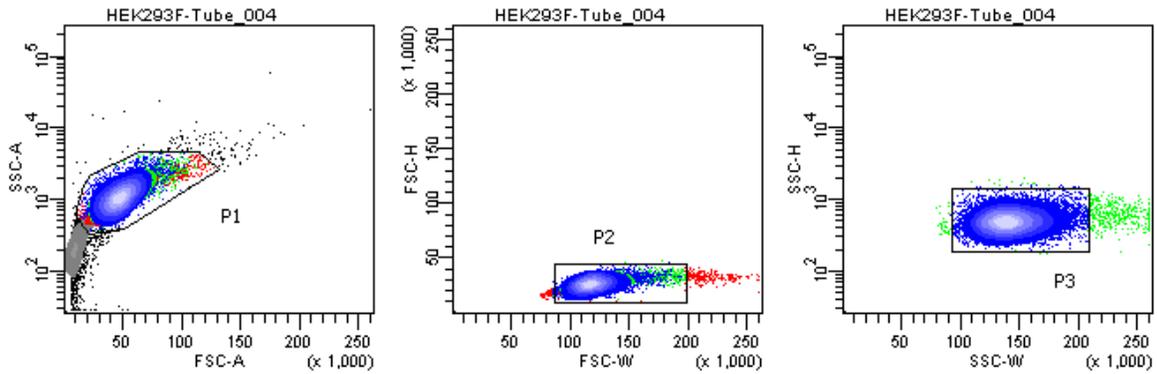
Experiment Name: ALB002
 Specimen Name: HEK293F
 Tube Name: Tube_002
 Record Date: Aug 29, 2016 3:54:24 PM

Population	Parent Name	#Events	%Parent	%Total	GFP-A Mean
All Events	####	12,877	####	100.0	2,990
P1	All Events	10,628	82.5	82.5	3,278
P2	P1	10,307	97.0	80.0	3,238
P3	P2	9,810	95.2	76.2	3,104
P4	P3	4,952	50.5	38.5	157
P5	P3	4,870	49.6	37.8	6,093



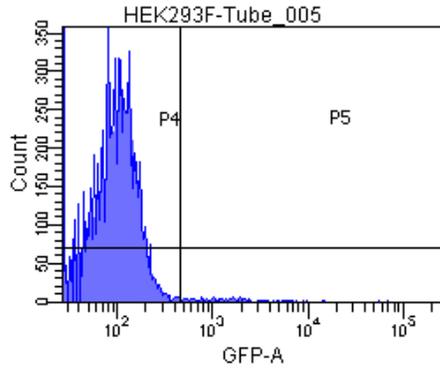
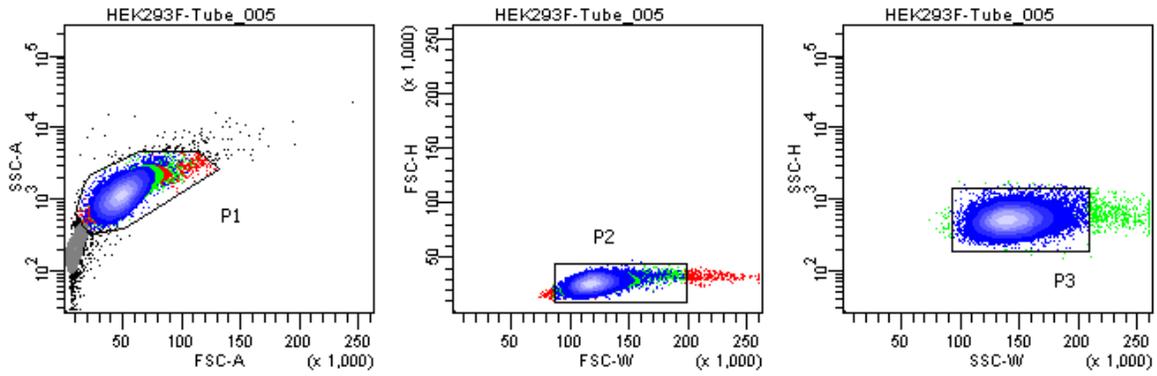
Experiment Name: ALB002
 Specimen Name: HEK293F
 Tube Name: Tube_003
 Record Date: Aug 29, 2016 3:54:52 PM

Population	Parent Name	#Events	%Parent	%Total	GFP-A Mean
All Events	####	12,324	####	100.0	390
P1	All Events	10,635	86.3	86.3	412
P2	P1	10,305	96.9	83.6	405
P3	P2	9,825	95.3	79.7	396
P4	P3	8,889	90.5	72.1	108
P5	P3	940	9.6	7.6	3,115



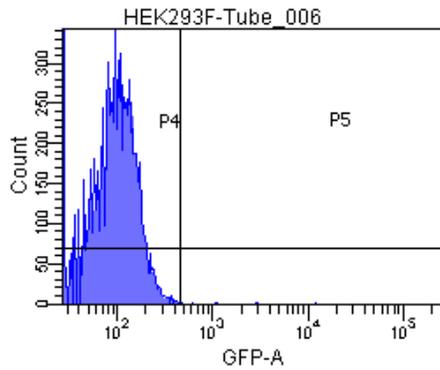
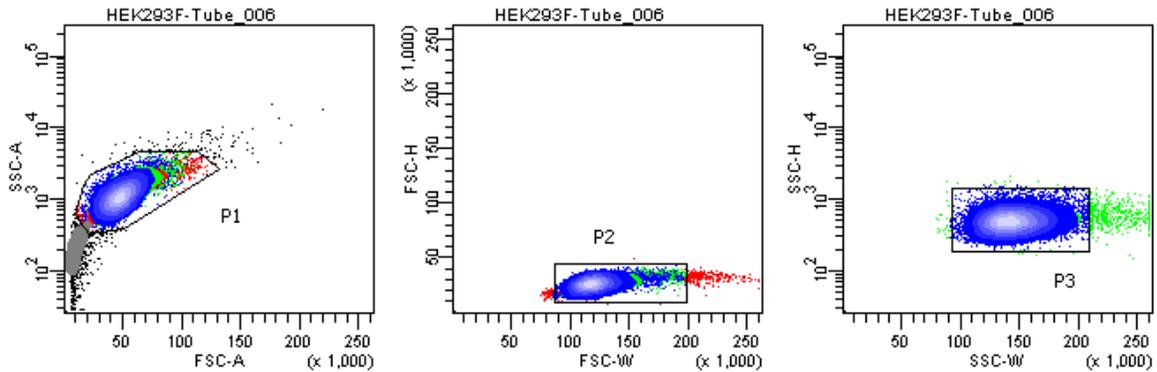
Experiment Name: ALB002
 Specimen Name: HEK293F
 Tube Name: Tube_004
 Record Date: Aug 29, 2016 3:55:32 PM

Population	Parent Name	#Events	%Parent	%Total	GFP-A Mean
All Events	####	12,404	####	100.0	193
P1	All Events	10,592	85.4	85.4	201
P2	P1	10,267	96.9	82.8	198
P3	P2	9,827	95.7	79.2	197
P4	P3	9,497	96.6	76.6	99
P5	P3	333	3.4	2.7	2,993



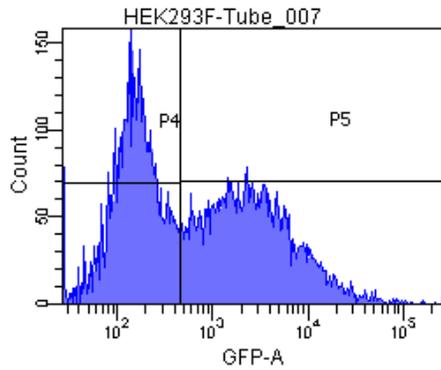
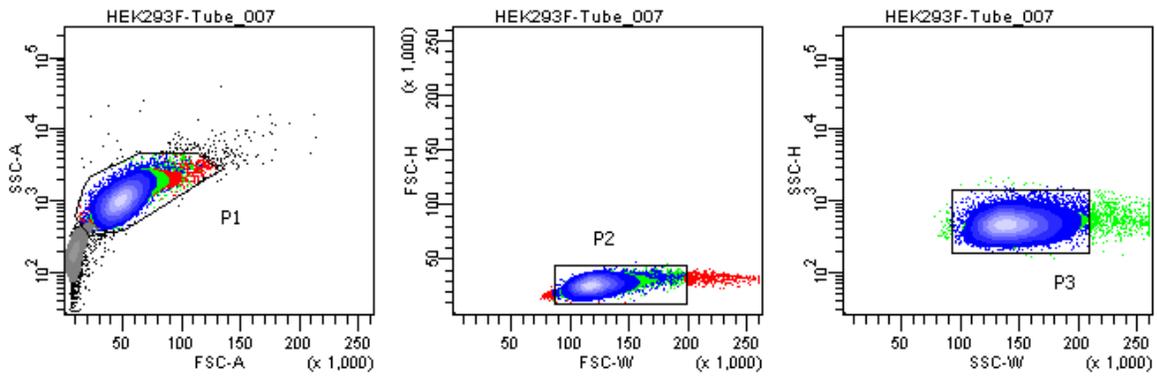
Experiment Name: ALB002
 Specimen Name: HEK293F
 Tube Name: Tube_005
 Record Date: Aug 29, 2016 3:56:01 PM

Population	Parent Name	#Events	%Parent	%Total	GFP-A Mean
All Events	####	12,118	####	100.0	151
P1	All Events	10,634	87.8	87.8	160
P2	P1	10,272	96.6	84.8	148
P3	P2	9,763	95.0	80.6	145
P4	P3	9,605	98.4	79.3	99
P5	P3	160	1.6	1.3	2,885



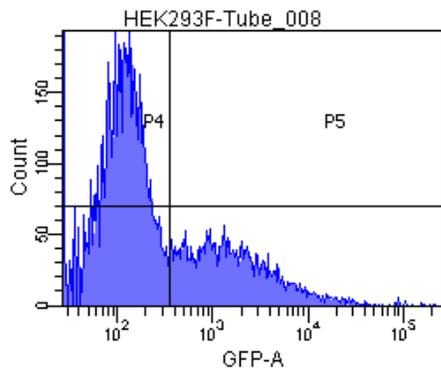
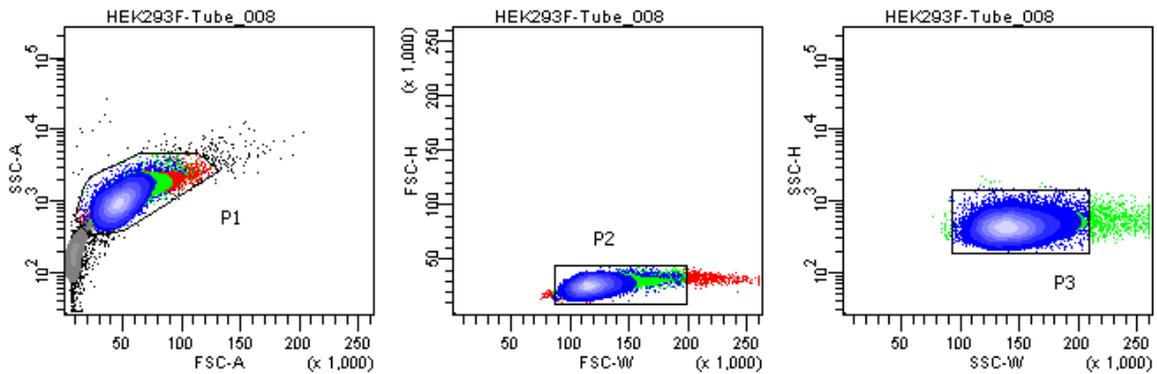
Experiment Name: ALB002
 Specimen Name: HEK293F
 Tube Name: Tube_006
 Record Date: Aug 29, 2016 3:57:03 PM

Population	Parent Name	#Events	%Parent	%Total	GFP-A Mean
All Events	####	12,231	####	100.0	100
P1	All Events	10,627	86.9	86.9	108
P2	P1	10,278	96.7	84.0	105
P3	P2	9,754	94.9	79.7	101
P4	P3	9,745	99.9	79.7	99
P5	P3	10	0.1	0.1	2,503



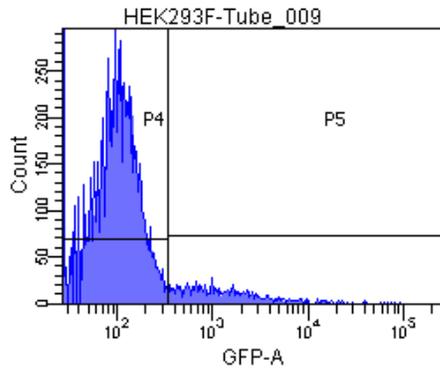
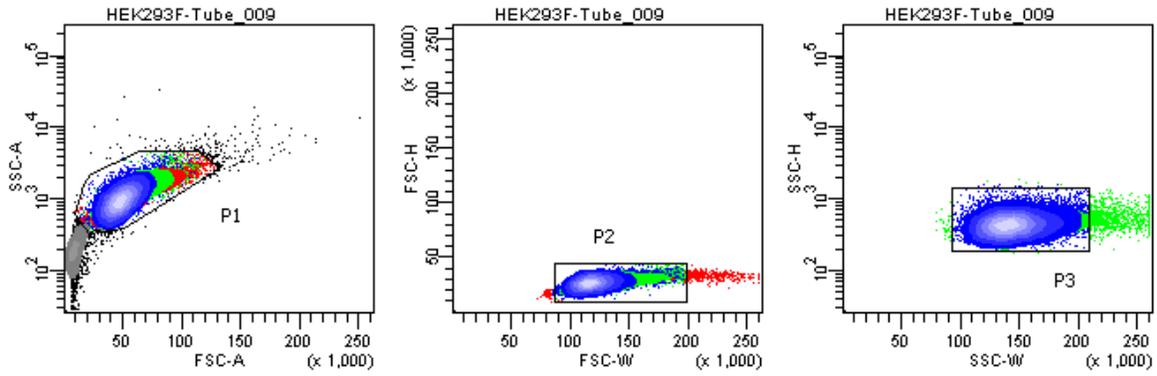
Experiment Name: ALB002
 Specimen Name: HEK293F
 Tube Name: Tube_007
 Record Date: Aug 29, 2016 3:57:31 PM

Population	Parent Name	#Events	%Parent	%Total	GFP-A Mean
All Events	####	12,495	####	100.0	3,406
P1	All Events	10,797	86.4	86.4	3,435
P2	P1	10,291	95.3	82.4	3,307
P3	P2	9,616	93.4	77.0	3,100
P4	P3	4,580	47.6	36.7	174
P5	P3	5,053	52.5	40.4	5,742



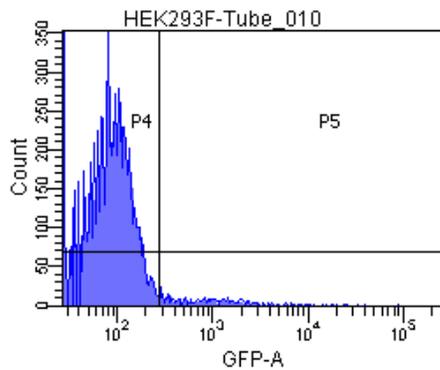
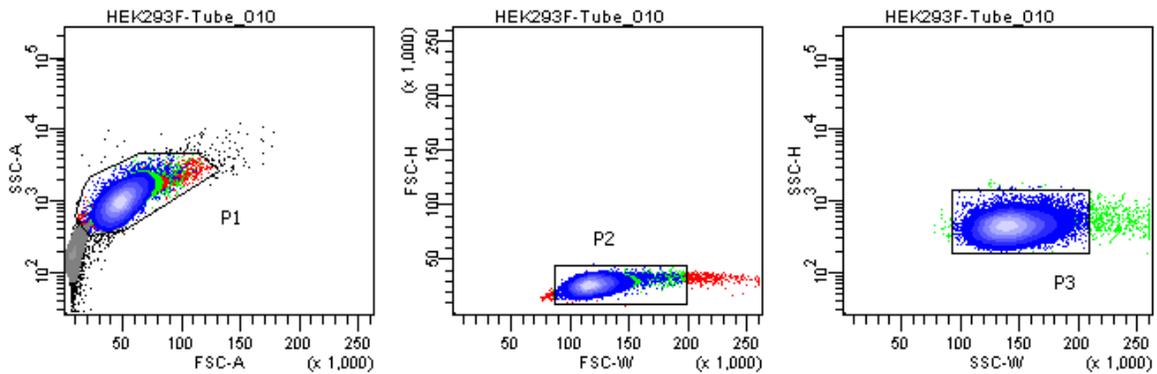
Experiment Name: ALB002
 Specimen Name: HEK293F
 Tube Name: Tube_008
 Record Date: Aug 29, 2016 3:57:57 PM

Population	Parent Name	#Events	%Parent	%Total	GFP-A Mean
All Events	####	12,505	####	100.0	1,404
P1	All Events	10,810	86.4	86.4	1,497
P2	P1	10,321	95.5	82.5	1,483
P3	P2	9,603	93.0	76.8	1,400
P4	P3	6,506	67.7	52.0	123
P5	P3	3,097	32.3	24.8	4,082



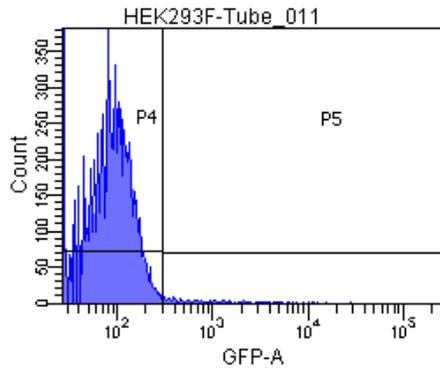
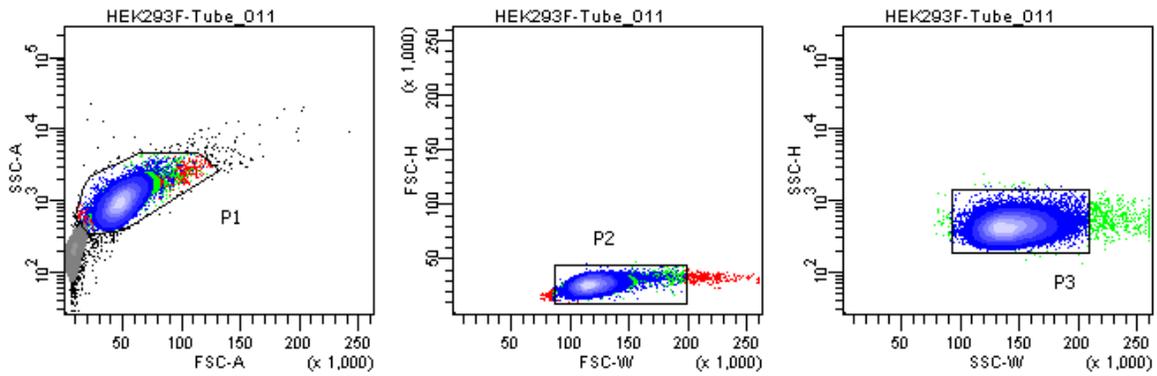
Experiment Name: ALB002
 Specimen Name: HEK293F
 Tube Name: Tube_009
 Record Date: Aug 29, 2016 3:58:22 PM

Population	Parent Name	#Events	%Parent	%Total	GFP-A Mean
All Events	####	12,594	####	100.0	396
P1	All Events	10,902	86.6	86.6	401
P2	P1	10,385	95.3	82.5	391
P3	P2	9,527	91.7	75.6	373
P4	P3	8,545	89.7	67.8	103
P5	P3	982	10.3	7.8	2,729



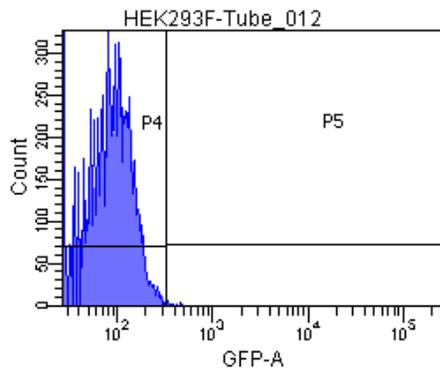
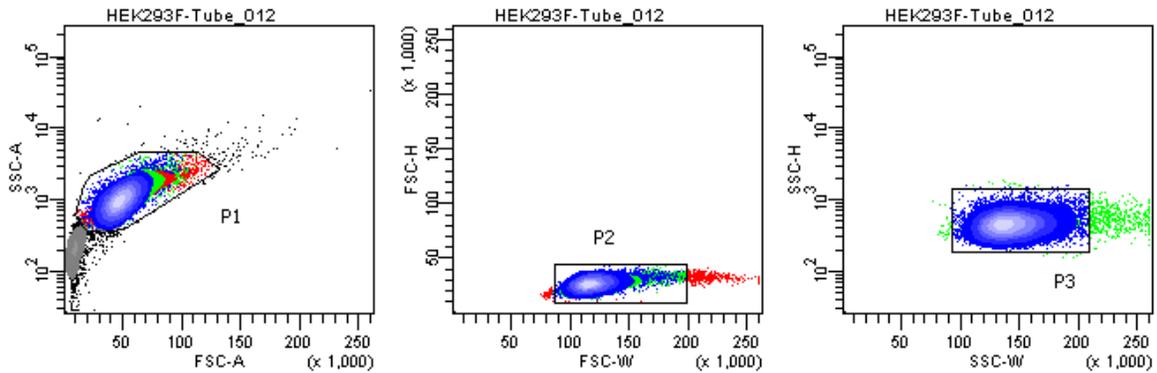
Experiment Name: ALB002
 Specimen Name: HEK293F
 Tube Name: Tube_010
 Record Date: Aug 29, 2016 3:58:50 PM

Population	Parent Name	#Events	%Parent	%Total	GFP-A Mean
All Events	####	12,397	####	100.0	180
P1	All Events	10,637	85.8	85.8	198
P2	P1	10,266	96.5	82.8	194
P3	P2	9,751	95.0	78.7	183
P4	P3	9,281	95.2	74.9	83
P5	P3	470	4.8	3.8	2,151



Experiment Name: ALB002
 Specimen Name: HEK293F
 Tube Name: Tube_011
 Record Date: Aug 29, 2016 3:59:19 PM

Population	Parent Name	#Events	%Parent	%Total	GFP-A Mean
All Events	####	12,353	####	100.0	116
P1	All Events	10,633	86.1	86.1	124
P2	P1	10,300	96.9	83.4	122
P3	P2	9,802	95.2	79.3	119
P4	P3	9,604	98.0	77.7	86
P5	P3	198	2.0	1.6	1,736



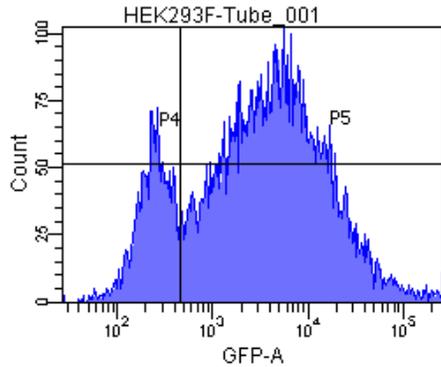
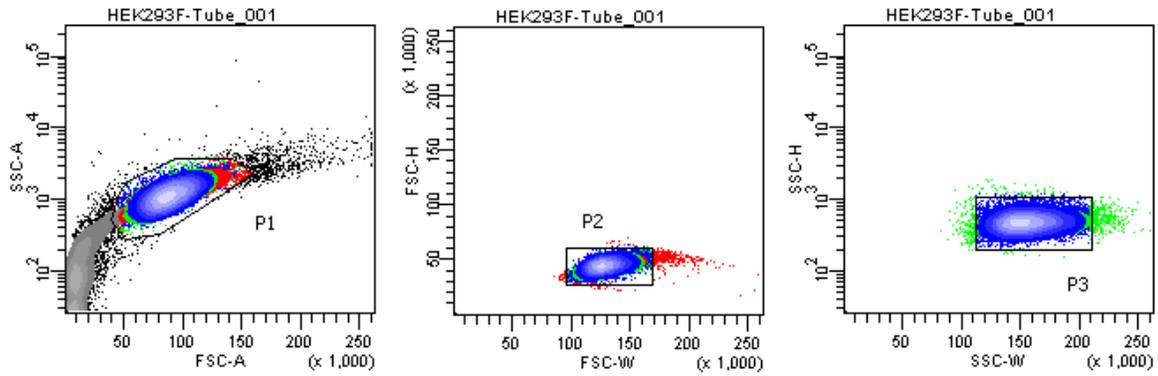
Experiment Name: ALB002
 Specimen Name: HEK293F
 Tube Name: Tube_012
 Record Date: Aug 29, 2016 3:59:47 PM

Population	Parent Name	#Events	%Parent	%Total	GFP-A Mean
All Events	####	12,312	####	100.0	87
P1	All Events	10,688	86.8	86.8	92
P2	P1	10,280	96.2	83.5	90
P3	P2	9,729	94.6	79.0	86
P4	P3	9,709	99.8	78.9	85
P5	P3	20	0.2	0.2	367

En la Tabla 5 se detalla lo que corresponde a cada tubo indicado en los resultados de citometría de flujo para AAV8 y AAV2 de la nueva producción sin diluir.

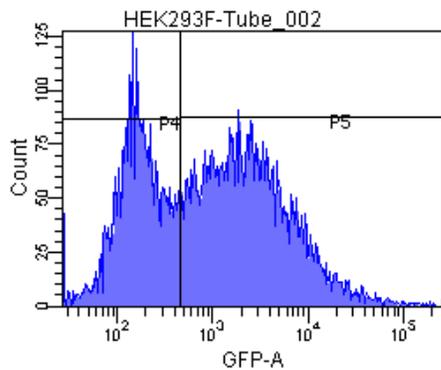
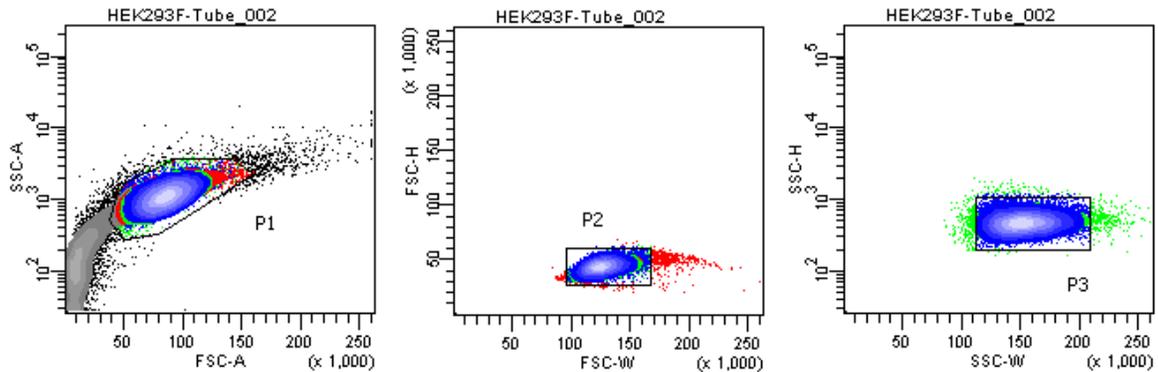
Tabla 5: Descripción de los tratamientos de infección con AAV2 y AAV8 en HEK293F realizados en cada muestra analizada por citometría de flujo

Tubo	Tratamiento	Línea celular	Proteína	Producción
1	Stock sin diluir AAVR2	HEK293F	eGFP	Prod. Standard
2	Dilución 10E-1 de AAVR2	HEK293F	eGFP	Prod. Standard
3	Stock sin diluir AAVR2	HEK293F	eGFP	Prod. Nueva
4	Stock sin diluir AAVR8	HEK293F	eGFP	Prod. Standard
5	Stock sin diluir AAVR8	HEK293F	eGFP	Prod. Nueva
6	Control Negativo 1	HEK293F	Nada	Medio DMEM/F12
7	Stock sin diluir AAVR2	HEK293F	eGFP	Prod. Standard
8	Dilución 10E-1 de AAVR2	HEK293F	eGFP	Prod. Standard
9	Stock sin diluir AAVR2	HEK293F	eGFP	Prod. Nueva
10	Stock sin diluir AAVR8	HEK293F	eGFP	Prod. Standard
11	Stock sin diluir AAVR8	HEK293F	eGFP	Prod. Nueva



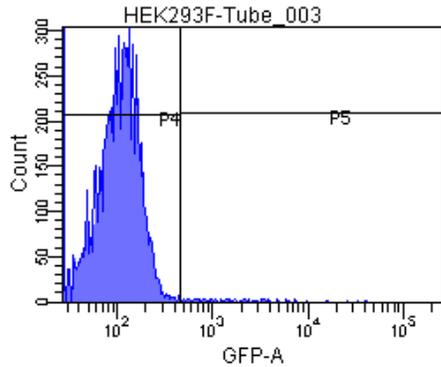
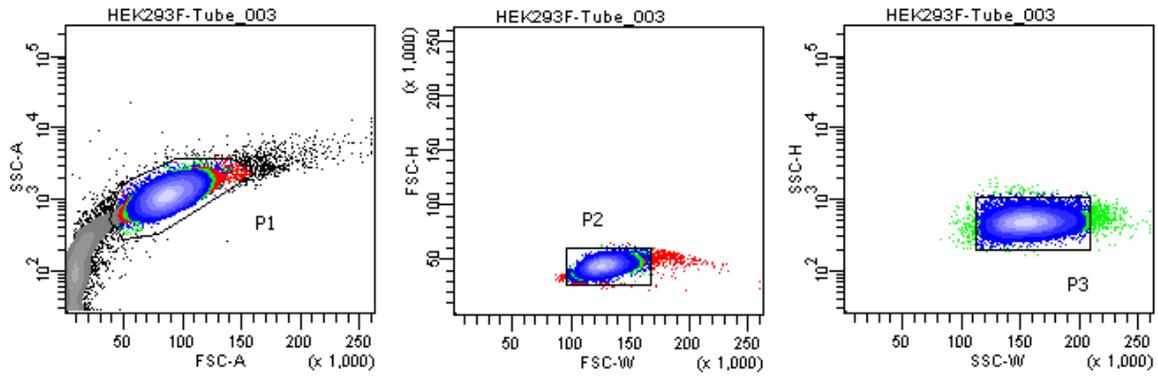
Experiment Name: ALB003
 Specimen Name: HEK293F
 Tube Name: Tube_001
 Record Date: Sep 28, 2016 12:15:47 PM

Population	Parent Name	#Events	%Parent	%Total	GFP-A Mean
All Events	####	15,210	####	100.0	8,293
P1	All Events	10,096	66.4	66.4	9,807
P2	P1	9,572	94.8	62.9	9,523
P3	P2	8,984	93.9	59.1	9,406
P4	P3	1,664	18.5	10.9	247
P5	P3	7,330	81.6	48.2	11,473



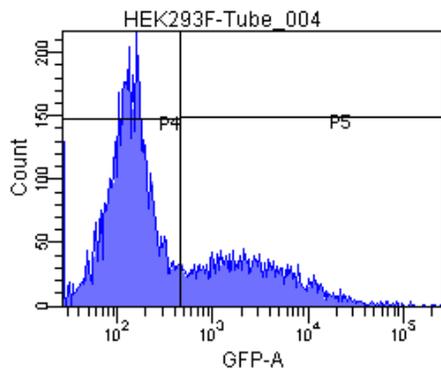
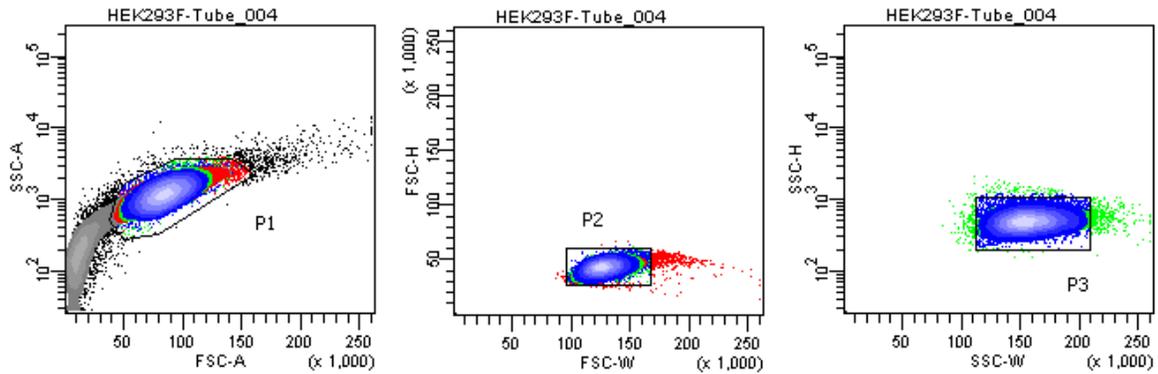
Experiment Name: ALB003
 Specimen Name: HEK293F
 Tube Name: Tube_002
 Record Date: Sep 28, 2016 12:16:43 PM

Population	Parent Name	#Events	%Parent	%Total	GFP-A Mean
All Events	####	14,804	####	100.0	3,384
P1	All Events	10,090	68.2	68.2	3,779
P2	P1	9,564	94.8	64.6	3,657
P3	P2	8,976	93.9	60.6	3,528
P4	P3	3,373	37.6	22.8	190
P5	P3	5,618	62.6	37.9	5,524



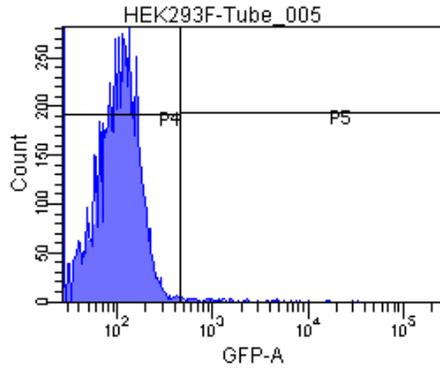
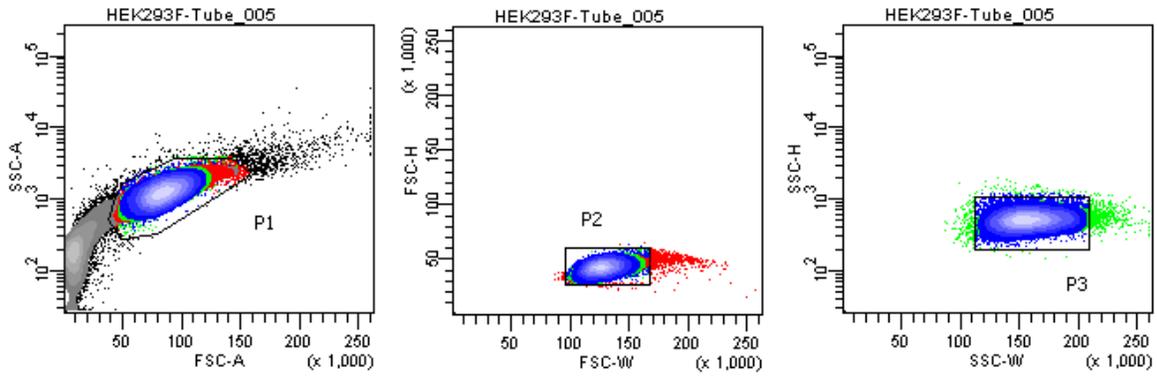
Experiment Name: ALB003
 Specimen Name: HEK293F
 Tube Name: Tube_003
 Record Date: Sep 28, 2016 12:17:33 PM

Population	Parent Name	#Events	%Parent	%Total	GFP-A Mean
All Events	####	13,975	####	100.0	133
P1	All Events	10,072	72.1	72.1	155
P2	P1	9,601	95.3	68.7	151
P3	P2	9,000	93.7	64.4	151
P4	P3	8,898	98.9	63.7	109
P5	P3	102	1.1	0.7	3,763



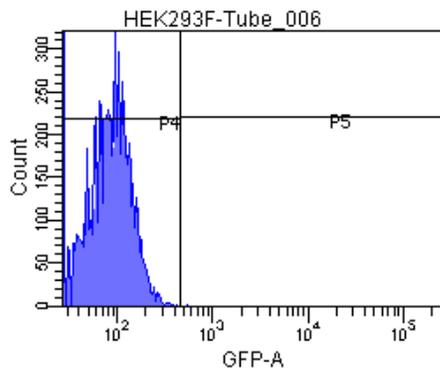
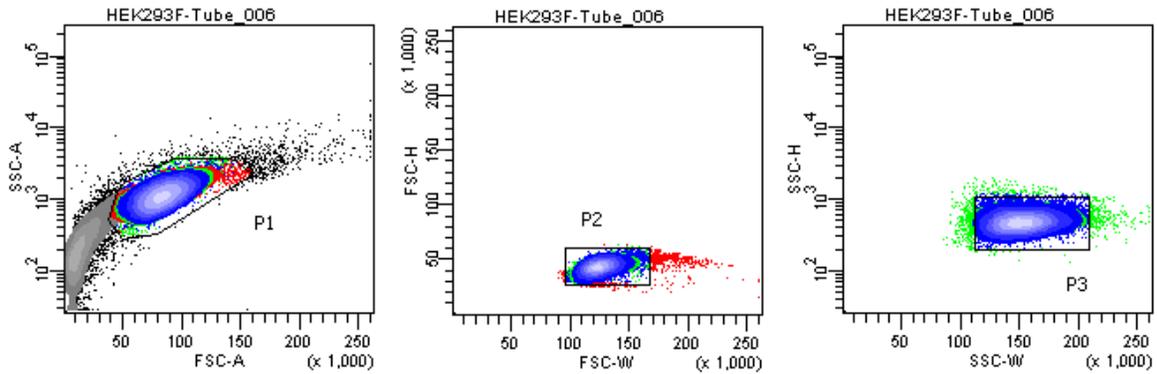
Experiment Name: ALB003
 Specimen Name: HEK293F
 Tube Name: Tube_004
 Record Date: Sep 28, 2016 12:19:39 PM

Population	Parent Name	#Events	%Parent	%Total	GFP-A Mean
All Events	####	14,425	####	100.0	2,103
P1	All Events	10,150	70.4	70.4	2,324
P2	P1	9,568	94.3	66.3	2,279
P3	P2	8,940	93.4	62.0	2,214
P4	P3	6,020	67.3	41.7	149
P5	P3	2,927	32.7	20.3	6,456



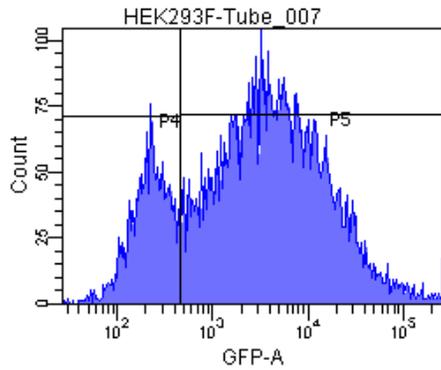
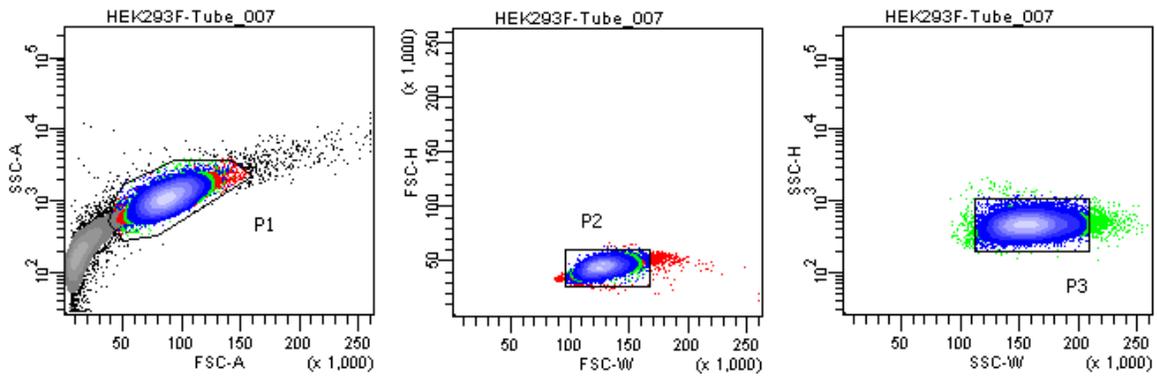
Experiment Name: ALB003
 Specimen Name: HEK293F
 Tube Name: Tube_005
 Record Date: Sep 28, 2016 12:20:36 PM

Population	Parent Name	#Events	%Parent	%Total	GFP-A Mean
All Events	####	15,750	####	100.0	131
P1	All Events	10,134	64.3	64.3	142
P2	P1	9,426	93.0	59.8	138
P3	P2	8,707	92.4	55.3	136
P4	P3	8,618	99.0	54.7	107
P5	P3	90	1.0	0.6	2,994



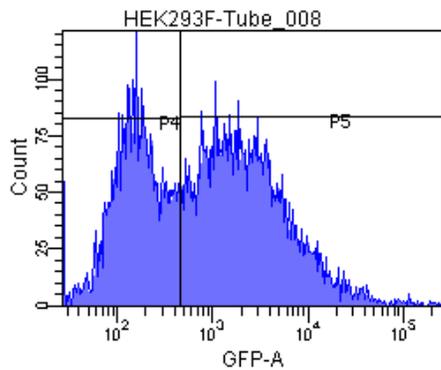
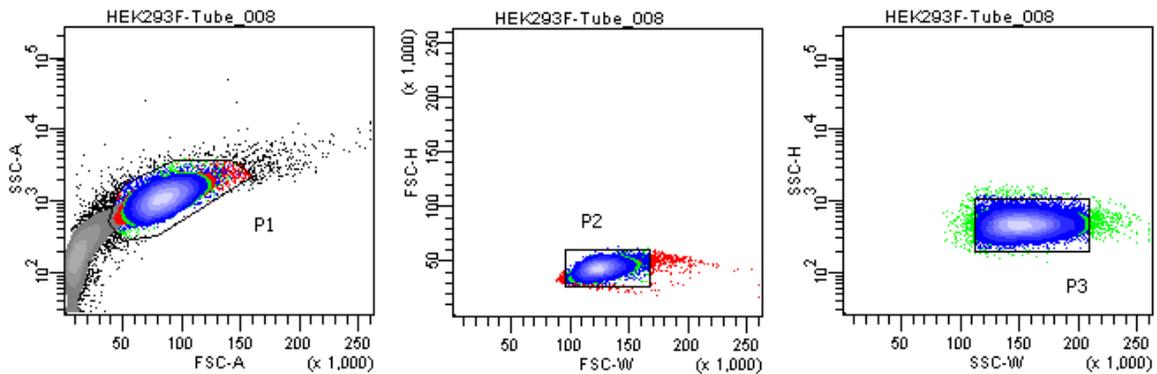
Experiment Name: ALB003
 Specimen Name: HEK293F
 Tube Name: Tube_006
 Record Date: Sep 28, 2016 12:21:31 PM

Population	Parent Name	#Events	%Parent	%Total	GFP-A Mean
All Events	####	14,561	####	100.0	81
P1	All Events	10,127	69.5	69.5	88
P2	P1	9,615	94.9	66.0	85
P3	P2	8,911	92.7	61.2	84
P4	P3	8,909	100.0	61.2	83
P5	P3	2	0.0	0.0	501



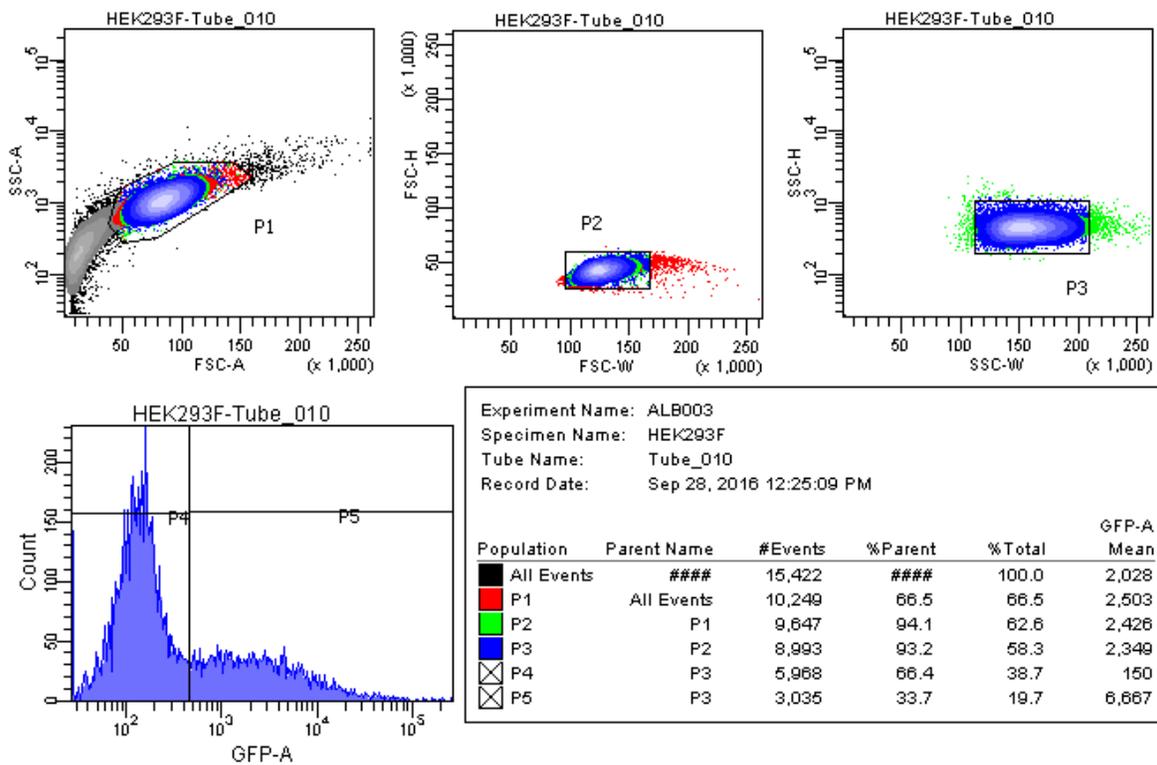
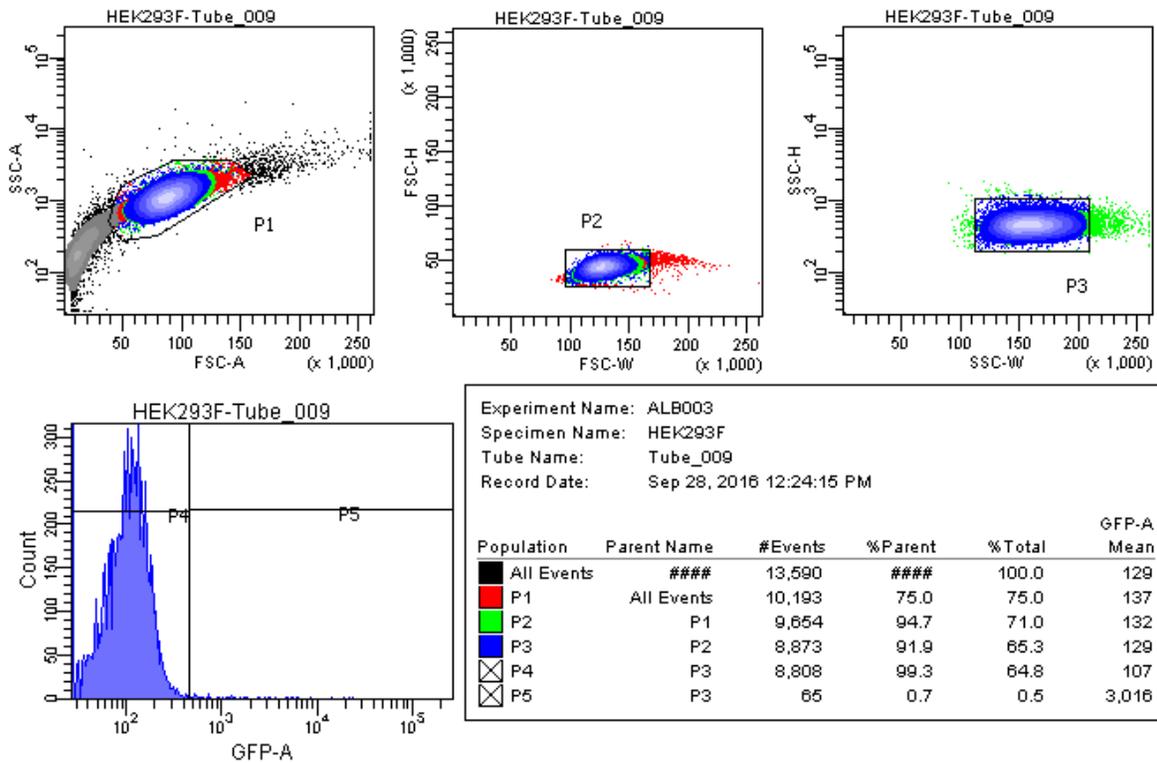
Experiment Name: ALB003
 Specimen Name: HEK293F
 Tube Name: Tube_007
 Record Date: Sep 28, 2016 12:22:30 PM

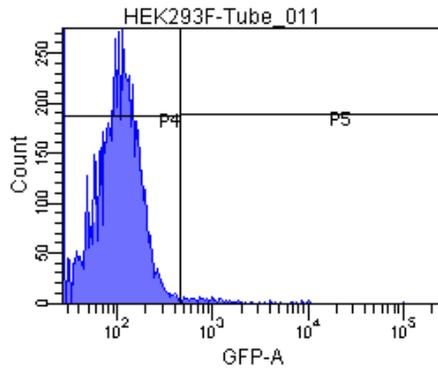
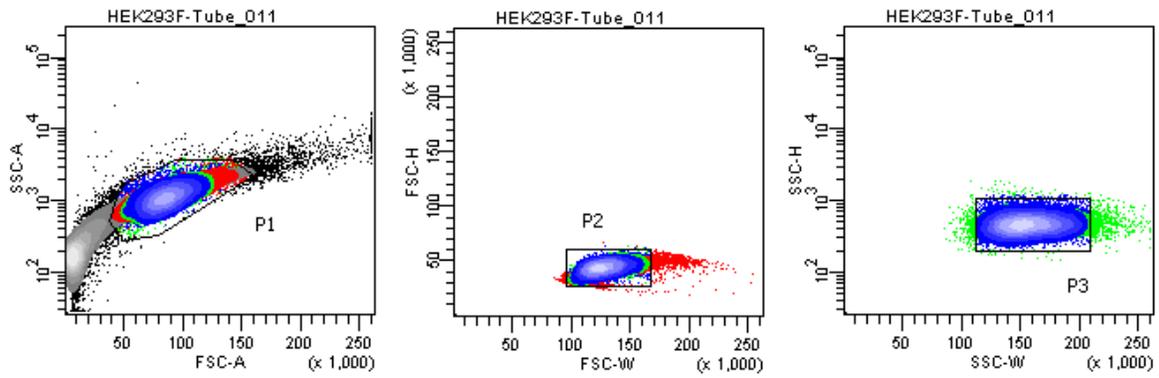
Population	Parent Name	#Events	%Parent	%Total	GFP-A Mean
All Events	####	14,153	####	100.0	8,738
P1	All Events	10,190	72.0	72.0	10,217
P2	P1	9,752	95.7	68.9	10,020
P3	P2	9,040	92.7	63.9	9,906
P4	P3	1,800	19.9	12.7	232
P5	P3	7,244	80.1	51.2	12,304



Experiment Name: ALB003
 Specimen Name: HEK293F
 Tube Name: Tube_008
 Record Date: Sep 28, 2016 12:23:22 PM

Population	Parent Name	#Events	%Parent	%Total	GFP-A Mean
All Events	####	14,831	####	100.0	2,969
P1	All Events	10,179	68.6	68.6	3,465
P2	P1	9,725	95.5	65.6	3,400
P3	P2	9,067	93.2	61.1	3,319
P4	P3	3,594	39.6	24.2	183
P5	P3	5,489	60.5	37.0	5,365





Experiment Name: ALB003
 Specimen Name: HEK293F
 Tube Name: Tube_011
 Record Date: Sep 28, 2016 12:26:17 PM

Population	Parent Name	#Events	%Parent	%Total	GFP-A Mean
All Events	####	20,111	####	100.0	125
P1	All Events	10,240	50.9	50.9	155
P2	P1	9,218	90.0	45.8	152
P3	P2	8,378	90.9	41.7	147
P4	P3	8,233	98.3	40.9	108
P5	P3	145	1.7	0.7	2,385