

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) |