



Universidad
Francisco de Vitoria
UFV Madrid

Facultad Ciencias Experimentales

Grado en Biomedicina

Producción de Vectores Adeno-Asociados Modificados para la Incorporación de Aptámeros

María Sarrasín Ortiz¹

Instituto de Investigaciones Biosanitarias Universidad Francisco de Vitoria.

Tutora de Trabajo de Fin de Grado: Dr. Cristina Sánchez Martínez

Tutora académica: Isabel García Álvarez

Mis agradecimientos a la Universidad Francisco de Vitoria por los servicios prestados y a la Dr. Cristina Sánchez por su acompañamiento y dedicación.

Resumen

Los vectores virales constituyen el sistema de transferencia de material genético más empleado en terapia génica en la actualidad (1). Concretamente, los virus adeno-asociados recombinantes (rAAVs) son uno de los vectores más prometedores por su alta seguridad, debido a la ausencia de patogenicidad y bajo perfil inmunogénico en humanos (2). Sin embargo, en los ensayos clínicos de terapia génica se han identificado limitaciones en cuanto a su eficacia debido, principalmente, al bajo tropismo y a la neutralización por anticuerpos. Recientemente se ha descrito una estrategia de optimización de rAAVs, que combina la manipulación genética con la unión química de oligonucleótidos en sitios específicos de la cápside viral (3). Nosotros proponemos utilizar este sistema para la incorporación de aptámeros de unión a receptores celulares, en busca de un tropismo selectivo. En concreto, buscamos incorporar un aptámero frente al receptor TLR4 (ApTLR#4F) sobreexpresado en procesos inflamatorios y cáncer (4,5). Para ello, es necesario producir rAAVs que incorporan un aminoácido no natural de manera sitio-específica y, posteriormente unir mediante reacción química o “click chemistry” el aptámero.

Nuestro primer objetivo fue la optimización del sistema de producción de rAAVs mutantes mediante transfección transitoria libre de virus *helper*. Realizamos producciones a baja escala de rAAVs modificados y *wild-type*, y evaluamos su capacidad de transducción. Los resultados confirmaron la generación de rAAVs que incorporaban aminoácidos no naturales en proteínas de la cápside (VPs), sin embargo, la eficiencia de producción de vectores funcionales fue muy baja. Posteriormente, realizamos una producción a gran escala y tras una purificación parcial de partículas virales mediante diafiltración, analizamos la generación de vectores funcionales, así como de partículas virales vacías y con genoma. Como resultado, detectamos la expresión de proteínas de movilidad electroforética acorde con VPs virales y partículas virales génicas, tanto en las fracciones del virus purificado como del mutante. Además, detectamos una mínima disminución en la producción de virus mutantes, de no más de tres veces, en comparación con el virus *wild-type*. Sin embargo, la funcionalidad del virus mutante disminuyó drásticamente con respecto al *wild-type* quedando por determinar si esta pérdida de funcionalidad puede ser revertida mediante la incorporación del aptámero a través de reacción química.

Palabras clave: vector adeno-asociado, terapia génica, aptámero, ingeniería de cápsides.

Lista de abreviaturas: Vector adeno-asociado recombinante (rAAV), aminoácido no natural (UAA), Ácido desoxirribonucleico (ADN).

ÍNDICE

<i>Lista de abreviaturas</i>	2
INTRODUCCIÓN.....	4
1. TERAPIA GÉNICA Y VECTORES VIRALES.....	4
1.1 PROPIEDADES DE VECTORES ADENO-ASOCIADO RECOMBINANTES.....	4
1.2 MODIFICACIÓN DE VECTORES ADENO-ASOCIADOS RECOMBINANTES.	8
2. APTÁMEROS.....	10
3. UNIÓN DE rAAV y APTÁMEROS.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
1. Mantenimiento células de empaquetamiento AAV293.....	13
2. Maxipreparaciones endofree Quiagen y digestiones plásmidicas.....	13
3. Generación de vectores AAV a baja escala en células empaquetadoras AAV293.	14
4. Generación de vectores AAV a gran escala en células empaquetadoras AAV293. ...	15
5. Titulación de vectores virales AAV.	16
RESULTADOS.....	17
1. Optimización del proceso de producción de vectores adeno-asociados de serotipo AAV-2 y AAV-DJ con inserciones de UAA en la cápside viral.	17
1.1. Producción de vectores virales rAAV-2 y rAAV-DJ a baja escala.	17
1.2 Producción de vectores virales rAAV-2-N587-UAA y rAAV-DJ-N589-UAA a baja escala.	20
2. Producción de vectores virales AAV-DJ y AAV-DJ mutantes a gran escala.	25
DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIONES.....	33
ANEXOS	34
ANEXO I:.....	34
ANEXO II.....	36
Bibliografía.....	38

INTRODUCCIÓN

1. TERAPIA GÉNICA Y VECTORES VIRALES.

La terapia génica, definida como la introducción de material genético en una célula diana para obtener un beneficio terapéutico, es un tratamiento muy prometedor para muchas enfermedades que no cuentan con una terapia eficaz, incluidas las monogénicas, cardiovasculares, neurodegenerativas y el cáncer (6). El objetivo principal de la terapia génica es inducir o modular la expresión génica de células diana mediante la introducción de moléculas de ADN o ARN. La terapia génica se propuso originalmente hace 45 años, desde entonces y hasta la fecha, se han registrado más de 300.000 estudios. Sin embargo, ha sido en los últimos 10 años en los que se ha demostrado un beneficio clínico significativo (7). En la actualidad, las principales patologías en las que se está aplicando son: en primer lugar, el cáncer, en segundo lugar, las enfermedades monogénicas, y le siguen las enfermedades cardiovasculares, infecciosas, neurológicas, oculares, inflamatorias y otras (7). Actualmente, existen 28 medicamentos de terapia génica y celular aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) y Agencia Europea del Medicamento (EMA) (8 y 9). Así, la edición genética, que era una utopía, se ha convertido en una realidad clínica (10), aportando nuevas opciones de tratamiento para patologías como cáncer o enfermedades genéticas (11). En el desarrollo de la terapia génica son fundamentales dos aspectos, en primer lugar, la protección del principio activo que va a llevar a cabo la función terapéutica, ADN o ARN, y en segundo lugar, asegurar la llegada eficiente al sitio de acción intracelular, generalmente, el núcleo celular (12). Para ello, se han desarrollado vectores terapéuticos, que pueden clasificarse en dos grandes categorías: sistemas fisicoquímicos no virales y sistemas virales recombinantes. Los sistemas no virales ofrecen una mayor facilidad de caracterización química, mayor simplicidad y reproducibilidad. Sin embargo, estos sistemas son ineficientes y sus efectos suelen ser transitorios (13). Por otro lado, los sistemas virales recombinantes son mucho más eficientes y presentan elevada seguridad. Así pues, en la actualidad, los vectores virales son los sistemas de transferencia génica más empleados, siendo utilizados en más de la mitad de los ensayos clínicos de terapia génica, por ser los más efectivos y menos tóxicos (1). Además, el uso de virus como sistemas de liberación de genes permite, por un lado, la protección de los ácidos nucleicos, que se encuentran en el interior de un núcleo proteico, la cápside, codificado por el propio virus, y por otro, la adhesión a receptores celulares, mediada por las proteínas virales expuestas en la cápside, garantizando así la entrada en la célula (12).

1.1 PROPIEDADES DE VECTORES ADENO-ASOCIADO RECOMBINANTES.

Los sistemas virales recombinantes empleados en terapia génica son virus modificados que transportan un gen foráneo de interés, denominado transgén. El virus portador de dicho gen infecta a las células del organismo con un tropismo determinado e introduce en ellas el material genético que porta, el cual cumplirá con la función deseada. Así, existen varias consideraciones funcionales que cualquier vector viral debe cumplir, como son la capacidad de adherirse a la célula diana, y entrar en ella, y la capacidad de transferirse al núcleo y expresar el transgén en este.

En la actualidad, se emplean, en ensayos clínicos, vectores virales derivados de al menos dieciséis virus diferentes para la administración de transgenes. Estos pueden clasificarse en virus no mamíferos y virus de mamíferos. Los vectores no mamíferos tienden a degradarse rápidamente *in vivo* y son altamente inmunogénicos, por lo que, hasta el momento, los virus de mamíferos se han establecido como primera opción para el transporte de genes *in vivo*. Además, dentro de este grupo, encontramos diferentes vectores virales. En primer lugar, los vectores adenovirales, que han sido los más utilizados hasta el momento. Estos presentan ventajas como transducción de células en división y no división, gran capacidad transgénica, gran estabilidad en sangre y baja tasa de mutagénesis por inserción. Sin embargo, son altamente inmunogénicos e inflamatorios. Por otro lado, los virus adeno-asociados recombinantes (rAAVs) son los vectores más prometedores, ya que presentan semejantes ventajas a los adenovirales, pero, a diferencia de estos, no están asociados a ninguna enfermedad conocida y no son inflamatorios ni tóxicos en humanos. Además, permiten una expresión del transgén a largo plazo, así como un tropismo variado debido a la diversidad de serotipos existentes. Todos estos factores hacen del rAAV un vector ideal para su uso en terapia génica (2).

Actualmente se han descrito hasta doce serotipos diferentes de virus AAV en humanos y más de 100 serotipos en primates. Cada serotipo presenta un tropismo diferente a nivel tisular que le confiere un patrón de biodistribución característico. Además, también difieren en la eficiencia de transducción. Entre los serotipos de AAV en humanos destaca el AAV-2, siendo el más empleado en terapia génica, este se une al receptor Proteoglicano Heparán Sulfato (HSPG).

El AAV es un virus pequeño, de 25 nm, sin envuelta, que pertenece a la familia Parvoviridae, y al género Dependovirus, ya que requiere de la presencia de un virus auxiliar o *helper* (Adenovirus o Herpesvirus) para infectar. Se trata de un parvovirus de ADN monocatenario con un genoma de 4,7 kb compuesto por los genes *rep* y *cap* flanqueados por repeticiones terminales invertidas (ITR). El gen *rep* codifica para cuatro proteínas no estructurales implicadas en la replicación viral, el empaquetamiento y la integración genómica, mientras que el gen *cap* codifica para tres proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3) generadas por *splicing* alternativo, que se ensamblan para formar la cápside viral, la cual sirve como sistema de transporte del gen viral (6). Por otro lado, las ITR son secuencias en *cis* importantes en la biología del AAV. Estas secuencias repetidas juegan un papel importante en la replicación del AAV, así como son esenciales para el empaquetamiento del genoma, la transcripción, y la integración en sitios específicos (2).

Para la obtención de los AAV recombinantes, se utiliza el sistema "AAV Helper-Free", el cual permite la producción de los AAV sin la presencia de un virus auxiliar. El proceso consiste en la co-transfección del plásmido del vector viral, que contiene las secuencias ITR flanqueando al gen de interés (pAAV-Transgén), y los plásmidos necesarios para suplir en *trans* el resto de proteínas necesarias para el ciclo viral (pAAV-Rep/Cap y pAAV-Helper). Estas son las proteínas Rep/Cap del virus adenoasociado y proteínas E4, E2a y VA del adenovirus *helper*. La proteína adenoviral E1 se expresa de manera estable en las células transfectadas, células empaquetadoras AAV293. Como resultado, en el interior de estas células el AAV se ensambla, dando lugar a vectores virales no replicativos que contienen en su genoma viral el transgén terapéutico (**Figura 1.A**).

El ciclo viral de los AAV comienza con la unión al receptor celular, de esta forma, entra en la célula por endocitosis mediada por receptor. En el interior celular debe darse el escape endosomal y el transporte intracelular hacia el núcleo, proceso facilitado por las señales de localización nuclear (NLS) que presentan las proteínas de la cápside VP1 y VP2. En el núcleo, y en presencia de un virus *helper*, tiene lugar la replicación y la síntesis de la segunda cadena de ADN. Tras la expresión de las proteínas virales, se ensamblan nuevos virus AAV, que finalmente salen de la célula. Por otro lado, en ausencia de virus auxiliar, se establece una fase de latencia en la que el genoma viral del AAV se integra en el ADN cromosómico de la célula huésped en una región específica del cromosoma 19 humano, esta especificidad de integración esta mediada por la proteína Rep (12) (**Figura 1.B**). Sin embargo, en el caso de los vectores rAAV, el genoma viral es sustituido por el transgen y los elementos necesarios para su expresión, flanqueado exclusivamente por las secuencias ITR. Así, los vectores generados persistan como episomas no integrativos, permitiendo la expresión permanente del transgén, sin expresar ninguna proteína viral (**Figura 1.B**). Este sistema de producción hace de los rAAV unos vectores seguros en su aplicación clínica.

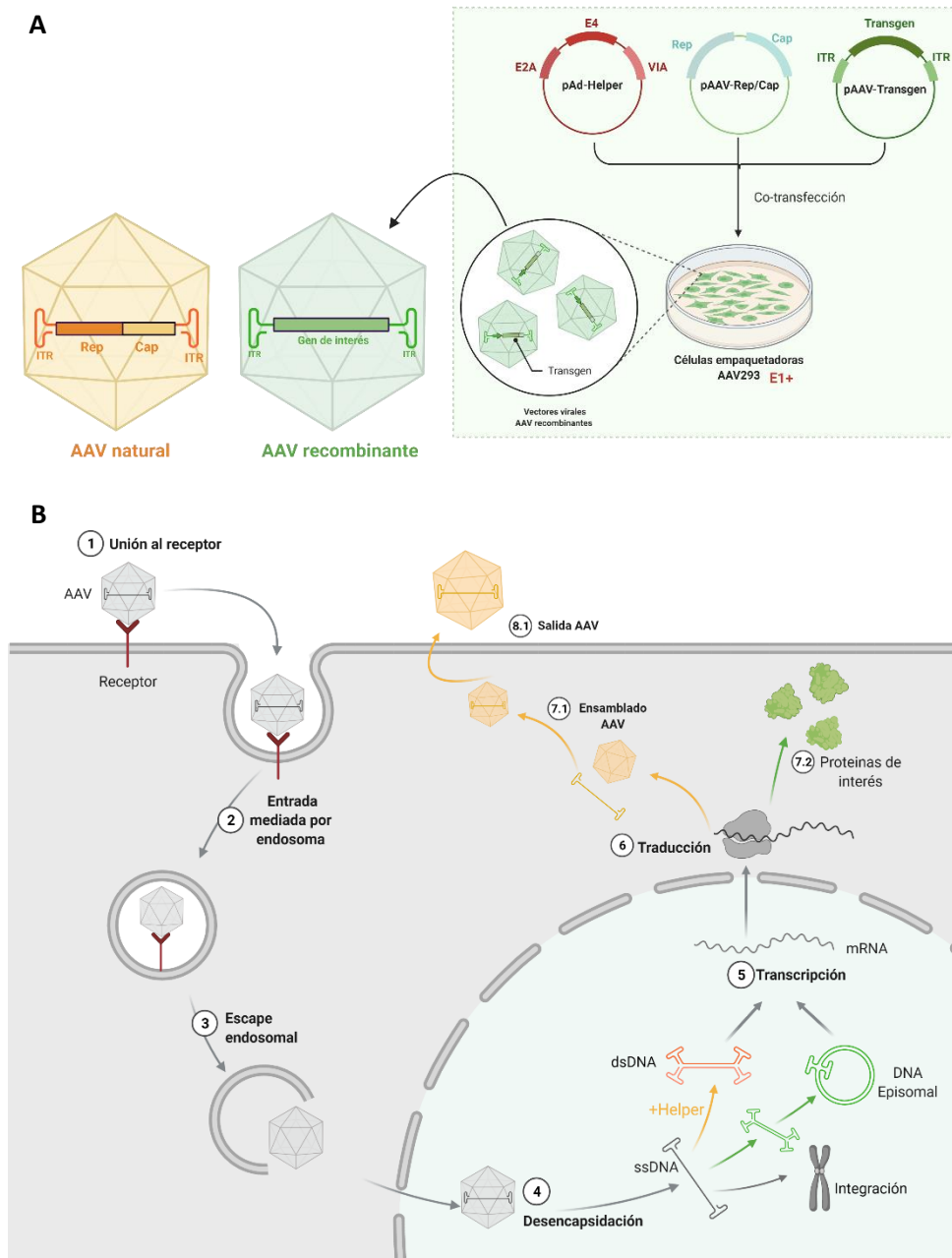


Figura 1. Producción (A) y ciclo de infección (B) del vector adeno-asociado recombinante (verde) en comparación con el vector natural (naranja). Elaboración propia empleando herramienta BioRender.

(A) Sistema de producción de rAAVs portadores del transgén flanqueado por secuencias ITR mediante sistema de transfección “AAV Helper-Free” (B) Ciclo de infección 1) Unión al receptor, 2) Entrada mediada por endosoma, 3) Escape endosomal, 4) Desencapsidación, 5) Transcripción, 6) Traducción. Virus natural: 7.1) Ensamblado, 8.1) Salida. Virus rAAV: 7.2) Expresión proteínas de interés.

1.2 MODIFICACIÓN DE VECTORES ADENO-ASOCIADOS RECOMBINANTES.

Aunque los resultados clínicos de ensayos con AAVr han sido un éxito en cuanto a seguridad debido a su baja respuesta inflamatoria y falta de toxicidad, también se han identificado limitaciones asociadas al vector en humanos que disminuyen su eficacia *in vivo*, como son el tropismo limitado, la respuesta de anticuerpos neutralizantes preexistentes, o los bajos niveles de expresión del transgén (2). Por ello, se están desarrollando diversas estrategias para optimizar los vectores rAAV y lograr una mayor eficacia *in vivo*.

Una paso limitante causante de la baja expresión del transgén es la síntesis de la segunda cadena de ADN, necesaria para la transcripción y traducción del genoma viral del rAAV en la célula infectada. En ausencia de virus *helper*, para la síntesis de la segunda cadena de ADN es necesaria la maquinaria de replicación de la célula huésped, que se encuentra inactiva en algunas de las células diana que infectan los rAAV, como las células quiescentes o postmitóticas. Como consecuencia, la expresión del transgén es baja o lenta (12). Como solución a esta limitación, se han diseñado vectores rAAV autocomplementarios (scAAV), los cuales empaquetan un genoma de repetición invertida, que por complementariedad se pliega y resulta en un dsDNA sin necesidad de la síntesis de ADN *de novo* (14). De esta forma, el scAAV permite una transcripción inmediata, mejorando así la cinética de expresión y el rendimiento de los productos codificados por el vector (15). La principal desventaja de esta estrategia es la reducción a la mitad del tamaño del transgén empaquetado en el vector (**Figura 2**).

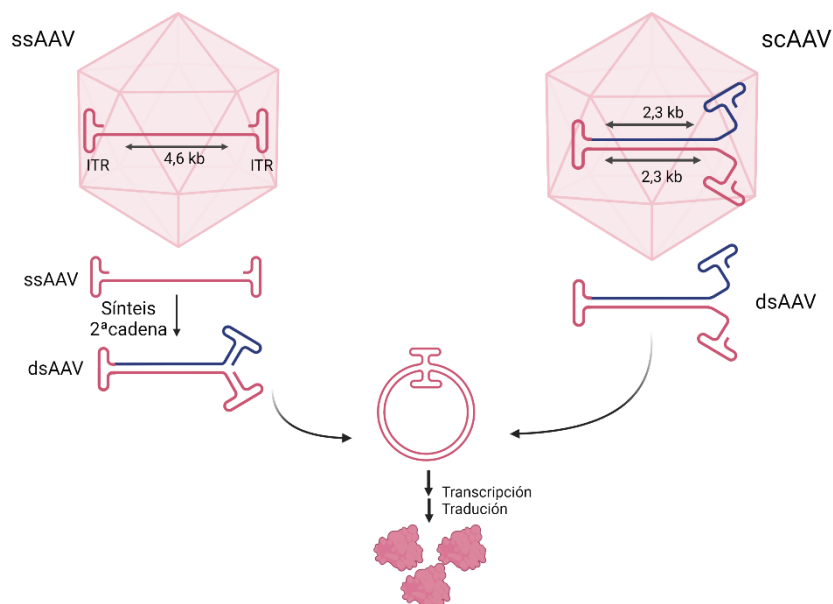


Figura 2. Vectores AAV autocomplementarios (scAAV), en comparación con vectores AAV naturales (ssAAV). Elaboración propia empleando herramienta BioRender.

A la izquierda, estructura génica de AAV ssDNA, proceso de síntesis de la segunda cadena de ADN en el núcleo celular y generación de concatémero. A la derecha, vector rAAV autocomplementario, generación de concatémero sin necesidad de síntesis de la segunda cadena de ADN. Por último, síntesis proteica.

Por otro lado, la gran mayoría de las estrategias diseñadas para aumentar la eficacia *in vivo*, se centran en la manipulación de la cápside viral, y persiguen dos objetivos fundamentales: 1) aumentar el tropismo, es decir, dirigir de forma específica el AAV a los tejidos diana, y 2) aumentar la biodisponibilidad, por ejemplo, mediante la evasión del sistema inmunitario. El desarrollo de vectores que cumplan estas características permitirá una transferencia génica *in vivo* más eficaz. Actualmente existen, al menos, cuatro técnicas centradas en la manipulación de la cápside viral: la mutagénesis racional, la evolución dirigida, el análisis de linaje evolutivo y la conjugación química.

- La mutagénesis racional utiliza el conocimiento de la estructura del AAV para diseñar AAV con características favorables, esta técnica se ha utilizado, por ejemplo, para generar variantes de AAV dirigidas a tumores (16).
- La evolución dirigida, por otro lado, se centra en generar bibliotecas de cápsides mediante mutagénesis aleatoria, seguida de un amplio cribado para aislar variantes con las características deseadas, así, se han generado variantes de AAV que resistan altos niveles de anticuerpos neutralizantes (17).
- El análisis del linaje evolutivo implica la reconstrucción de la secuencia ancestral de las proteínas de la cápside del AAV, su síntesis y un proceso de cribado, esta técnica se ha utilizado para predecir un ancestro de los serotipos 1, 2, 8 y 9 de los AAV, altamente potente para atacar el hígado, el músculo y la retina (18).
- Por último, el enfoque basado en la conjugación química permite unir péptidos y proteínas a la cápside, sin embargo, carecen de especificidad y pueden afectar a la estabilidad viral (3).

Estos cuatro enfoques han permitido la generación de rAAV mejorados, entre ellos, podemos encontrar, virus quiméricos, los cuales se crean uniendo genéticamente secuencias de genes de la cápside de dos o más virus, lo que da como resultado un nuevo virus con una cápside híbrida. Una variante de esto es “DNA shuffling” mediante la cual se generan grandes bibliotecas de virus quiméricos, permitiendo seleccionar *in vivo* aquellos con características de interés. También se han desarrollado virus mosaico, cuyas cápsides están constituidas por múltiples subunidades de proteínas individuales pertenecientes a diferentes serotipos de AAV. Por otro lado, encontramos virus pseutipados, los cuales se generan intercambiando la proteína de la envoltura de un virus con otro. Además, podemos encontrar virus cuyas cápsides han sido modificadas genéticamente mediante la incorporación de secuencias de pequeñas moléculas o proteínas, esta inserción puede ser racional o aleatoria. Sin embargo, la introducción de mutaciones puntuales en la secuencia de la cápside puede ser suficiente para conseguir unas propiedades virales favorables. Por último, encontramos la incorporación de pequeñas moléculas como anticuerpos y sustancias sintéticas como nanopartículas mediante conjugación química (1) (**Figura 3**).

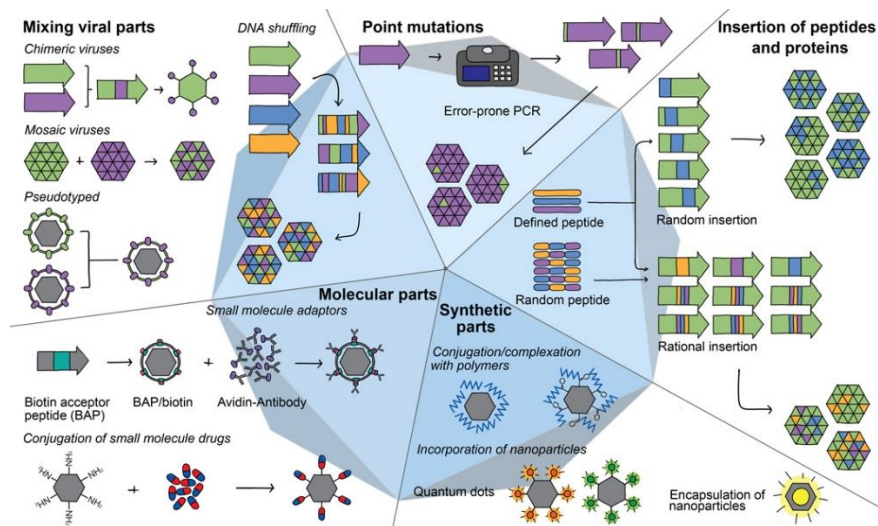


Figura 3. Estrategias de optimización de rAAVs. Adaptado de “Synthetic virology: engineering viruses for gene delivery” por Guenther et al, 2014, Nanomedicine and nanobiotechnology. (1).

Representación esquemática de las estrategias de producción de rAAVs quiméricos, mosaicos y pseudotipados, rAAVs con mutaciones puntuales, rAAVs con péptidos/proteínas codificados genéticamente y rAAVs con pequeñas moléculas y nanopartículas conjugadas.

Cabe destacar la generación del serotipo AAV-DJ empleando la tecnología “DNA family shuffling”. Mediante esta estrategia de optimización de rAAVs, se ha creado una biblioteca compleja de cápsidas híbridas formadas por ocho serotipos diferentes de AAV (2, 4, 5, 8, 9, aviar, bovino, caprino). Así, se desarrolló el vector recombinante AAV-DJ, el cual, posee una eficacia de transducción *in vitro* muy superior a cualquier otro serotipo salvaje, demostrado en estudios realizados en tipos celulares de diferentes especies y tejidos (19).

2. APTÁMEROS

Por su parte, los aptámeros son oligonucleótidos (ADN o ARN) monocatenarios que se unen a sus ligandos con alta especificidad y afinidad, esta interacción se basa en una conformación tridimensional única, dependiente de la secuencia nucleotídica (20). Se trata de análogos (en ácidos nucleicos) de los anticuerpos proteicos, que pueden unirse a una amplia variedad de ligandos como pequeñas moléculas orgánicas, proteínas, virus o células. Los aptámeros se crean mediante un proceso de selección *in vitro* denominado Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (SELEX). De esta forma, los aptámeros han surgido como alternativa a los anticuerpos en aplicaciones como el diagnóstico *in vitro* e *in vivo*, la liberación controlada de fármacos y la terapia dirigida, ya que presentan características mejoradas con respecto a los anticuerpos, tanto en la aplicabilidad clínica como en el proceso

de producción. Entre sus ventajas destacan la síntesis sencilla y controlada, posibilidad de modificación química, elevada estabilidad en suero, ilimitado número de ligandos, alta resistencia a cambios de temperatura, pH y disolventes y ausencia de toxicidad e inmunogenicidad *in vivo* (5). La principal estrategia empleada con aptámeros ha sido la conjugación de estos a fármacos y nanosistemas, de forma que dirijan el principio terapéutico a la diana deseada.

En nuestro proyecto nos centraremos en el aptámero ApTLR#4F, que ha sido desarrollado para unirse específicamente al receptor tipo Toll 4 (TLR4) por el grupo de “Aptámeros” del Hospital Universitario Ramón y Cajal, dirigido por el Dr. González, y en colaboración con la Universidad de Investigación Neurovascular de la Facultad de Medicina (4). Este receptor ha sido ampliamente estudiado por su estrecha asociación con inflamación. Tras una lesión isquémica se activa, y desempeña un papel fundamental en la activación de la inmunidad innata y respuesta inflamatoria. Así, se ha visto implicado en un gran número de patologías muy prevalentes, como el ictus, el infarto agudo de miocardio, la aterosclerosis, la sepsis, la esclerosis múltiple, el dolor agudo y crónico, la carcinogénesis, etc. Sin embargo, los fármacos capaces de modular el TLR4 son escasos, por lo que existe un interés por desarrollar agonistas y antagonistas de este receptor que amplíen el tratamiento de las enfermedades en las que TLR4 desempeña un papel crucial (5). En este sentido, los aptámeros pueden responder a esta necesidad aportando un enfoque óptimo para estas enfermedades debido a su perfil farmacocinético, que permite una rápida actuación, escasa toxicidad, a lo que se suman las ventajas propias de los aptámeros descritas anteriormente. Concretamente, el grupo del Dr. Gonzalez ha demostrado la especificidad del ApTLR#4F por el receptor TLR4, así como su efecto protector contra el ictus, en el cual, TLR4 juega un papel etiopatológico (5). Esto podría suponer un gran avance en el tratamiento de la fase aguda de esta enfermedad, cuya única opción farmacológica sólo es aplicable en el 5% de los pacientes.

3. UNIÓN DE rAAV y APTÁMEROS

Uniando el potencial de los rAAV en el transporte dirigido y la terapia génica, junto a la especificidad de unión que ofrecen los aptámeros, nosotros proponemos la incorporación química de aptámeros a los AAV de manera dirigida, de forma que se consiga un tropismo dirigido hacia una diana celular concreta. Para ello, nos basamos en una estrategia de manipulación de AAVs recientemente descrita por el grupo del Dr.Mali (3), el cual, en febrero de 2018, publicó el diseño de un vector AAV modificado genéticamente que adquiriría la capacidad de incorporar oligonucleótidos, por ejemplo aptámeros, en sitios específicos de su cápside viral mediante simples reacciones químicas (“click chemistry”).

La modificación genética permite la incorporación de aminoácidos no naturales (UAA), en las proteínas de la cápside. Para ello se emplea el “Sistema de Incorporación de aa no naturales en células de mamíferos mediante el par ortogonal de ARNt/aminoacil-ARNt sintetasa (ARNt/aaRS) y Factor de Terminación de la Traducción Eucariótica 1 (eTF1) optimizado” (21). Esta modificación genética consiste en la incorporación de un codón de parada (TAG) en el gen que codifica para las VPs (gen cap). En presencia del tRNA y eTF1 optimizados, se

expresará incorporando de manera co-traduccional, el aa no natural (UAA) en el dominio específico modificado. Este UAA lleva un grupo funcional azida, lo cual permitirá la exposición de brazos químicos ortogonales en la superficie de la cápside, a los que se le puede unir cualquier molécula que presente un grupo alquilo (reacción de cicloadición de azida-alquino de Huisgen o “click chemistry”) (Figura 4).

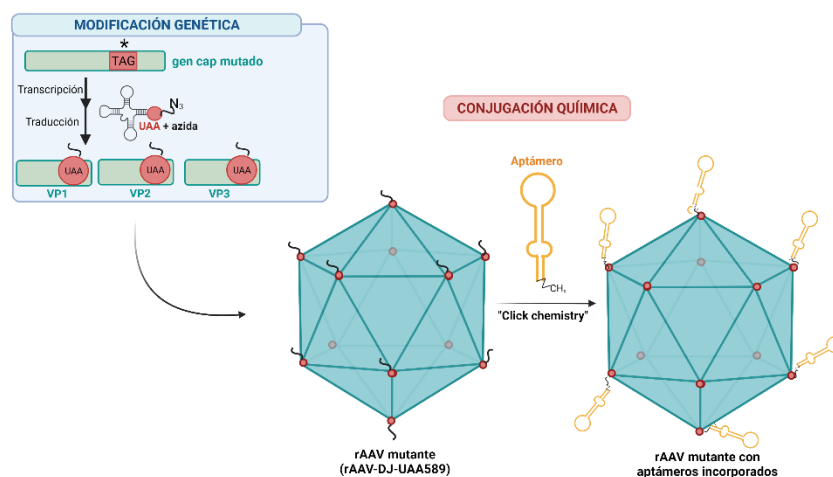


Figura 4. Estrategia de manipulación de rAAVs mixta: genética y química. Elaboración propia empleando herramienta BioRender.

Arriba a la izquierda, modificación genética del gen cap (introducción del codón de parada TAG), para la generación de rAAVs con aminoácidos no naturales incorporados. A la derecha, conjugación química de aptámeros al rAAV modificado.

Este nuevo sistema de inserción de aptámeros en sitios específicos de la cápside viral, desde el punto de vista del tropismo viral, en comparación con la incorporación de péptidos o *single-chains* en la cápside, permite una mayor conservación de la configuración del aptámero así como de la cápside viral, aspecto clave para mantener la funcionalidad del rAAV, y la afinidad del aptámero por su diana celular. A esto se le añade las ventajas que ofrecen los aptámeros en cuanto a seguridad, eficacia y sencillez de producción. Con respecto a las terapias con aptámeros, la unión de estos a la cápsida viral permitirá una biodistribución más eficaz y específica en comparación con el aptámero solo o conjugado a nanopartículas. Las nanopartículas, a pesar de haber surgido como herramientas prometedoras, presentan menor seguridad y eficacia *in vivo* que los vectores virales, puesto que son rápidamente eliminadas en sangre antes de alcanzar el tejido diana (22), por ello, los sistemas virales siguen siendo los sistemas de transporte dirigido más utilizados en la actualidad (23).

La hipótesis de nuestro proyecto es que mediante el sistema de incorporación de aminoácidos no naturales en sitio específico, podemos unir químicamente el aptámero de unión a TLR4. Esto permitirá redirigir el vector viral hacia células que presenten una alta expresión de dicho receptor, consiguiendo una terapia más específica.

El objetivo principal de nuestro trabajo es la producción de rAAVs modificados genéticamente de forma que incorporen un aminoácido no natural en las proteínas de la cápside. Para ello, nos proponemos:

1. Optimización del proceso de producción de vectores adeno-asociados de serotipo AAV-2 y AAV-DJ con inserciones de UAA en la cápside viral.
 - 1.1. Optimización de la producción a baja escala de rAAV-2 y rAAV-DJ *wild-type*.
 - 1.2. Optimización de la producción a baja escala de rAAV-2 y rAAV-DJ modificados genéticamente (rAAV-2-UAA587 y rAAV-DJ-UAA589).
2. Producción a gran escala de vectores adeno-asociados de serotipo DJ inserciones de UAA en la cápside viral.
 - 2.1. Producción y purificación mediante gradiente de iodixanol y diafiltración de rAAV-DJ y rAAV-DJ-UAA589.
 - 2.2. Detección de partículas virales.
 - Detección de proteínas de la cápside viral (VPs)
 - Detección de partículas virales génicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Mantenimiento células de empaquetamiento AAV293.

La línea celular empleada es AAV293 (Cell Biolabs INC.), células empaquetadoras de vectores adeno-asociados. Las células son descongeladas y sembradas en medio DMEM alto en glucosa, con glutamina y antibiótico, al 20% de suero FBS descomplementado. Las posibles contaminaciones se controlan empleando medio sin antibiótico, y la viabilidad celular mediante tinción Trypan Blue. Se realiza un pase de las células en expansión cuando llegan a confluencia y se siembran en placas P100 en medio DMEM alto en glucosa y piruvato, con glutamina y antibiótico, al 10% de suero FBS. Las células se utilizan como células empaquetadoras de vectores adeno-asociados hasta alcanzar un número máximo de pase 20.

2. Maxipreparaciones endofree Quiagen y digestiones plásmidicas.

Se realizan maxipreparaciones plasmídicas siguiendo el kit Quiagen endofree. Para ello, se parte de glicerolados al 25 % de glicerol para cada plásmido. El día anterior a la

maxipreparación se realiza un cultivo de 150-200 ml de LB con ampicilina a 100 mg/ml, partiendo de un preinóculo de 2-3 ml de LB con ampicilina en la misma concentración de stocks bacterianos conteniendo cada plásmido y guardados a -80°C en 50% de glicerol. Se deja incubando toda la noche en agitación a 37°C. El día de la maxipreparación se sigue el protocolo establecido en el kit Quiagen hasta obtener el ADN plasmídico, que es resuspendido en 200 µl de H₂O. A continuación, se mide la concentración del ADN mediante nanodrop a 260 nm y se comprueba que la relación 260/280 es menor de 2 y los plásmidos se conservan a -20°C hasta su uso.

Posteriormente, los plásmidos son sometidos a digestión enzimática con enzimas de restricción. Los plásmidos amplificados son los siguientes: pAAVrep2/cap2 (Addgene), pAAVrep2/capDJ (Addgene), pAAV.IRES.hrGFP (Stratagene), pITR Basic CMV eGFP y (Applied Viromics), pAdDf6 (Pennvector), pAAVDJ-N589X, pAAV2-N587X, pCAG-ETF1-E55D-1(Addgene), y pAcBac1.tR4-MbPyl-1(Addgene). Las enzimas de restricción empleadas son: NotI, NdeI, XbaI, HindIII, EcoRV y BamHI. Se utiliza el tampón de restricción indicado para cada enzima o el más óptimo en caso de digestiones combinadas. Las digestiones se incuban a 37°C entre 1-2 horas. El resultado (ANEXO I) se visualiza en un gel de agarosa al 0,8% y es comparado con el mapa de restricción teórico de cada plásmido (ANEXO II).

3. Generación de vectores AAV a baja escala en células empaquetadoras AAV293.

3.1. Transfección de células AAV293 con PEIpro.

El día anterior a la transfección se siembran entre 3 y 4 millones de células por P100 (1 o 2 P100 por virus). El día de la transfección se elimina el medio de las células, y se añade 10 ml de medio DMEN u Optimem, con 2% de FBS o sin suero, según las condiciones establecidas. En el caso de la producción de vectores virales mutantes, se añade, además, 2 mM del aa no natural (N-epsilon-((2-Azidoethoxy)car-bonyl)-L-lysine) dos horas antes de la transfección.

Se preparan 15 µg de ADN obtenido de maxipreparaciones endofree Quiagen a una pureza $A_{260}/A_{280} > 1,8$ en la siguiente relación: 6,4 µg pHelper AdDf6 (vector de expresión de las proteínas adenovirales E4, E2a y VA); 2,2 µg pAAV rep/cap (vector de expresión de las proteínas Rep y Cap del serotipo correspondiente); 6,4 µg pAAV-GFP (vector de expresión del fluoróforo GFP empleado para la detección de las partículas virales por microscopia de fluorescencia). En el caso de la producción de virus mutantes la relación fue: 4,5 µg pHelper AdDf6; 1,5 µg pAAVDJ-N589X-1 y pAAV2-N587X (vectores de expresión de las proteínas Rep y Cap de cada serotipo mutada); 3 µg pAAV ITR dsDNA GFP; 4,5 µg pAcBac1.tR4-MbPyl-1 (vector de expresión del tRNA optimizado); 1,5 µg pCAG-ETF1-E55D-1 (vector de expression de EF1). A continuación, se añade DMEN/ Optimem sin suero ni antibiótico a un volumen final de 250 µl. Por otro lado, se añaden entre 15-25 µl.de PEIpro a 225 µl de DMEN/ Optimem. Por último, se añaden los 250 µl de PEI + DMEN/Optimem en los 250 µl de plásmido + DMEN/Optimem. Se agita con el *vortex* y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente. Tras esto, se añade la mezcla gota a gota a las células mientras se mueve la placa suavemente. Finalmente, las células se incuban entre 4-6 h a 37°C.

Transcurrido este tiempo se elimina el medio y se cambia por DMEN con antibiótico al 10% FBS.

3.2. Transfección de células AAV293 con fosfato cálcico.

El día anterior a la transfección se siembran 3,5 millones de células por cada P100 (entre 1 y 2 P100 por virus). El día de la transfección se elimina el medio de las células y se añade 5 ml de medio Optimem con 2% de FBS sin suero añadido, según las condiciones establecidas. Se preparan 15 µg de ADN en la siguiente relación para los *wild-type*: 15 µg pHelper AdDf6; 5 µg pAAV rep/cap; 15 µg pAAV-GFP. En el caso de la producción de virus mutantes la relación fue: 15 µg pHelper AdDf6; 10 µg pAAVDJ-N589X-1; 15 µg pAAV ITR dsDNA GFP; 15 µg pAcBac1.tR4-MbPyl-1; 1 µg pCAG-ETF1-E55D-1. A continuación, se añaden 1270 µl de H₂O + 183 µl de CaCl₂ 2M + 1,5 ml HBS (soluciones preparadas y filtradas previamente). La mezcla se mezcla y se incuba 20 minutos a RT. Finalmente, se añade por goteo a las células mientras se mueve la placa suavemente. Tras 5-7 horas post-transfección, se elimina el medio y se añade DMEN con antibiótico al 10% FBS.

3.3. Recogida vectores virales del extracto celular.

Tras 72-96 horas de la transfección, se elimina el sobrenadante celular, y las células se levantan empleando un raspador con 1 ml de PBS. Las células recogidas se lisan mediante 3 procesos de congelación/descongelación (10 minutos en hielo seco con etanol y 10 minutos a 37°C). Tras esto se centrifuga el extracto celular y se recoge el sobrenadante del extracto celular. Las alícuotas obtenidas se guardan a -80°C en ultracongelador.

4. Generación de vectores AAV a gran escala en células empaquetadoras AAV293.

4.1. Transfección de células AAV293 con PEIpro y Recogida vectores virales.

El proceso de transfección es idéntico al descrito en el apartado 2.1, empleándose medio Optimem sin suero añadido. En el proceso de recogida de vectores virales, se recoge, por un lado, el sobrenadante (SN) celular que es filtrado en cafeteras de 250 ml de poro de acetato de celulosa y se precipita con polietilenglicol (PEG) al 8 % a 4°C entre 72-96 horas. Por otro lado, las células son recogidas según el apartado 2.3, posteriormente se centrifugan, el sobrenadante se elimina y el pellet celular se congela a -80°C entre 72-96 horas.

4.2. Purificación en gradiente de iodixanol de las partículas virales.

Tras 72-96 horas de la transfección, por un lado, se recogen las células transfectadas en 1 ml de PBS por cada P100 y se lisan mediante 3 procesos de congelación/descongelación (10 minutos en hielo seco con etanol y 10 minutos a 37°C). Por otro lado, se recoge el sobrenadante celular. Ambos se centrifugan y el pellet del sobrenadante celular es resuspendido con el extracto celular. La mezcla se incuba con Bezonsa 15 minutos a 37°C. A continuación, se centrifuga y el sobrenadante resultante será el extracto viral a filtrar.

Para la purificación de las partículas virales en gradiente de densidad, se añaden a tubos de ultracentrífuga las siguientes soluciones: 15 ml del extracto viral, 9 ml de solución 15% Iodixanol, 6 ml de solución 25% Iodixanol + 15 microl de rojo fenol al 0,5%, 5 ml de

solución 40% de iodixanol y 5 ml de solución 57% de iodixanol + 15 microl de rojo fenol al 0,5%. Se centrifuga a 16°C durante 2 horas y media. Por último, se recoge la banda correspondiente al AAV mediante punción con jeringa de insulina. Las partículas virales purificadas con alícuotas y guardadas a -80°C. (Finalmente la purificación en gradiente de densidad no se pudo realizar debido a fallos en el equipo de ultracentrifugación).

4.3. Concentración y diafiltración de las partículas virales.

Para la diafiltración, se añaden 5 ml del extracto celular a 10 ml de PBS con 5% de sacarosa y utilizando filtros de retención de 100 kDa, se centrifuga a 4000 rpm hasta que fueron concentrados hasta obtener un volumen entre 1 y 2 ml. Se repite el proceso 3 veces. Se realizaron alícuotas de entre 100 y 200 µl del Concentrado Viral, así como del Eluido Viral, y se guardaron a -80°C.

5. Titulación de vectores virales AAV.

5.1. Infección de células AAV293 con vectores AAV.

El día previo a la infección se siembran alrededor de 200.000 células AAV293 por pocillo en placas M6. El día de la infección se elimina el medio y se añade 1 ml de medio sin suero con las cantidades de virus correspondientes. Se incluye un MOCK de células sin infectar. A las 4-6 horas se retira el virus y se añade DMEM 10% FBS.

5.2. Titulación por citometría de flujo de Unidades de Transducción positivas.

Transcurridas 73-96 horas post-infección, se observan las células bajo microscopía óptica de contraste de fases y filtro de fluorescencia de 488 nm. A continuación, se elimina el medio y las células se recogen en 1 ml de PBS para su análisis mediante el citómetro de flujo MACS Quant de la UFV. Las condiciones de medida se ajustan utilizando un MOCK con el cual se selecciona la población y se ajustan los parámetros, así como se establece un umbral del 1% de células positivas. De esta forma se cuantifica el porcentaje de células GFP positivas dentro de la población de singletes en las diferentes muestras. Se analizan 10.000 eventos de cada muestra. Una vez recogidos los datos, se calcula el número de Unidades de Transducción Positivas por ml mediante la siguiente ecuación: $UT+/ml = (\% \text{ de infección} / 100) \times (n^{\circ} \text{ de células/volumen de SN viral})$.

5.3. Titulación por partículas virales.

Se realiza un gel desnaturante de acrilamida al 7,5%. Se utiliza BSA a 2mg/ml como control de concentración. Se añaden 6 µl de tampón Laemmli 4x a 20 µl de muestra y se hierven 10 min a 99°C. Se cargan 20 µl por muestra y se corre el gel hasta que el frente alcance el final. Finalmente, el gel es teñido con tinción fluorescente SYPRO ruby. Para ello, el gel se incuba 15 minutos con metanol al 50 % y ácido acético al 7% (se repite 2 veces), posteriormente se incuba con SYPRO ruby toda la noche, finalmente, el gel teñido se incuba con metanol al 10% y ácido acético al 7% 30 min para su lavado, y se observa en el campo de fluorescente del "ChemiDoc MP Imaging System (BioRad)".

5.4. Titulación por ADN viral.

En primer lugar, se extrae el ADN viral de las muestras empleando el “Kit de Alta Pureza de Ácidos Nucleicos Virales” (Roche), utilizando columnas con filtros de alta afinidad al ADN hasta obtener el extracto viral purificado. Tras la extracción del ADN se cuantifica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Para ello, se emplea una máster mix optimizada para qPCR “IQ SYBER Green Super Mix”, que contiene iTaq Polimerasa, dNTPs, MgCl₂, SYBER Green, enhancers, estabilizadores y fluoresceína. Los primers empleados son los oligonucleótidos ITR *forward* y *reverse* a 100 nM, y como control se emplea el plásmido pAAV-IRES-hrGFP (utilizado en la producción a gran escala de rAAV-DJ y rAAV-DJ-N589-UAA) a diferentes concentraciones tras diluciones seriadas 1/10, partiendo de una concentración de 1,4 µg /µl. Se realizan duplicados de todas las muestras y se programa la RT-qPCR con los siguientes ciclos: “Desnaturalización”: 3 min 95°C, Amplificación: 40 ciclos de 95°C x 15 segs y 60°C X 1 min. “Análisis de la Curva de Melt”: 55-95°C incremento 2 segs por paso. Con los umbrales de ciclo o *cycle threshold* (CT) resultantes de los controles se realiza una recta patrón del CT frente a log en base 2 de la concentración de ADN. Sobre esta recta se extrapolan los valores para las muestras analizadas y se calcula la concentración de ADN de cada muestra. Finalmente, para calcular el número de partículas virales presentes en cada muestra, se divide la cantidad de ADN que hay en una partícula viral ($2,47 \times 10^{-12}$ µg) entre el ADN obtenido en cada muestra.

RESULTADOS

1. Optimización del proceso de producción de vectores adeno-asociados de serotipo AAV-2 y AAV-DJ con inserciones de UAA en la cápside viral.

Nuestro objetivo principal fue la producción de rAAVs modificados genéticamente para la incorporación de aminoácidos no naturales en sitio específico, con la idea de la posterior incorporación de aptámeros mediante reacción química. Para ello, el primer objetivo que nos planteamos fue la optimización del sistema de producción, puesto que la incorporación de un aminoácido no natural en la secuencia polipeptídica de las proteínas VPs de la cápside disminuye drásticamente su producción (3).

1.1. Producción de vectores virales rAAV-2 y rAAV-DJ a baja escala.

En primer lugar, nos propusimos identificar las condiciones de transfección que permitiesen una mayor producción de vectores virales. Para ello, realizamos producciones de adeno-asociados *wild-type* a baja escala en diferentes condiciones. La producción se realizó mediante transfección transitoria libre de virus *helper* de células AAV293 con los siguientes plásmidos: el vector helper pAdDDF6, codificante para las proteínas adenovirales E4, E2a y VA; el vector cap/ rep, pAAVrep/cap, que codifica para las proteínas de la cápside, Rep

correspondiente al serotipo 2 y Cap correspondientes a cada serotipo; y el vector de transferencia génica de cadena sencilla expresando el fluoróforo hrGFP pAAV-IRES-hrGFP o de cadena doble pAAV-DS-CMV-GFP. Se eligieron los serotipos 2 y DJ *wild-type* para analizar el mejor sistema de transfección, ya que los virus mutantes que produciremos pertenecen a dichos serotipos (rAAV-2-N587-UAA, derivado de rAAV-2, y rAAV-DJ-N589-UAA, derivado de rAAVDJ; cedidos amablemente por el grupo del Dr. Mali (3)).

En la primera producción, se establecieron las siguientes condiciones de transfección: 4 millones de células AAV293 transfectadas, medio sin suero, 15 µl de PEIpro (reactivo de transfección optimizado basado en PEI para la obtención de títulos virales superiores) y 15 µg totales de ADN (6,4 µg pHelper AdDf6; 2,2 µg pAAV rep/cap; 6,4 µg pAAV-GFP). Tras 72 horas, se analizó la eficiencia de transfección mediante observación en microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación de 488nm, así como, se analizó el daño celular mediante visualización con el objetivo de contraste de fases. En ambos serotipos, rAAV-2 y rAAV-DJ, y con el uso de ambos vectores de transducción, ssDNA y dsDNA, observamos una elevada muerte celular, aunque la eficiencia de transfección en las células sanas fue muy elevada (**figura 5 A y B, izquierda**). Posteriormente, aislamos las partículas virales mediante centrifugación de las células transfectadas y lisis del pellet celular en 3 ciclos de congelación/descongelación, según lo indicado en el apartado de materiales y métodos. Estas partículas virales se repartieron en alicuotas y se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Para estudiar la capacidad de transducción de los vectores virales, es decir, de introducir material genético en células diana, se transdujeron células AAV293 con diferentes cantidades de virus purificado, en busca de transducciones menores del 25% para evitar la co-infección de células con más de una Unidad de Transducción en el momento de su titulación. Tras 5-7 días de la infección, se evaluó el resultado de manera cualitativa, mediante imágenes de microscopía de fluorescencia con un filtro de excitación de 488nm, y cuantitativa, mediante citometría de flujo y cuantificación de células GFP+, según se indica en materiales y métodos, con lo que se calculó el número de Unidades de Transducción Positivas (UT+) por ml, según se describe en el apartado de materiales y métodos. Como resultado, no se encontraron células verdes, es decir, infectadas, tras la infección con rAAV-2. En la infección con AAV-DJ se observaron células verdes, sin embargo, la muerte celular fue muy elevada. Sin embargo, mediante cuantificación de células GFP+ por citometría de flujo, obtuvimos, en varios serotipos, un título viral del orden de 10^5 UT+/ml, observándose un incremento de cerca del doble en el caso del serotipo rAAV-DJ con respecto al serotipo rAAV-2, en el que no se observaron células GFP+, probablemente debido a una baja intensidad de fluorescencia. Por otro lado, no se observaron grandes diferencias en el título viral dentro del mismo serotipo entre vectores ssDNA y dsDNA ($1,1 \times 10^5$ UT+/ml en rAAV-2 ssDNA frente a $1,2 \times 10^5$ UT+/ml en rAAV-2 dsDNA; $2,5 \times 10^5$ UT+/ml en rAAV-DJ ssDNA frente a $1,8 \times 10^5$ UT+/ml en rAAV-DJ dsDNA) (**figura 5 A y B, derecha**).

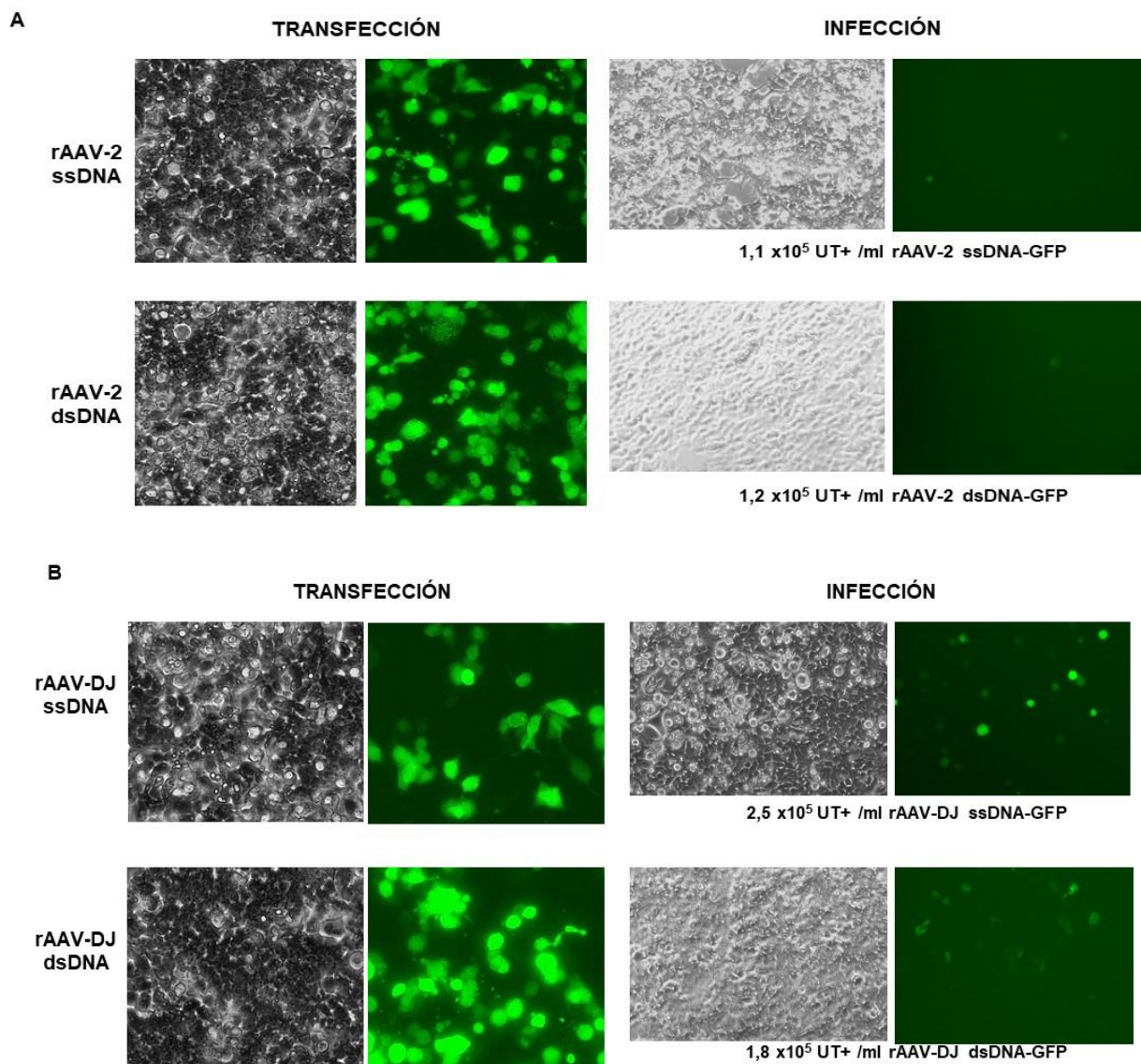


Figura 5. Producción de vector adeno-asociado rAAV-2 y rAAV-DJ.

Imágenes de microscopía óptica bajo contraste de fases y filtro de fluorescencia de 488 nm de células AAV293 72h post-transfección (2 paneles izquierdos) y células AAV293 5-7 días post-transducción (2 paneles derechos). Serotipo AAV-2 (A). Serotipo AAV-DJ (B). La titulación por Unidades de Transducción Positivas (UT+) se determinó mediante cuantificación de células GFP positivas a través de citometría de flujo utilizando como control negativo células sin trasducir (MOCK). Condiciones descritas en materiales y métodos.

Tras los resultados de la primera producción, se modificaron las condiciones de transfección con el objetivo de aumentar la viabilidad celular. Para ello se redujo el número de células transfectadas a 3 millones en busca de una menor confluencia celular en la transfección, y se utilizó medio con 2% de suero. Con estas condiciones, produjimos rAAV-DJ ssDNA y rAAV-DJ dsDNA (**figura 6**), de esta forma, se consiguió una elevada viabilidad celular, sin embargo, la eficiencia de transfección fue menor. Posteriormente, transdujimos células AAV293 con los virus rAAV-DJ obtenidos tras la lisis celular. Como resultado, se visualizaron en el microscopio

de fluorescencia células GFP+ que contenían el vector viral. Sin embargo, tras la cuantificación de células GFP + mediante citometría de flujo, se observó una disminución de entre 2 y 4 veces en el número de partículas virales infectivas obtenidas con respecto a las condiciones anteriores de transfección ($8,3 \times 10^4$ frente a $2,5 \times 10^5$ UT+/ml, en el caso de vectores rAAV-DJ ssDNA; y $4,7 \times 10^4$ frente a $1,8 \times 10^5$ UT+/ml, en el caso de vectores rAAV-DJ dsDNA). Además, observamos diferencias en cuanto al uso de vectores de transducción dsDNA o ssDNA, siendo el título viral casi el doble tras la infección con rAAV-DJ ssDNA ($8,3 \times 10^4$ UT+/ml) con respecto a rAAV-DJ dsDNA ($4,7 \times 10^4$ UT+/ml).

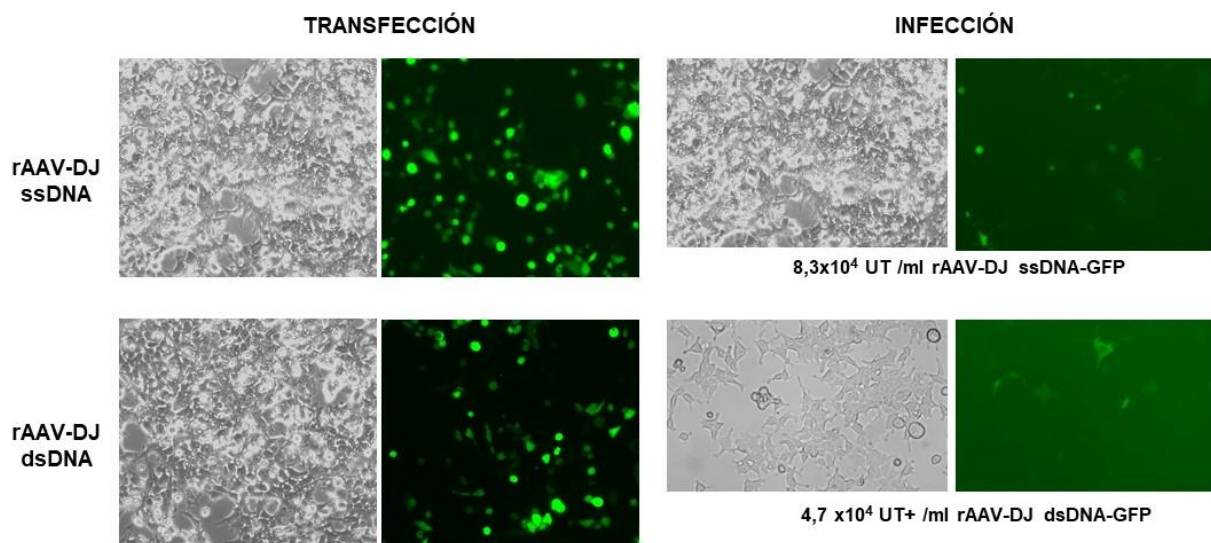


Figura 6. Producción de vector adeno-asociado rAAV-DJ.

Imágenes de microscopía óptica bajo contraste de fases y filtro de fluorescencia de 488 nm de células AAV293 72h post-transfección (2 paneles izquierdos) y células AAV293 5-7 días post-transducción (2 paneles derechos). La titulación por Unidades de Transducción Positivas (UT+) se determinó mediante cuantificación de células GFP positivas a través de citometría de flujo utilizando como control negativo células sin transducir (MOCK). Condiciones descritas en materiales y métodos.

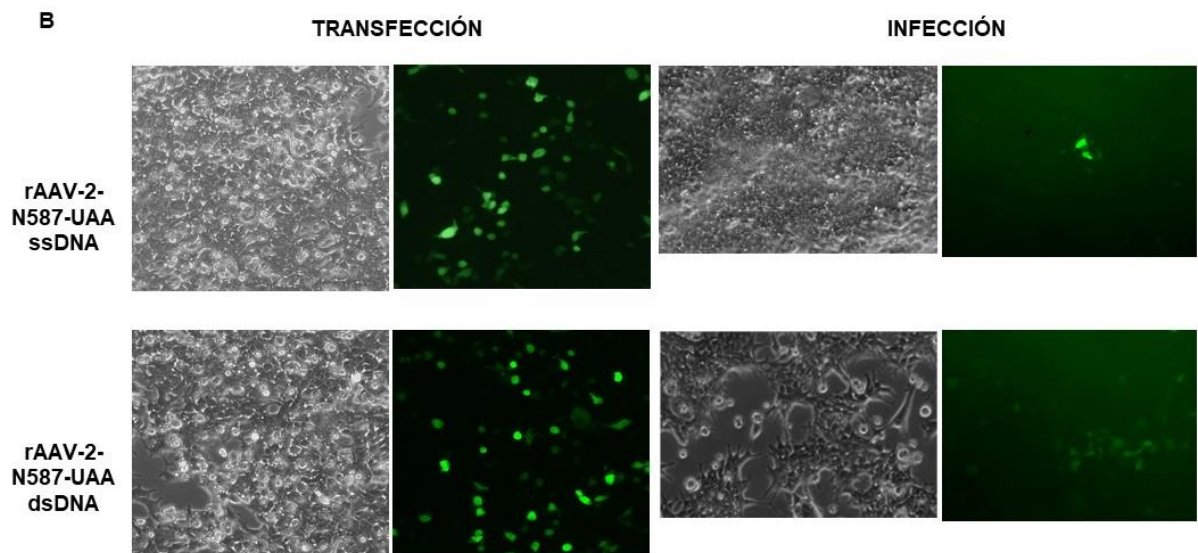
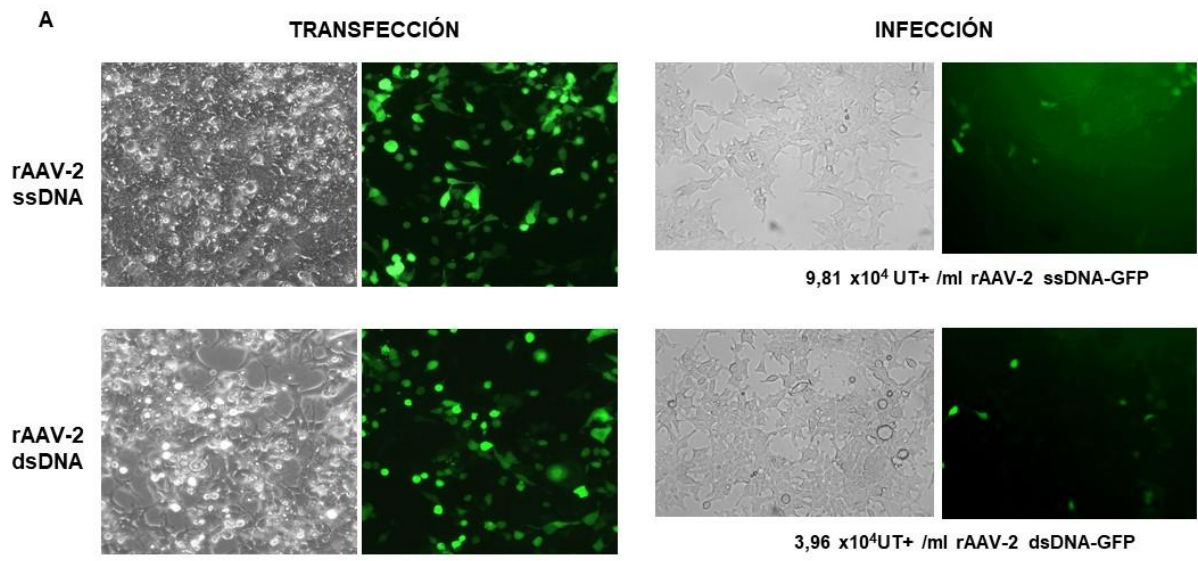
1.2 Producción de vectores virales rAAV-2-N587-UAA y rAAV-DJ-N589-UAA a baja escala.

Una vez comprobada la obtención de vectores virales rAAV-2 y rAAV-DJ *wild-type* mediante la transfección con PEI, con un título viral obtenido de aproximadamente 10^5 UT+/ml, procedimos a la producción de los vectores virales con aminoácidos no naturales incorporados en sitio específico: rAAV-2-N587-UAA ssDNA GFP, rAAV-2-N587-UAA dsDNA GFP, rAAV-DJ-N589-UAA ssDNA GFP y rAAV-DJ-N589-UAA dsDNA GFP, al mismo tiempo que se siguió optimizando el proceso de producción. Estos vectores adeno-asociados contienen un codón de parada (TAA) en su secuencia para la incorporación de un aminoácido no natural de manera co-traducciona.

En la producción de vectores virales mutantes, las células fueron incubadas en medio Optimem en presencia del aminoácido no natural N-epsilon (2-azidoetoxi) carbonil) L-Lisina. Los plásmidos empleados para la transfección fueron: el vector helper, pAdDDF6; el vector cap/ rep mutante, pAAV RC-2-578TAG o pAAV RC-DJ-N589TAG, que codifica para las proteínas de la cápside de serotipos 2 y DJ (adición de un codón de parada en sitio-específico; generados por *Katrekar et al* (3); y los vectores de expresión de GFP, pAAV-IRES-hrGFP y pAAV-DS-CMV-GFP. Además, se emplearon dos plásmidos adicionales necesarios para que las proteínas de la cápside incorporen el aminoácido no natural, en el sitio del codón de parada, en lugar de que finalice la transcripción, estos son el vector de expresión de eTF1, pCAG-ETF1-E55D-1, que codifica para el factor de liberación 3 de eucariotas, y el vector de expresión de tRNA, pAcBac1.tR4-MbPyl-1 que codifica para un ARN de transferencia optimizado, ambos generados por *Katrekar et al*, (3).

En la producción anterior, con la incorporación de suero en el medio en la transfección, la viabilidad celular había sido alta pero la eficiencia baja. Por ello, en la siguiente producción se aumentó la concentración de PEIpro con el objetivo de aumentar la eficiencia. Así, se produjeron los vectores rAAV-2 ssDNA y dsDNA (control), rAAV-2 y rAAV-DJ mutates ssDNA y dsDNA (rAAV-2-N587-UAA ssDNA GFP, rAAV-2-N587-UAA dsDNA GFP, rAAV-DJ-N589-UAA ssDNA GFP y rAAV-DJ-N589-UAA dsDNA GFP) empleando las siguientes condiciones: 3, 5 millones de células AAV293, medio con 2% de suero y 25 µl de PEIpro. La viabilidad celular, así como la eficiencia de transfección fue alta en los tres casos, siendo esta ligeramente mayor en el control (rAAV-2) con respecto a los mutantes (**Figura 7 A y B, izquierda**).

Posteriormente, recogimos los virus producidos mediante procesos seriados de congelación y descongelación y se conservaron en alícuotas a -80°C. Con ellos transdujimos células AAV293. Como resultado, observamos por microscopia de fluorescencia células verdes infectadas tanto con el *wild-type* de serotipo 2, como con los mutantes. En el resultado de la titulación por citometría, en el control observamos, al igual que en la producción anterior, menor número de partículas virales infectivas con respecto a la primera producción ($9,81 \times 10^4$ frente a $1,1 \times 10^5$ en vectores rAAV-2 ssDNA y $3,96 \times 10^4$ frente a $1,2 \times 10^5$, en el caso de vectores rAAV-2 dsDNA). Respecto a los mutantes, aunque pudimos detectar algunas células positivas mediante visualización con el microscopio de fluorescencia, el porcentaje de células verdes positivas era tan pequeño que no pudieron ser detectadas mediante cuantificación por citometría y los resultados no se consideraron significativos debido a la proximidad del porcentaje de células GFP + de esta muestra al del MOCK (1%) (**figura 7, derecha**).



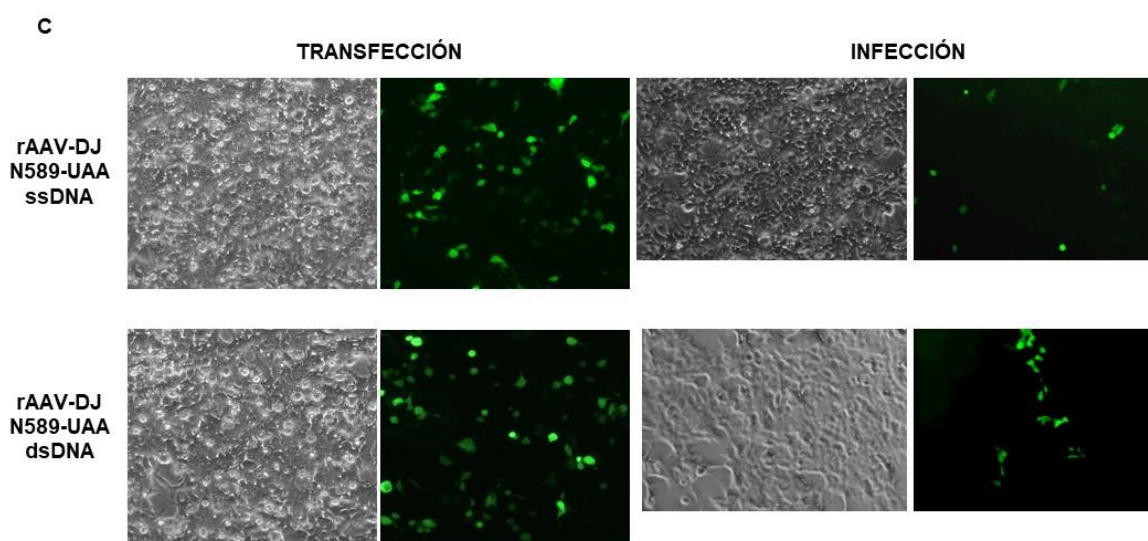


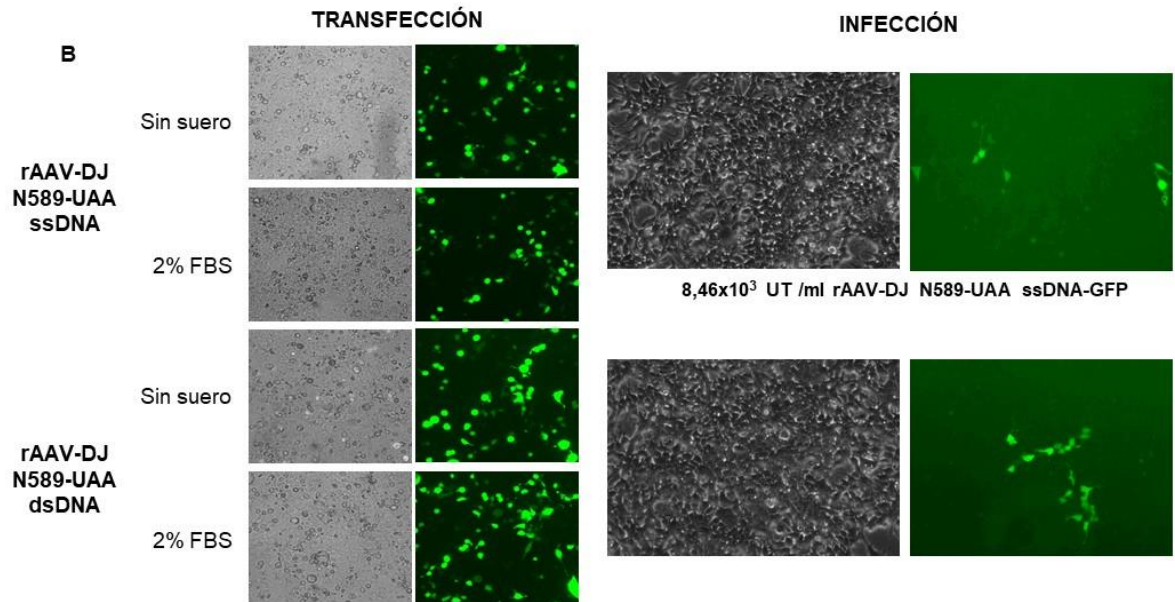
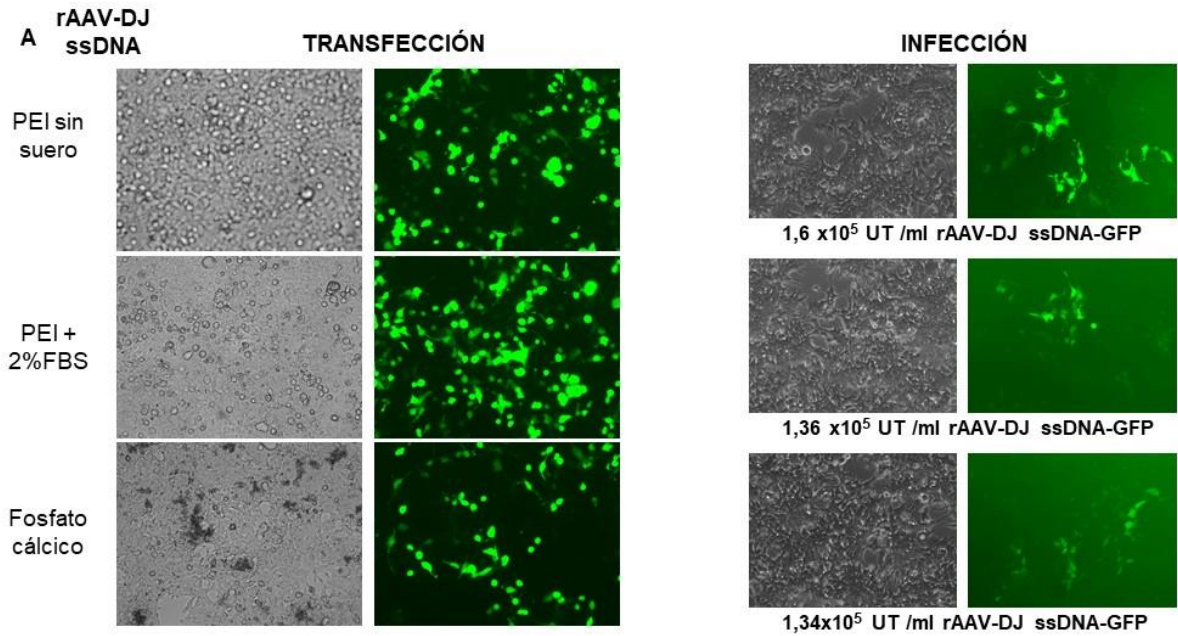
Figura 7. Producción de vector adeno-asociado rAAV-2, rAAV-2-N587-UAA y rAAV-DJ-N589-UAA.

Imágenes de microscopía óptica bajo contraste de fases y filtro de fluorescencia de 488 nm de células AAV293 72h post-transfección (2 paneles izquierdos) y células AAV293 5-7 días post-transducción (2 paneles derechos). Serotipo AAV-2 (A). Serotipo AAV-2 mutante (B). Serotipo AAV-DJ mutante (C). La titulación por Unidades de Transducción Positivas (UT+) se determinó mediante cuantificación de células GFP positivas a través de citometría de flujo utilizando como control negativo células sin trasducir (MOCK). Condiciones descritas en materiales y métodos.

Debido al bajo título obtenido en rAAV-2 y en los mutantes, volvimos a evaluar las condiciones de transfección en el serotipo rAAV-DJ utilizando tres condiciones diferentes: 1) PEI sin suero, medio Optimem, 2) PEI con 2% de FBS, medio Optimem y 3) Fosfato cálcico sin suero, en medio Optimem, con el objetivo de seleccionar la más eficaz para su uso en la producción a gran escala. En el caso de los mutantes, únicamente utilizamos PEI con suero y sin suero en Optimem para determinar cuál de los cuatro mutantes rAAV-2-N587-UAA ssDNA GFP, rAAV-2-N587-UAA dsDNA GFP, rAAV-DJ-N589-UAA ssDNA GFP y rAAV-DJ-N589-UAA dsDNA GFP, mostraba un título de producción mayor y seleccionarlo en la producción a gran escala.

Los controles de la transfección (rAAV-DJ ssDNA GFP) mostraron una menor eficiencia de transfección en células transfectadas con fosfato cálcico con respecto a las células transfectadas con PEI, sin detectar diferencias claras entre la transfección con PEI en presencia o ausencia de suero (**figura 8A, paneles de la izquierda**). Posteriormente, transdujimos células AAV293 con los virus obtenidos tras la lisis celular, y como resultado, se obtuvo un alto número de célulasGFP+, con un título viral elevado en el control (orden de magnitud de 10^5). El mejor resultado se obtuvo tras la infección de rAAV-DJ ssDNA GFP producidos con PEI sin suero, en comparación a los producidos con PEI con suero o con fosfato cálcico, aunque no hubo diferencias destacables de titulación entre las tres condiciones ($1,6 \times 10^5$ UT+/ml, PEI sin suero; $1,36 \times 10^5$ UT+/ml, PEI con suero; y $1,34 \times 10^5$ UT+/ml, Fosfato cálcico), (**figura 8A, derecha**). Por otro lado, en los mutantes, se consiguió una elevada eficiencia de transfección en todas las condiciones tanto con los serotipos AAV-DJ como con AAV-2 y tanto con el vector ssDNA como con el vector dsDNA (**figura 8 B y C**,

paneles de la izquierda). Se visualizaron células GFP + 7 días post-transducción en todos los mutantes, pese a la única detección mediante citometría de flujo de células GFP+ en el caso de rAAV-DJ-N589-UAA ssDNA. (figura 8B y C, derecha).



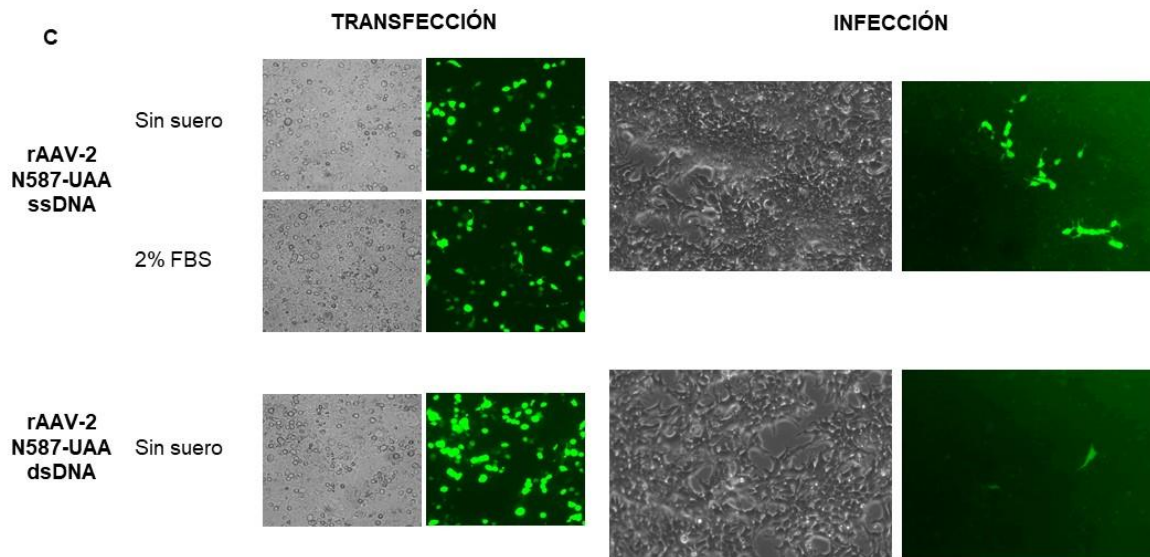


Figura 8. Producción de vector adeno-asociado AAV-DJ, rAAV-2-N587-UAA y rAAV-DJ-N589-UAA en diferentes condiciones.

Imágenes de microscopía óptica bajo contraste de fases y filtro de fluorescencia de 488 nm de células AAV293 72h post-transfección (2 paneles izquierdos) y células AAV293 5-7 días post-transducción (2 paneles derechos). Serotipo AAV-DJ (A). Serotipo AAV-2 mutante (B). Serotipo AAV-DJ mutante (C). La titulación por Unidades de Transducción Positivas (UT+) se determinó mediante cuantificación de células GFP positivas a través de citometría de flujo utilizando como control negativo células sin trasducir (MOCK). Condiciones descritas en materiales y métodos.

En la última producción se consiguió una alta eficiencia de transfección en los *wild-type*, así como un título viral elevado. Los mejores resultados se obtuvieron empleando PEIpro como agente de transfección, además, no se observó diferencia entre la transfección en medio con suero y sin suero. Por otro lado, hemos podido detectar producción en todos los mutantes con el aminoácido no natural incorporado, siendo la producción más eficaz en el caso del mutante rAAV-DJ-N589-ssDNA GFP con respecto al resto. Por ello, en busca de una mayor producción de partículas virales infecciosas, decidimos realizar una producción a gran escala de rAAV-DJ ssDNA-GFP y rAAV-DJ-N589-UAA ssDNA-GFP, utilizando las condiciones más óptimas de producción: 3 millones de células, medio Optimum, sin suero añadido, y 25 µl de PEI.

2. Producción de vectores virales AAV-DJ y AAV-DJ mutantes a gran escala.

Una vez establecidas las condiciones óptimas, en las que se obtuvo una alta eficiencia de transfección y un título viral significativo, se procedió a la producción a gran escala del serotipo seleccionado, AAV-DJ ssDNA mutante, y su respectivo control.

En primer lugar, transfectamos 8 placas P100 para el rAAV-DJ *wild-type* y 18 para el mutante (3 millones de células por placa) con los plásmidos correspondientes siguiendo el mismo protocolo que en la producción a baja escala. Las condiciones fueron medio Optimum, sin suero añadido y 25 µl PEI como agente de transfección. La eficiencia de la transfección fue elevada, y no se observaron diferencias entre el control y el mutante (**Figura 9 A y B,**

izquierda). Posteriormente, nos propusimos realizar una purificación y concentración de las partículas virales obtenidas en la producción a gran escala, en busca de un aumento de la titulación de Unidades de Transfección. Para ello, recogimos, por un lado, el sobrenadante celular de las placas transfectadas que fue precipitado con PEG al 8 %, y por otro, las células, que fueron lisadas, recogiendo el extracto celular que contiene las partículas virales. Tras 72-96 horas, se resuspendió el precipitado del sobrenadante celular con el extracto celular, según se describe en el apartado de materiales y métodos. Este extracto generó lo que denominamos “Extracto Viral”, del que recogimos varias alícuotas de 50 microlitros que se guardaron a -80°C para posteriores análisis.

A continuación, nuestra intención era realizar la purificación en gradiente de iodixanol mediante ultracentrifugación, según el apartado de materiales y métodos, con el objetivo de aislar las partículas virales purificadas para su posterior análisis, sin embargo, debido a problemas técnicos no se pudo realizar. Por ello, realizamos únicamente la concentración mediante diafiltración con filtros de retención de 100 kDa, de esta forma, aislamos y concentramos partículas procedentes del interior de las células, así como del sobrenadante celular de un tamaño mayor de 100 kDa (cápsides virales producidas y complejos proteicos), “Concentrado Viral”. Tanto del primer eluido de la diafiltración como del concentrado, se guardaron varias alícuotas a -80°C para su posterior análisis.

Tras la producción a gran escala de partículas virales *wild-type* y mutantes y su concentración-filtración, procedimos al análisis por separado de: las muestras pre-concentración, “Extracto Celular”, y post-concentración, “Concentrado Viral” y “Eluido”. En primer lugar, siguiendo los estudios realizados en la producción a baja escala, analizamos las partículas virales funcionales mediante el cálculo de las UT+/ml por transducción de células AAV293 con las tres fracciones virales, tanto del virus *wild-type* como del mutante, y el resultado fue evaluado por microscopia de fluorescencia (**Figura 9 A y B, derecha**). En todas observamos alta muerte celular, causada principalmente por la ausencia de una correcta purificación de las partículas virales. En las muestras “Extracto Celular” y “Concentrado Viral”, el porcentaje de células GFP+ transducidas fue elevado en *wild-type* y mutantes, sin embargo, la mayoría de estas eran células muertas. Además, en las muestras “Eluido”, no se observaron células verdes infectadas, lo que nos indica que el filtro había retenido correctamente las partículas virales.

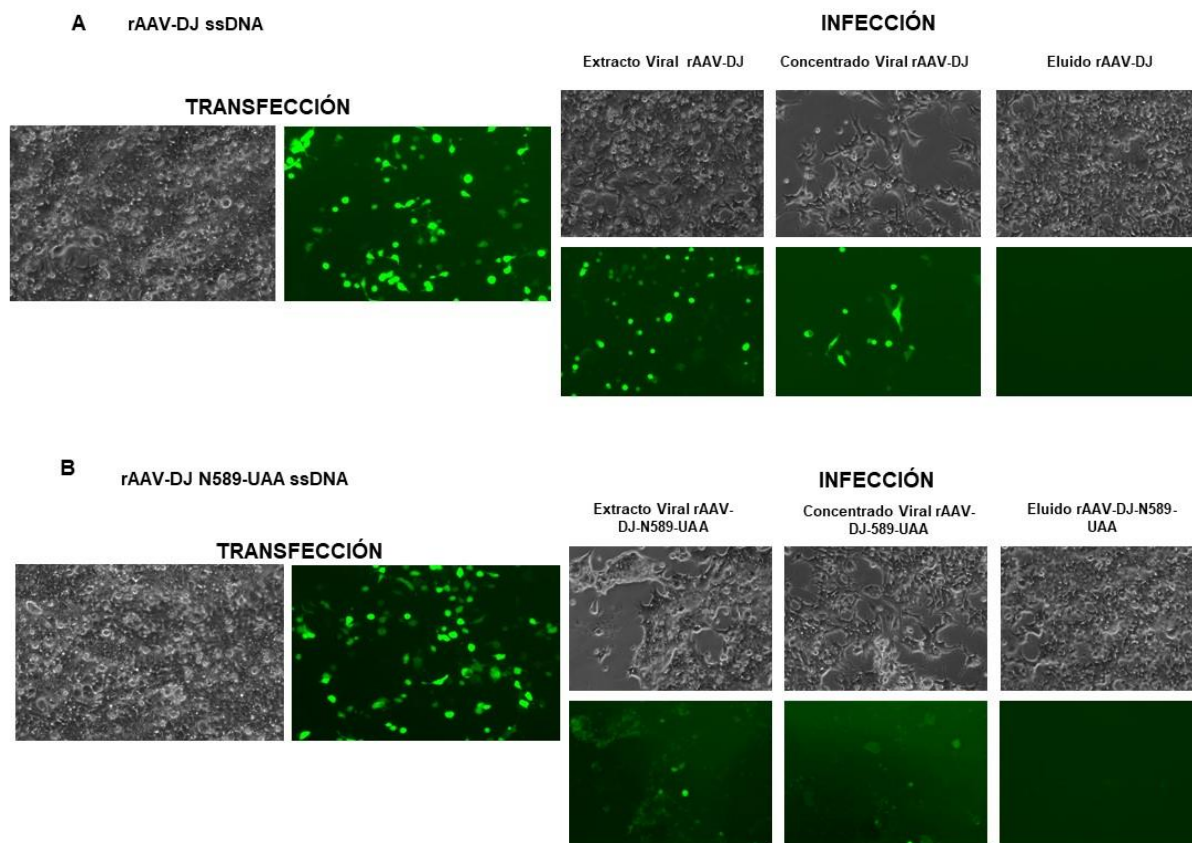


Figura 9. Producción a gran escala de vector adeno-asociado AAV-DJ y rAAV-DJ-N589-UAA ssDNA-GFP.

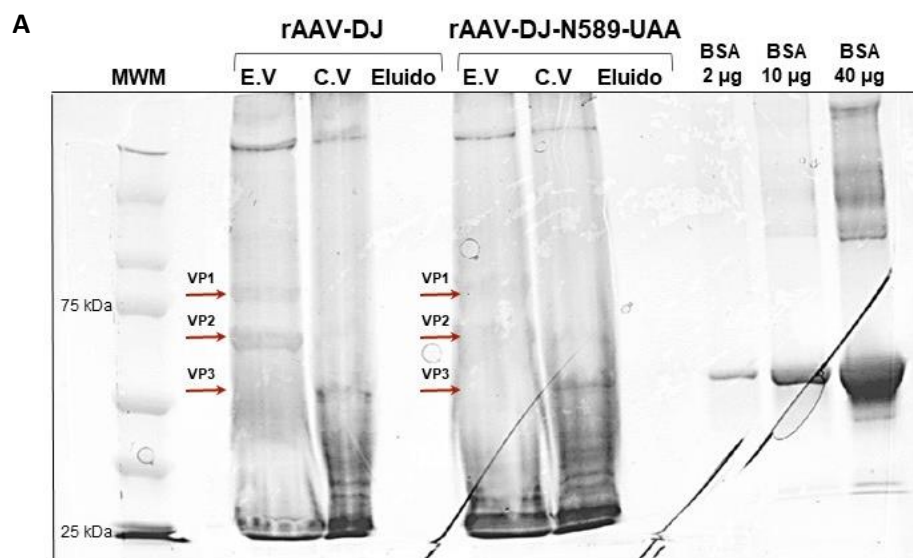
Imágenes de microscopía óptica bajo contraste de fases y filtro de fluorescencia de 488 nm de células AAV293 72h post-transfección (2 paneles izquierdos) y células AAV293 5-7 días post-transducción (2 paneles derechos). Serotipo AAV-DJ ssDNA-GFP(A), rAAV-DJ-N589-UAA ssDNA-GFP (B).

Tras los resultados obtenidos, en los que hemos podido detectar la producción de partículas virales mutantes, pero obteniendo títulos muy bajos de Unidades de Transfección +, decidimos realizar otros estudios con los que titular las partículas virales no por su funcionalidad o capacidad de transducir células, si no por su presencia física, es decir, titulación por Partículas Virales. Para ello, realizamos dos análisis, un gel de proteínas, para detectar presencia de VPs en las diferentes fracciones del proceso de purificación y una RT-qPCR para detectar ADN viral y con ello cuantificar cápsides virales llenas.

Realizamos un gel desnaturante de acrilamida al 7,5 %, y cargamos las muestras previamente hervidas, "Extracto Viral", "Concentrado Viral" y "Eluido" de ambos virus, *wild-type* y mutante. Tras la tinción con colorante fluorescente SYPRO Ruby, observamos (**Figura 10.A**), en el extracto viral sin purificar, una alta expresión de proteínas de diversos pesos moleculares enriquecidos en proteínas correspondientes a la movilidad electroforética de VP1 y VP2 de la cápsida viral, tanto en el virus DJ como en el mutante. Tras el proceso de diafiltración, en el "Concentrado Viral" en el que se eliminan todas aquellas proteínas de peso

molecular menor a 100 kDa, observamos una disminución de las supuestas proteínas VP1 y VP2 y un enriquecimiento de una proteína de movilidad electroforética similar a la proteína VP3, en concordancia con una mayor presencia de VP3 en la cápside viral (relación 1:1:10 VP1, VP2 y VP3, respectivamente). Finalmente, no pudimos detectar proteínas en el eluido de la filtración, probablemente debido a la alta dilución del extracto viral tras la centrifugación.

Por otro lado, quisimos cuantificar la cantidad de partículas virales llenas. Para ello, extrajimos el ADN viral de las alícuotas correspondientes a los pasos de purificación: Extracto Viral, Concentrado Viral y Eluido de ambos virus. Posteriormente, realizamos una PCR cuantitativa, utilizando como control el plásmido de transferencia génica pAAV IRES GFP en diferentes concentraciones (ver materiales y métodos) que se utilizó en la producción de ambos vectores virales AAV-DJ y rAAV-DJ-N589-UAA ssDNA-GFP. A partir de la recta patrón de pAAV IRES GFP extrapolamos los datos obtenidos de las muestras de virus para obtener la concentración de ADN en cada muestra. Conociendo la cantidad de ADN por partícula viral, calculamos el número de partículas virales por ml en cada muestra, según está descrito en el apartado de materiales y métodos. Como se muestra en la **figura 10.B**, se detectó la presencia de partículas virales llenas tanto en el Extracto como el Concentrado Viral de ambos virus, siendo la concentración del mutante superior al *wild-type* cerca de 2 órdenes de magnitud (habiendo transfectado 2,5 veces más de células en el mutante respecto al *wild-type*). La detección de partículas virales en los eluidos de la diafiltración fue mínima. Estos resultados nos indican, por tanto, que la diafiltración permitió la retención de las partículas virales en el concentrado, permitiendo una purificación parcial de ambos virus.



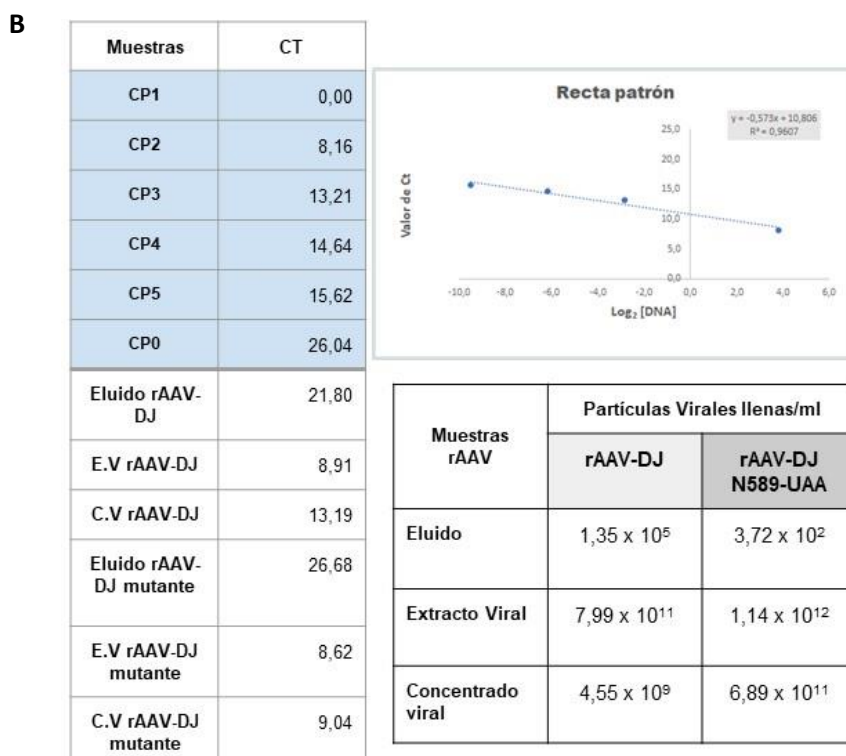


Figura 10. (A) Gel desnaturalizante de acrilamida al 7,5%, las muestras fueron hervidas con tampón de Laemmli y cargadas: Marcador de Peso Molecular (MWM)/ Extracto Viral (E.V) / Concentrado Viral (C.V) / Eluido (del rAAV-DJ seguidos del rAAV-DJ-N589-UAA) / BSA 2 µg/ BSA 10 µg/ BSA 40 µg. El gel fue teñido con tinción fluorescente SYPRO ruby. **(B)** Resultados de la qRT-PCR. A la izquierda, tabla con los umbrales de ciclo (CT) obtenidos de las muestras control (CP0 es el control negativo y CP1-5 corresponde a las diluciones seriadas 1/10 partiendo de 100 ng de plásmido) y de las muestras de rAAV-DJ y rAAV-DJ-N589-UAA. Arriba a la derecha, recta patrón a partir de las muestras control representando CT frente al log en base 2 de la concentración de ADN. Abajo a la derecha, titulación de partículas virales llenas por ml de las muestras de rAAV-DJ-N589-UAA. Los detalles del proceso se encuentran en el apartado de materiales y métodos.

Finalmente, los resultados del proceso de producción a gran escala muestran la capacidad de producción de vectores virales con aminoácidos no naturales incorporados a su cápsida viral, pese a una disminución drástica en el número de UT+ con respecto al *wild-type*.

DISCUSIÓN

El creciente desarrollo de estrategias de optimización de vectores empleados en terapia génica en las últimas décadas ha permitido que esta se convierta en una realidad clínica en la actualidad (6). Los vectores virales han jugado un papel muy importante en ello, por ser el sistema de transferencia de material genético más eficaz y seguro hasta el momento (7). Concretamente, los virus adeno-asociados recombinantes (rAAVs) ofrecen la mayor seguridad, por su bajo perfil inmunogénico e inflamatorio en humanos (8). Sin embargo, existe una necesidad de optimización de estos vectores para lograr un tropismo más selectivo y una menor neutralización por anticuerpos, que lleve a una mayor eficacia *in vivo*. Con este objetivo se han diseñado una variedad de estrategias de manipulación de rAAV (1) para la mejora del tropismo viral, la biodisponibilidad en sangre y el aumento de la expresión del transgén, abriendo un campo de investigación muy prometedor. Por otro lado, los aptámeros han surgido como alternativa a los anticuerpos en la unión específica a moléculas, debido a su síntesis sencilla y controlada, elevada estabilidad en suero, número ilimitado de ligandos, y ausencia de inmunogenicidad *in vivo* (5), presentando una gran variedad de aplicaciones.

Nuestro trabajo se ha centrado en la producción de vectores virales adeno-asociados modificados, que incorporan en dominios funcionales de las proteínas de su cápside un aminoácido no natural, en busca de una posterior unión de aptámeros en estos dominios, con el objetivo de aumentar el tropismo de estos vectores a células diana.

Para ello, hemos empleado un sistema de manipulación mixta de rAAVs, recientemente desarrollado por el grupo del Dr. Mali (3), que combina la ingeniería de cápsides con la manipulación química de manera dirigida. El grupo del Dr. Mali diseñó este sistema, con el objetivo de crear “oligo-AAVs programables”, de forma que, al incorporar aminoácidos con brazos químicos ortogonales, puedan ser utilizados para unir moléculas a su superficie, en concreto oligonucleótidos. Para ello, a partir de la estructura cristalina del AAV-2, identificaron dominios accesibles a su superficie donde introducir la mutación y unir los oligonucleótidos. Los residuos seleccionados (S578 y N587) están situados en el grupo básico que el rAAV utiliza para unirse a un receptor celular clave, el proteoglicano de heparán sulfato (HSPG) (3). De esta forma produjeron rAAVs mutantes de serotipo 2 y DJ que emplearon para unir PEG y Lipofectamina, con el objetivo de evadir la neutralización por anticuerpos, una de las causas de la baja eficiencia *in vivo* de los rAAVs. Además, cargaron estos vectores con el sistema de edición génica CRISPR, y comprobaron que estos vectores “oligo-AAVs camuflados”, mantenían su funcionalidad. Sin embargo, la principal limitación de su estudio fue el descenso significativo de los títulos virales de los rAAVs mutantes (entre 1,5 y 5 veces menor) respecto a los rAAVs normales, y remarcaron la necesidad de optimizar el proceso de producción (3).

Por otra parte, nuestro estudio utiliza el conocimiento y resultados descritos previamente para producir estos vectores adeno-asociados con asas químicas ortogonales codificadas genéticamente. Debido a las limitaciones descritas previamente en la producción de estos AAVs, nos centramos en la optimización del sistema de producción, de forma que nuestro objetivo principal fue la producción eficiente de virus rAAVs modificados. Además, introducimos un nuevo enfoque, ya que proponemos la combinación de esta estrategia de modificación genética de la cápside con la conjugación química de aptámeros de unión a

receptores celulares, con el objetivo de aumentar el tropismo de los rAAVs a receptores específicos de las células diana, en concreto al receptor TLR4.

De esta forma, hemos realizado producciones mediante transfección transitoria libre de *helper*, de rAAVs *wild-type* y mutantes, de serotipo DJ y 2 a baja escala, y DJ a gran escala. Nuestros resultados, en conjunto, confirman la producción de rAAVs modificados que incorporan aminoácidos no naturales en las proteínas de cápside, sin embargo, hemos detectado la pérdida de la capacidad de infección respecto a los vectores *wild-type*.

En concreto, comenzamos con la optimización del proceso de producción a baja escala, en la que realizamos 3 producciones en diferentes condiciones. Además, con el objetivo de titular las partículas virales obtenidas, realizamos infecciones que fueron evaluadas por microscopía electrónica y citometría de flujo, para obtener el número de Unidades de Transducción +, equivalente al número de partículas virales capaces de infectar y transducir el transgén, es este caso, la proteína fluorescente GFP. Como resultado, conseguimos finalmente una alta eficiencia de transfección tanto en la producción de vectores *wild-type* como mutantes, y detectamos por observación en microscopía de fluorescencia células infectadas con ambos virus. Sin embargo, obtuvimos grandes diferencias entre los títulos del *wild-type* con respecto al mutante, siendo estos últimos casi indetectables por citometría de flujo (Ver **Figura 8**). Con los resultados obtenidos en la producción a baja escala, seleccionamos las condiciones óptimas de transfección, así como el serotipo con mayor eficiencia de producción, que fue el DJ ssDNA.

Posteriormente, con las condiciones seleccionadas, realizamos una producción a gran escala, en busca de aumentar el título viral, y a pesar de no poder realizar una purificación en gradiente de iodixanol, realizamos una concentración y diafiltración de las partículas virales obtenidas. Decidimos evaluar el resultado de la producción mediante la infección con las partículas obtenidas tras la concentración-filtración en comparación con las partículas previas a este proceso. Los resultados fueron similares a los obtenidos en la última producción a baja escala, así, la eficiencia de transfección fue elevada tanto en el *wild-type* como mutante y detectamos partículas virales mutantes por microscopía electrónica, pero de nuevo, detectamos un descenso significativo de las células infectadas con los virus mutantes en comparación con los *wild-type*. Además, no conseguimos aumentar el título viral con el proceso de concentración y diafiltración, ya que los resultados fueron similares entre las infecciones con las partículas pre y post-concentración (Ver **Figura 9**).

Tras estos resultados, decidimos evaluar la eficacia del sistema de producción empleando otros métodos que no dependiesen de la capacidad funcional de las partículas producidas, sino que, mediante un análisis físico del número de partículas virales obtenidas, pudiésemos determinar si existían diferencias tan grandes entre la producción de los mutantes con respecto al *wild-type*. Para ello, realizamos un gel de proteínas de las partículas virales producidas a gran escala, antes y después de la filtración. Con el resultado obtenido, pudimos confirmar la existencia de proteínas de movilidad electroforética acorde las proteínas de la cápside viral (VPs) del virus *wild-type* y mutante, así como el enriquecimiento de una proteína de movilidad acorde con la proteína VP3. Este resultado encaja con la estequiometría de las VPs en la cápside viral de 1:1:10 de VP1:VP2:VP3 respectivamente (30).

mayoritaria de la cápside, VP3 (Ver Figura 6A). Por otro lado, realizamos una RT-qPCR con la que cuantificamos el ADN extraído de las muestras virales con el objetivo de titular el número de partículas virales por ml de cada muestra. Los resultados mostraron la existencia de partículas virales llenas, en las fracciones del proceso post-diafiltración, así como una producción eficiente de vectores virales *wild-type*, y mutantes, obteniendo títulos virales elevados (Ver **Figura 10.B**). Teniendo en cuenta nuestros resultados en la detección de partículas virales llenas, podemos decir que a diferencia de lo descrito por el grupo del Dr.Mali, en el que detectan un descenso en la producción del mutante de entre 1,5 y 5 veces con respecto al *wild-type* (3), nosotros hemos detectado una mejor producción con respecto al *wild-type*.

Por otro lado, en nuestro caso si hemos detectado una disminución drástica de Unidades de Transfección positivas en la producción de vectores mutantes. Esto se explica ya que el residuo de las VPs donde se introduce la mutación (N587) se encuentra situado en el dominio que el AAV utiliza para unirse a su receptor celular natural (31). Sin embargo, esto no sería un inconveniente para lograr el propósito final de nuestro trabajo, que los vectores virales utilicen exclusivamente, como vía de entrada celular, el receptor de unión específica al aptámero. Es por esto que proponemos unir a los vectores modificados producidos, el aptámero apTLR4 mediante reacción química, e infectar células HEK293, que sobreexpresen dicho receptor, para evaluar la infección de estos vectores, en comparación con células carentes de este receptor.

Tras los resultados obtenidos, podemos concluir que nuestro sistema de producción de vectores adeno-asociados modificados para la incorporación de aptámeros es eficaz, sin embargo, estos rAAVs pierden capacidad de infectar células, que habrá que evaluar si puede ser revertido al unir a ellos el aptámero TLR4 (ApTLR#4F).

Las limitaciones principales de nuestro estudio han sido, por un lado, la ausencia de purificación de partículas virales, que ha hecho que la concentración y diafiltración no sea adecuada, como muestran los resultados del gel de proteínas y qRT-PCR. Creemos que la realización de una correcta purificación en gradiente de iodixanol mediante la cual se aíslan las partículas virales, permitiría un análisis más claro de las proteínas de la cápside viral, así como su cuantificación en gel de proteínas. Además, el empleo del serotipo DJ, rAAV optimizado, es adecuado para lograr una buena eficiencia de producción, sin embargo, este virus quimérico tiene un tropismo muy amplio (19), de forma que aumenta la variabilidad, contrario a nuestro objetivo final, que es aumentar especificidad en el tropismo de los vectores rAAV para una célula diana concreta. Por ello, una vez obtenidos resultados positivos con el rAAV-DJ, proponemos emplear el rAAV-2. Por último, es necesario la conjugación de aptámeros a los vectores adeno-asociados modificados producidos para concluir si estos permiten esta unión, así como si vector unido a aptámero es funcional. Nosotros proponemos la unión del aptámero contra TLR4 (ApTLR#4F) a estos vectores rAAV-2 y analizar, en primer lugar, si esta unión es eficiente. Por otro lado, evaluar la funcionalidad del vector, así como la del aptámero, para unirse e infectar células, y por último, estudiar la especificidad de este vector por células que sobreexpresen TLR4.

Las aplicaciones de vectores adeno-asociados rAAV-2 unidos a apTLR4 son diversas. En primer lugar, estos vectores servirían como vehículos eficaces de distribución del aptámero hacia su diana, el TLR4, consiguiendo el bloqueo específico del receptor. Además, utilizando

la capacidad de los vectores virales para cargar material genético, estos podrían emplearse para dirigir, de forma específica a células que sobreexpresan TLR4, genes que modulen inflamación, donde el receptor TLR4 juega un papel fundamental. Logrando el bloqueo eficaz del receptor, así como una modulación de la inflamación. En concreto, este sistema permitiría potenciar el efecto protector ya demostrado del ApTLR4 contra el ictus, y el estudio en otras patologías en las que el receptor TLR4 está implicado como son la aterosclerosis, la sepsis, la esclerosis múltiple, el dolor agudo y crónico, la carcinogénesis, etc. Por ello, pensamos que sería muy interesante continuar con el estudio de este sistema mixto de optimización de vectores adeno-asociados para lograr el objetivo final, aumentar la eficacia de estos vectores en la aplicación clínica.

CONCLUSIONES

- Nuestro sistema de producción de vectores virales adeno-asociados permite la generación de rAAVs con aminoácidos no naturales codificados genéticamente para la incorporación de aptámeros en sitio específico.
- La producción de los vectores modificados es al menos tan eficaz como la producción de vectores *wild-type*, en relación con la obtención de partículas virales llenas tras la concentración viral por diafiltración.
- La manipulación genética de la cápside de los rAAVs produce un descenso drástico en la capacidad de los vectores de transducir células.

Es necesario realizar una purificación en gradiente de densidad, de nuestros vectores adeno-asociados mutantes en comparación con el *wild-type*, para lograr una mayor eficacia del sistema de producción, así como valorar con mayor exactitud la capacidad de producción de partículas virales llenas y su pérdida de funcionalidad.

ANEXOS

ANEXO I: Digestión enzimática del ADN tras maxipreparación de los plásmidos: pAdDF6, pAAV.IRES.hrGFP, pAAV-DS-CMV-GFP. pAAV2 rep/cap, pAAV-DJ rep/cap, pAAVDJ-N589X, pAAV2-N587X, pAcBac1.tR4-MbPyl-1 y pCAG-ETF1-E55D-1.

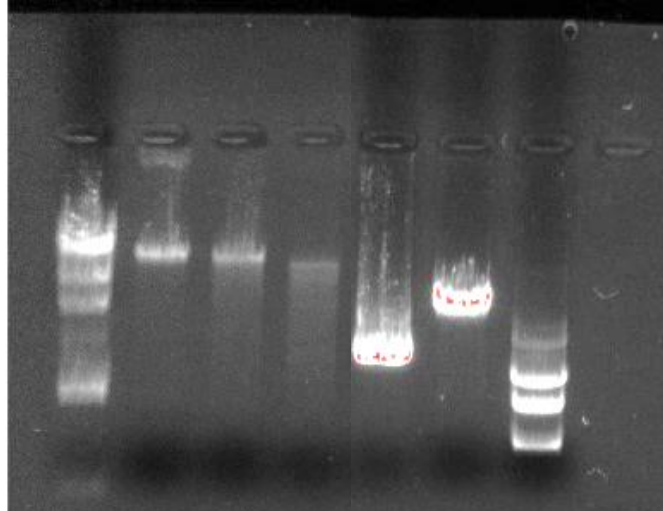


Figura 1. Gel de agarosa al 0,8% de las digestiones enzimáticas de pAdDF6 y pAAV.IRES.hrGFP.

Las muestras fueron cargadas en el siguiente orden: Standard/ pAdDF6-/ pAdDF6 + NotI/ pAdDF6 + NotI + NdeI/ pAAV.IRES.hrGFP-/ pAAV.IRES.hrGFP + BamHI/ pAAV.IRES.hrGFP + BamHI + NotI.

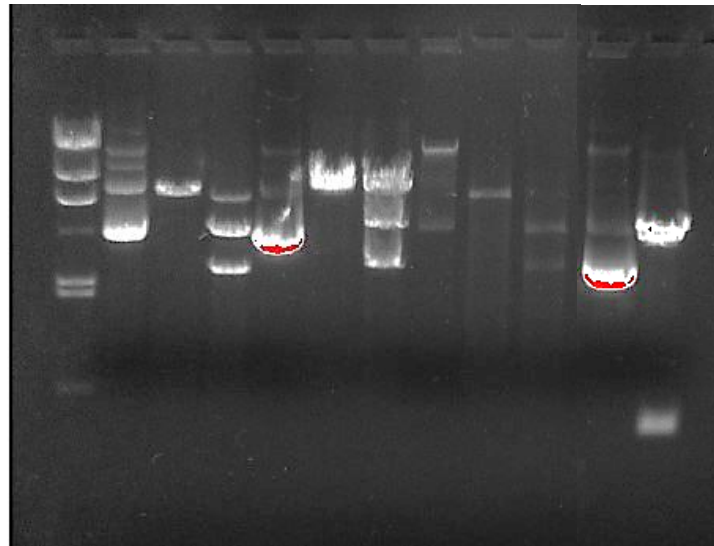


Figura 2. Gel de agarosa al 0,8% de las digestiones enzimáticas de pAAV-DJ rep/cap, pAAVDJ-N589X, pAAV2 rep/cap y pAAV-DS-CMV-GFP.

Las muestras fueron cargadas en el siguiente orden: Standard/ pAAV-DJ rep/cap-/ pAAV-DJ rep/cap + EcoRV / pAAV-DJ rep/cap + EcoRV + HindIII / pAAVDJ-N589X- / pAAVDJ-N589X + EcoRV / pAAVDJ-N589X + EcoRV + HindIII / pAAV2 rep/cap- / pAAV2 rep/cap + EcoRV / pAAV2 rep/cap + EcoRV + HindIII / pAAV-DS-CMV-GFP - / pAAV-DS-CMV-GFP + Neol

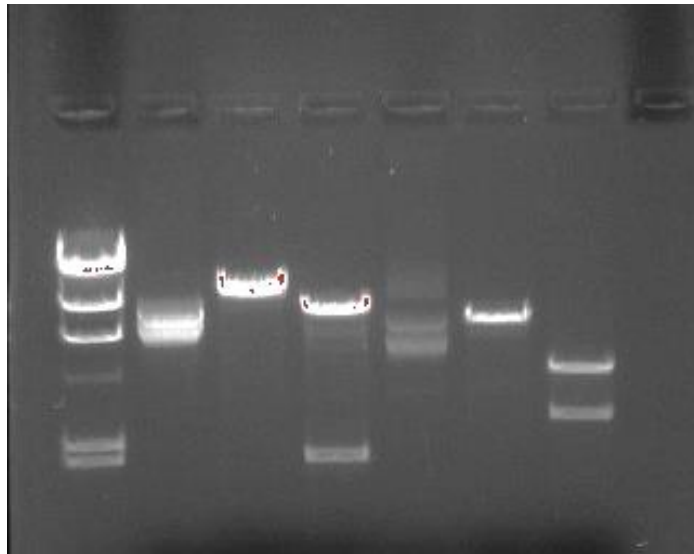


Figura 3. Gel de agarosa al 0,8% de las digestiones enzimáticas de pAcBac1.tR4-MbPyl-1 y pAAV2 rep/cap

Las muestras fueron cargadas en el siguiente orden: Standard/ pAcBac1.tR4-MbPyl-1 - / pAcBac1.tR4-MbPyl-1 + BamHI / pAcBac1.tR4-MbPyl-1 + BamHI + EcoRI / pAAV2-N587X - / pAAV2-N587X EcoRV / pAAV2-N587X rep/cap EcoRV + HindIII.

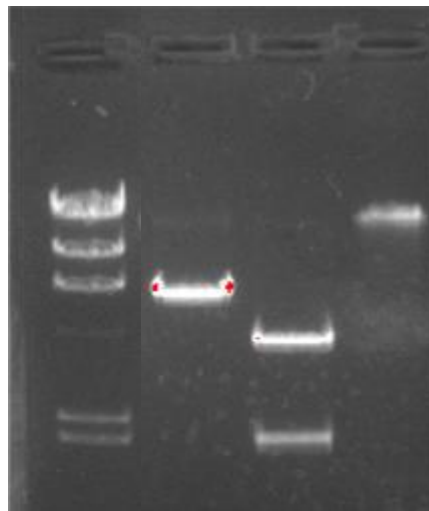
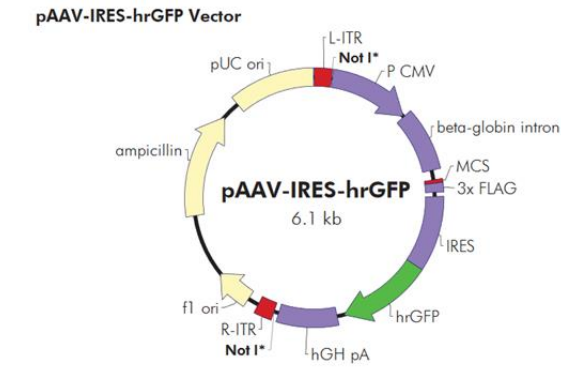


Figura 4. Gel de agarosa al 0,8% de las digestiones enzimáticas de pCAG-ETF1-E55D-1.

Las muestras fueron cargadas en el siguiente orden: Standard/ pCAG-ETF1-E55D-1 - / pCAG-ETF1-E55D-1 + XbaI / pCAG-ETF1-E55D-1 + XbaI + HindIII,.

ANEXO II: Mapas de restricción de los plásmidos pAdDF6, pAAV.IRES.hrGFP, pAAV-DS-CMV-GFP. pAAV2 rep/cap, pAAV-DJ rep/cap, pAAVDJ-N589X, pAAV2-N587X, pAcBac1.tR4-MbPyl-1 y pCAG-ETF1-E55D-1.

A

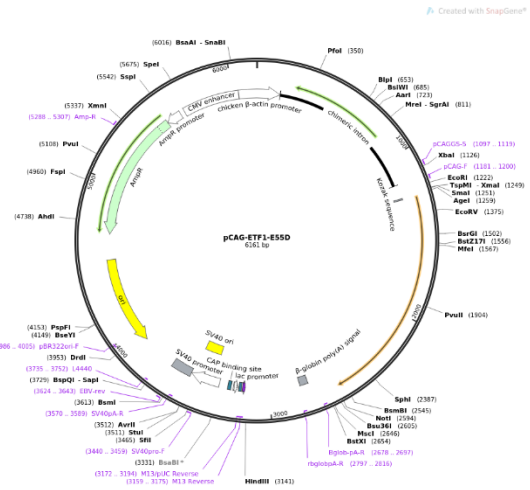


*Non-unique sites used to release the expression cassette for subcloning fragments from pCMV-MCS

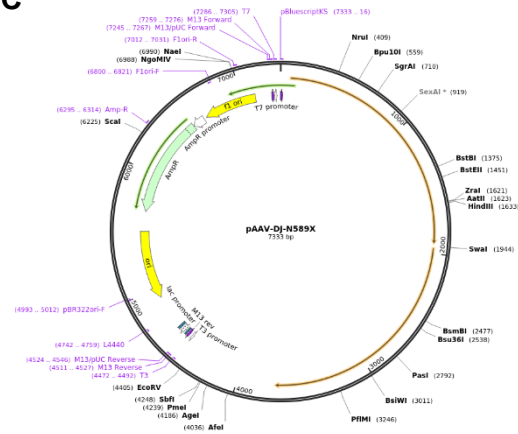
pAAV-IRES-hrGFP Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 1392-1432)



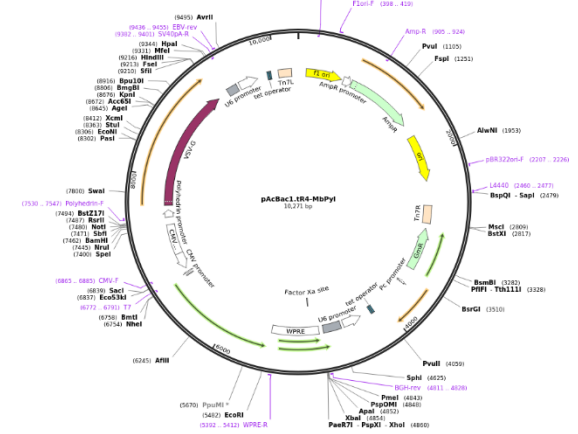
B



C



D



BIBLIOGRAFÍA

1. Guenther, C. M., Kuypers, B. E., Lam, M. T., Robinson, T. M., Zhao, J., & Suh, J. (2014). Synthetic virology: engineering viruses for gene delivery. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 6(6), 548–558. <https://doi.org/10.1002/wnan.1287>
2. Mitchell, A. M., Nicolson, S. C., Warischalk, J. K., & Samulski, R. J. (2010). AAV's anatomy: roadmap for optimizing vectors for translational success. *Current gene therapy*, 10(5), 319–340. <https://doi.org/10.2174/156652310793180706>
3. Katrekar, D., Moreno, A. M., Chen, G., Worlikar, A., & Mali, P. (2018). Oligonucleotide conjugated multi-functional adeno-associated viruses. *Scientific reports*, 8(1), 3589. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21742-x>
4. ApTLR#4F (A4V-APTLR4-Dimp), desarrollado por el grupo del Dr. González, en colaboración con la Unidad de Investigación Neurovascular de la Facultad de Medicina (UCM), dirigida por el Dr. Lizasoain, y la empresa Aptus Biotech.
5. Fernández, G., Moraga, A., Cuartero, M. I., García-Culebras, A., Peña-Martínez, C., Pradillo, J. M., Hernández-Jiménez, M., Sacristán, S., Ayuso, M. I., Gonzalo-Gobernado, R., Fernández-López, D., Martín, M. E., Moro, M. A., González, V. M., & Lizasoain, I. (2018). TLR4-Binding DNA Aptamers Show a Protective Effect against Acute Stroke in Animal Models. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 26(8), 2047–2059. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.05.019>
6. Santiago-Ortiz, J. L., & Schaffer, D. V. (2016). Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 240, 287–301. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.001>
7. Base de datos ClinicalTrials. *Terapia génica, tendencias, gráficos y mapas*. Visualizado en febrero 2021 en <https://clinicaltrials.gov/ct2/resources/trends#MapOfStudies>
8. Página web Instituto Paul-Ehrlich. “Federal Institute for Vaccines and Biomedicines”. *Gene Therapy Medicinal Products*. Visualizado en marzo 2021 en <https://www.pei.de/EN/medicinal-products/atmp/gene-therapy-medicinal-products/gene-therapy-node.html>

9. Página web Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA). *Approved Cellular and Gene Therapy Products*. Visualizado en marzo 2021 en <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products>
10. Smith, C., & Blomberg, P. (2017). Genterapi – från idé till verklighet - Ännu har få patienter behandlats och preparaten är ofta mycket dyra – men utvecklingen går fort nu [Gene therapy – from idea to reality]. *Lakartidningen*, 114, EWYL.
11. Ma, C. C., Wang, Z. L., Xu, T., He, Z. Y., & Wei, Y. Q. (2020). The approved gene therapy drugs worldwide: from 1998 to 2019. *Biotechnology advances*, 40, 107502. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107502>
12. Heilbronn, R., & Weger, S. (2010). Viral vectors for gene transfer: current status of gene therapeutics. *Handbook of experimental pharmacology*, (197), 143–170. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00477-3_5
13. Corrigendum: Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. (2019). *The journal of gene medicine*, 21(9), e3124. <https://doi.org/10.1002/jgm.3124>
14. McCarty D. M. (2008). Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(10), 1648–1656. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.171>
15. Gonçalves M. A. (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology journal*, 2, 43. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-2-43>
16. Münch, R. C., Janicki, H., Völker, I., Rasbach, A., Hallek, M., Büning, H., & Buchholz, C. J. (2013). Displaying high-affinity ligands on adeno-associated viral vectors enables tumor cell-specific and safe gene transfer. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 21(1), 109–118. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.186>
17. Maheshri, N., Koerber, J. T., Kaspar, B. K., & Schaffer, D. V. (2006). Directed evolution of adeno-associated virus yields enhanced gene delivery vectors. *Nature biotechnology*, 24(2), 198–204. <https://doi.org/10.1038/nbt1182>
18. Zinn, E., Pacouret, S., Khaychuk, V., Turunen, H. T., Carvalho, L. S., Andres-Mateos, E., Shah, S., Shelke, R., Maurer, A. C., Plovie, E., Xiao, R., & Vandenberghe, L. H. (2015). In Silico Reconstruction of the Viral Evolutionary Lineage Yields a Potent Gene Therapy Vector. *Cell reports*, 12(6), 1056–1068. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.019>

19. CELL BIOLABS, INC. *Product Data Sheet. pAAV-DJ Vector*. Catalog Number: VPK-420-DJ.
20. Kim, M., Kim, D. M., Kim, K. S., Jung, W., & Kim, D. E. (2018). Applications of Cancer Cell-Specific Aptamers in Targeted Delivery of Anticancer Therapeutic Agents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(4), 830. <https://doi.org/10.3390/molecules23040830>
21. Schmied, W. H., Elsässer, S. J., Uttamapinant, C., & Chin, J. W. (2014). Efficient multisite unnatural amino acid incorporation in mammalian cells via optimized pyrrolysyl tRNA synthetase/tRNA expression and engineered eRF1. *Journal of the American Chemical Society*, 136(44), 15577–15583. <https://doi.org/10.1021/ja5069728>
22. Roma-Rodrigues, C., Rivas-García, L., Baptista, P. V., & Fernandes, A. R. (2020). Gene Therapy in Cancer Treatment: Why Go Nano?. *Pharmaceutics*, 12(3), 233. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030233>
23. Najahi-Missaoui, W., Arnold, R. D., & Cummings, B. S. (2020). Safe Nanoparticles: Are We There Yet?. *International journal of molecular sciences*, 22(1), 385. <https://doi.org/10.3390/ijms22010385>
24. Sun, H., & Zu, Y. (2015). A Highlight of Recent Advances in Aptamer Technology and Its Application. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(7), 11959–11980. <https://doi.org/10.3390/molecules200711959>
25. Chen, C. Y., Kao, C. L., & Liu, C. M. (2018). The Cancer Prevention, Anti-Inflammatory and Anti-Oxidation of Bioactive Phytochemicals Targeting the TLR4 Signaling Pathway. *International journal of molecular sciences*, 19(9), 2729. <https://doi.org/10.3390/ijms19092729>
26. Jin, X., Park, O.J. & Hong, SH Incorporación de aminoácidos no estándar en proteínas: desafíos, logros recientes y aplicaciones emergentes. *Appl Microbiol Biotechnol* **103**, 2947–2958 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09690-6>
27. Li C, Samulski RJ. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*. 2020 Apr;21(4):255-272. doi: 10.1038/s41576-019-0205-4. Epub 2020 Feb 10. PMID: 32042148.

28. Kim, M., Kim, D. M., Kim, K. S., Jung, W., & Kim, D. E. (2018). Applications of Cancer Cell-Specific Aptamers in Targeted Delivery of Anticancer Therapeutic Agents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(4), 830. <https://doi.org/10.3390/molecules23040830>
29. Parrish C. R. (2010). Structures and functions of parvovirus capsids and the process of cell infection. *Current topics in microbiology and immunology*, 343, 149–176. https://doi.org/10.1007/82_2010_33
30. Rayaprolu, V., Kruse, S., Kant, R., Venkatakrishnan, B., Movahed, N., Brooke, D., Lins, B., Bennett, A., Potter, T., McKenna, R., Agbandje-McKenna, M., & Bothner, B. (2013). Comparative analysis of adeno-associated virus capsid stability and dynamics. *Journal of virology*, 87(24), 13150–13160. <https://doi.org/10.1128/JVI.01415-13>
31. Ried, M. U., Girod, A., Leike, K., Büning, H., & Hallek, M. (2002). Adeno-associated virus capsids displaying immunoglobulin-binding domains permit antibody-mediated vector retargeting to specific cell surface receptors. *Journal of virology*, 76(9), 4559–4566. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.9.4559-4566.2002>
32. Lock, M., Alvira, M. R., Chen, S. J., & Wilson, J. M. (2014). Absolute determination of single-stranded and self-complementary adeno-associated viral vector genome titers by droplet digital PCR. *Human gene therapy methods*, 25(2), 115–125. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2013.131>
33. El Andari, J., & Grimm, D. (2021). Production, Processing, and Characterization of Synthetic AAV Gene Therapy Vectors. *Biotechnology journal*, 16(1), e2000025. <https://doi.org/10.1002/biot.202000025>