

Vasco António Jesus Abrunheiro

Produção e purificação de vetores virais adeno-associados para terapia génica

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Luís Pereira de Almeida e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Vasco António Jesus Abrunheiro

Produção e purificação de vetores virais adeno-associados para terapia génica

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pelo Professor Doutor Luís Pereira de Almeida e apresentada à Faculdade de
Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Vasco António Jesus Abrunheiro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011155793, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 12 de julho de 2016.

(Vasco António Jesus Abrunheiro)

O Tutor

(Professor Doutor Luís Pereira de Almeida)

O Aluno

(Vasco António Jesus Abrunheiro)

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer ao Professor Doutor Luís Almeida por todo o apoio e recursos prestados ao longo da realização da monografia.

Quero também agradecer á Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pela formação de excelência que me proporcionou.

Um agradecimento muito grande à minha família por tudo o que me dispôs para permitir a minha formação.

Um especial agradecimento à Esperança por todo o companheirismo e apoio prestado durante a realização deste trabalho.

Por fim, não posso deixar de agradecer a todos os amigos que estiveram presentes e marcaram esta fase da minha vida.

Índice

Resumo	3
Palavras-chave.....	4
Abstract	5
Keywords.....	5
1. Introdução.....	6
1.1. Contexto.....	6
1.2. Vírus adeno-associados.....	6
2. Tipos de construções	7
2.1. Biologia dos vírus adeno-associados.....	7
2.2. A infecção	8
2.3. Construções.....	9
2.4. Melhoramentos na construção	9
3. Tipos séricos dos AAV.....	11
4. Métodos de produção	12
4.1. Produção de AAVs por transfeção transiente.....	12
4.2. Produção em linhas celulares estáveis.....	13
4.3. BEVS- Sistema vetorial de expressão de baculovírus.....	14
4.4. Sistemas de infecção baseados em rHSV.....	14
4.5. Ideias a reter dos métodos de produção	16
5. Métodos de purificação.....	16
5.1. Iodixanol e cloreto de cério	17
5.3. Cromatografia de troca aniónica.....	19
5.4. Cromatografia de troca catiónica.....	19
5.5. Cromatografia de troca iónica e filtração em gel	20
6. Métodos de determinação do título	20
6.1. Medidas com base na infetividade viral	21
6.1.1. Ensaio de transdução.....	21

6.1.2. <i>Fluorescent Focus Assay (FFA)</i>	21
6.1.3. Ensaio viral em placa.....	21
6.2. Medidas com base na concentração antigénica ou expressão génica	22
6.2.1. PCR em tempo real quantitativo.....	22
6.2.2. Ensaio <i>Dot-blot</i>	22
6.3. Contagem direta das partículas.....	23
6.3.1. Microscopia eletrónica de transmissão.....	23
6.3.2. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).....	24
6.3.3. Vírus Counter 3100	25
6.3.4. <i>Tunable resistive pulse sensing – qViro-X</i>	26
6.4. Prós e contras dos vários métodos	27
7. Conclusão.....	28
Anexos	30
Referências bibliográficas	32

Resumo

A terapia gênica apresenta-se atualmente como uma tecnologia em saúde muito inovadora e atrativa pelo facto de recorrendo à utilização de ácidos nucleicos se propor a cura de doenças mediante intervenção nas suas causas moleculares.

A correção de determinada deficiência genética é feita mediante a entrega de um gene saudável através de um vetor. Os vírus adeno-associados, com mais de 100 tipos séricos identificados, apresentam-se como um tipo de vetores virais extensamente utilizados, com muitas vantagens para a utilização clínica dada a sua capacidade de mediar a expressão prolongada do transgene, a ausência de capacidade de replicação na ausência de um vírus auxiliar, a capacidade de transdução tanto em células em divisão como em células que não se dividam e ainda ausência de patogenicidade na infeção pelo vírus selvagem.

Os métodos de produção assentam em quatro métodos principais que diferem na metodologia de inserção nas células produtoras dos genes que codificam os diferentes componentes das partículas virais: 1. a transfeção ou introdução transiente de plasmídeos em células eucarióticas, 2. a utilização de linhas celulares estáveis mediante integração dos genes virais no seu genoma, 3. o sistema vetorial de expressão de baculovírus em que são infetadas células de inseto por baculovírus que codificam os genes virais e finalmente, 4. os sistemas de infeção baseados em rHSV em que células eucariotas são infetadas por HSV recombinantes que codificam para os genes virais.

Com vista à obtenção de preparações com elevada pureza encontram-se em desenvolvimento diversos processos de purificação, envolvendo sobretudo técnicas de ultracentrifugação com gradientes de iodixanol ou cloreto de cézio, que se pensa que venham a cair em desuso em favor de técnicas de cromatografia de afinidade ou troca iónica, que se apresentam como mais promissoras.

A determinação do título das preparações virais é fundamental no estabelecimento da dose terapêutica. Os métodos de determinação do título assentam na medição de três características dos vetores, a infetividade, a expressão gênica e contagem direta das partículas. Os métodos que assentam na medição da infetividade ou da expressão gênica, avaliam o desempenho da preparação in vivo, no entanto são mais trabalhosos e demorados. O *Virus Counter*, *Nanoparticle Tracking Analysis* e o *Tunable Resistive Pulse Sensing* são técnicas automatizadas que assentam na contagem física das partículas com recurso a equipamentos específicos e revelaram ser rápidas, com baixo custo e apresentarem resultados com excelente reprodutibilidade.

Palavras-chave

Terapia génica, vírus adeno-associados, produção, purificação, determinação de título.

Abstract

Gene therapy presents itself today as very innovative and attractive technology given its promise to cure diseases by targeting its genetic causes. The correction of specific genetic defects is made by delivery of a healthy gene copy or a silencing sequence through the use of a vector. Adeno-associated viruses, with over 100 identified serum types are presented as a promising type of viral vectors widely used with many advantages for clinical use given its ability to mediate long-term transgene expression, lack of replication in absence of a helper virus, transduction capacity both in dividing cells and in cells that do not divide, and the absence of pathogenicity upon infection by the wild-type virus.

Production methods are based in four main strategies: 1. transfection of packaging plasmids into eukaryotic cells that will produce the vectors, 2. Stable integration of the viral genes within the genome of packaging of cell lines, 3. vector baculovirus expression system where packaging insect cells are infected with baculovirus carrying viral genes, and 4. rHSV infection-based systems wherein eukaryotic cells are infected with HSV recombinant containing the viral genes.

In order to obtain a preparation of high purity several purification processes are being tested and developed involving mainly techniques of ultrafiltration by iodixanol gradients or cesium chloride, which will probably fall into disuse given the rise of promising affinity or ion exchange chromatography techniques.

The titration is fundamental to establish the therapeutic dose. The titration methods are based on measurement of either infectivity, gene expression or direct counting of the viral particles. The methods based on measurement of infectivity or gene expression, evaluate the performance of the in vivo preparation, but are more laborious and time-consuming. Automated counting techniques, such as the *Virus Counter*, *Nanoparticle Tracking Analysis* or the *Tunable Resistive Pulse Sensing* are based on the physical counting of the particles using a specific equipment and turn out to be very fast, of low cost, presenting results with excellent reproducibility.

Keywords

Gene therapy, adeno-associated viruses, production, purification, titration.

I. Introdução

I.1. Contexto

A terapia génica surge como uma tentativa de alterar o paradigma terapêutico. Para isso recorre à utilização de ácidos nucleicos como agentes terapêuticos. Ao contrário das abordagens tradicionais em que se utiliza a administração repetida de agentes terapêuticos para o controlo de uma patologia, na terapia génica frequentemente, procura-se com uma simples administração, assegurar um tratamento permanente de uma doença e, preferencialmente, sem efeitos secundários. Aplica-se a doenças genéticas hereditárias ou a doenças genéticas adquiridas, como é o caso do cancro, doença com particular foco de ensaios e investigação.

Para corrigir determinada função, a terapia génica recorre frequentemente à entrega de um gene saudável que vá desempenhar essa mesma função ou de um agente silenciador que impeça a produção de uma dada proteína patogénica. Para realizar a entrega do gene, são utilizadas ferramentas de entrega - os vetores, entre os quais se destacam os vírus adeno-associados.

I.2. Vírus adeno-associados

Nos últimos anos os vírus adeno-associados (AAV) têm emergido como vetores muito promissores para terapia génica. Estão inscritos cerca de cem ensaios clínicos na base de dados Clinicaltrials.gov usando AAV de vários serotipos. Os AAV apresentam determinadas vantagens para terapia génica, como a capacidade de mediar expressão prolongada do transgene, a ausência de capacidade de replicação na ausência de um vírus auxiliar, a capacidade de transdução tanto em células em divisão como em células que não se dividam e ainda ausência de patogenicidade na infeção pelo vírus selvagem (Grieger e Samulski, 2012).

O primeiro medicamento a ser lançado no mercado com a tecnologia de AAV, foi em julho de 2012, trazido pela empresa UniQure, sob o nome comercial Glybera[®]. Trata-se de um AAV de tipo um, designado ALIPOGENE TRIPARVOVEC desenhado para entregar o gene humano da lipoproteína lipase. Destina-se a tratar uma doença rara que é a deficiência em lipoproteína lipase responsável por hipertrigliceridémia, quilomicronémia e risco de pancreatite. A relação benefício/risco demonstrou ser muito favorável, principalmente nos indivíduos com maior risco de desenvolver complicações (Gaudet, Méthot e Kastelein, 2012).

No entanto, para os AAV se poderem tornar uma realidade numa prática clínica mais alargada, é necessário ultrapassar algumas barreiras, tais como o processo de produção em larga escala de acordo com Boas Práticas de Fabrico para obtenção de vetores de alta

qualidade e potência. Apresentam-se igualmente como desafios a ultrapassar a necessidade de ajustar o tropismo dos vetores e de modelar a resposta imune à cápside e ao genoma. Outra dificuldade que se impõe é a purificação, uma vez que os métodos baseados em ultracentrifugação mais utilizados são mais difíceis de ser utilizados em larga escala, assim como é difícil respeitar as GMP.

2. Tipos de construções

2.1. Biologia dos vírus adeno-associados

Os vírus adeno-associados (AAV), pertencentes à família parvovirus, estão entre os mais pequenos vírus de DNA existentes na natureza, com um virião de cerca de 25 nm, composto por proteínas e uma molécula de DNA de cadeia simples. Os AAV são também classificados como dependovirus, pois necessitam da co-infecção por um vírus auxiliar, tal como os adenovirus, HSV ou vírus do papiloma humano, para completar o seu ciclo de vida e causar infecção produtiva. O genoma do AAV do tipo selvagem é composto por dois genes que codificam quatro proteínas de replicação (Rep 78, Rep 68, Rep 52 e Rep 40), três proteínas da cápside (VP1, VP2, VP3) e uma proteína ativadora da montagem. Cada um dos genes é flanqueado por repetições terminais invertidas (ITR), que são os únicos elementos regulatórios cis necessários para a replicação, integração e empacotamento do genoma na cápside. As proteínas Rep 78 e Rep 68 desempenham múltiplas funções no ciclo de vida do vetor, tais como a transcrição, replicação e integração no cromossoma 19. Já as proteínas Rep 52 e Rep 40 tem um papel importante no empacotamento do DNA no núcleo da cápside pré-formada (Grieger e Samulski, 2012). Até ao momento, de entre os mais de 100 serotipos que foram identificados, 12 são utilizados na produção de vetores de expressão para terapia gênica, como apresentado na tabela I.

As proteínas da cápside são produzidas a partir da mesma região de leitura (ORF), mas têm diferentes locais de início de transcrição. A variação proteica da cápside faz variar o serotipo e está implicada na capacidade para infetar do rAAV. Assim o serotipo deve ser objeto de estudo cuidadoso tendo em conta o órgão alvo que se pretende infetar, bem como o nível e a duração de expressão do transgene que se pretende atingir (Koichi Miyake, Noriko Miyake, Yoshiyuki Yamazaki, 2012).

Tabela 1- Serotipos e respectivos recetores para AAV.

Serotipo	Hospedeiro	Recetor	Co-recetor
AAV1	Macaco	Ácido 2,3n/2,6-sialico	Desconhecido
AAV2	Humano	HSPG	FGFR-I, integrina, HGFR, LamR
AAV3	Humano	HSPG	FGFR-I, HGFR, LamR
AAV4	Macaco	ácido 2,3O-siálico	Desconhecido
AAV5	Humano	2,3N- ácido siálico	PDGFR
AAV6	AAV1xAAV2	Ácido 2,3N/2,6N-siálico	EGFR
AAV7	Macaco	Ácido N-siálico	PDGFR
AAV8	Macaco	Desconhecido	LamR
AAV9	Humano	N-galactose	LamR
AAVrh10	Macaco	Desconhecido	Desconhecido
AAV10	Macaco	Desconhecido	Desconhecido
AAV11	Macaco	Desconhecido	Desconhecido
AAV12	Macaco	Desconhecido	Desconhecido

HSPG- proteoglicano de sulfato de heparano; FGFR-recetor do fator de crescimento do fibroblasto I; HGFR- recetor do fator de crescimento hepático; PDGFR- recetor do fator de crescimento derivado de plaquetas; LamR- recetor de laminina 37/67 KD; EGFR- recetor do fator de crescimento epidérmico

2.2. A infecção

O AAV encontra uma célula hospedeira, entra por endocitose mediada por recetor, o interior da célula escapa do endossoma com recurso a um domínio fosfolipase presente na VPI e dirige-se para o núcleo graças às terminações N das VPI e VP2, que funcionam como sinal de localização nuclear. Assim, vírus deficientes em VPI não são infecciosos. Após a descapsidação, tem que haver a conversão do genoma em dupla cadeia (dsDNA) com recurso à maquinaria celular. Após este passo a infecção pode ficar latente com o DNA, na forma de um epissoma ou integrado num cromossoma. Só na presença de um vírus auxiliar ou de stress celular é que o vírus completa o seu ciclo de replicação. Os adenovírus (Ad) e vírus herpes simplex (HSV) são os vírus auxiliares que na natureza são utilizados. Em alternativa podem ser fornecidos os genes E1a, E1b, E2a, E4orf6, e VA RNA para substituir essa função auxiliar e assim evitar também a replicação de partículas virais de Ad ou HSV. Na verdade, uma evolução importante na produção de AAV foi precisamente a introdução do método da transfeção de

triplo plasmídeo. Neste método (ver abaixo 2.3 Construções) utiliza-se um plasmídeo de empacotamento de um serotipo específico, um plasmídeo vetor com o DNA de interesse, mas não necessita da infecção por um vírus auxiliar pois utiliza-se ainda um terceiro plasmídeo (PXX6 patenteado por Xiao et al., 1998), que fornece os genes essenciais do vírus auxiliar (Grieger e Samulski, 2012).

2.3. Construções

Vetor de transferência, transporta o gene de interesse a ser incorporado no rAAV para futuramente ser entregue no órgão ou tecido e corrigir alguma patologia ou deficiência.

Plasmídeo de empacotamento, transporta os genes Rep e Cap de um serotipo de AAV predeterminado que, como anteriormente descrito, desempenham as funções de replicação e empacotamento viral.

Plasmídeo auxiliar, contém os genes E1a, E1b, E2a, E4orf6, e VA RNA, suprimindo assim a necessidade de infecção por um vírus auxiliar.

2.4. Melhoramentos na construção

O método da transfecção tripla constituiu um grande avanço na técnica de produção de rAAV. Além disso foram implementados mais dois melhoramentos, um destes foi a diminuição da expressão da proteína Rep, com consequente aumento da proteína Cap, que por sua vez aumenta a produção em 5 a 10 vezes por célula. Outro melhoramento foi o empacotamento cruzado do genoma do AAV do tipo 2 na cápside de outros serotipos. Assim obtém-se o mesmo genoma em diferentes cápsides, sendo a cápside a única variável, o que permite estudar o tropismo do vírus em modelos animais (Grieger e Samulski, 2012). A eficiência de transdução varia de 20 a alguns milhares de partículas genômicas por célula, dependendo se é mais ou menos permissiva. Analisando os passos limitantes da transdução destaca-se a importância da conversão da cadeia de ssDNA em dsDNA. Nesta fase é preciso a síntese ou recrutamento de uma cadeia autocomplementar para alcançar a expressão gênica. Este passo pode ser facilitado usando vetores autocomplementares (*selfcomplementary -scAAV*). Isto foi possível através da construção de uma molécula longa de ssDNA com o genoma invertido, com uma ITR mutada no meio e uma ITR normal em cada ponta. Desta forma a molécula dobra sobre si mesma e ocorre o emparelhamento intramolecular originando uma cadeia dsDNA, como é possível observar na figura 1 (McCarty et al., 2003).

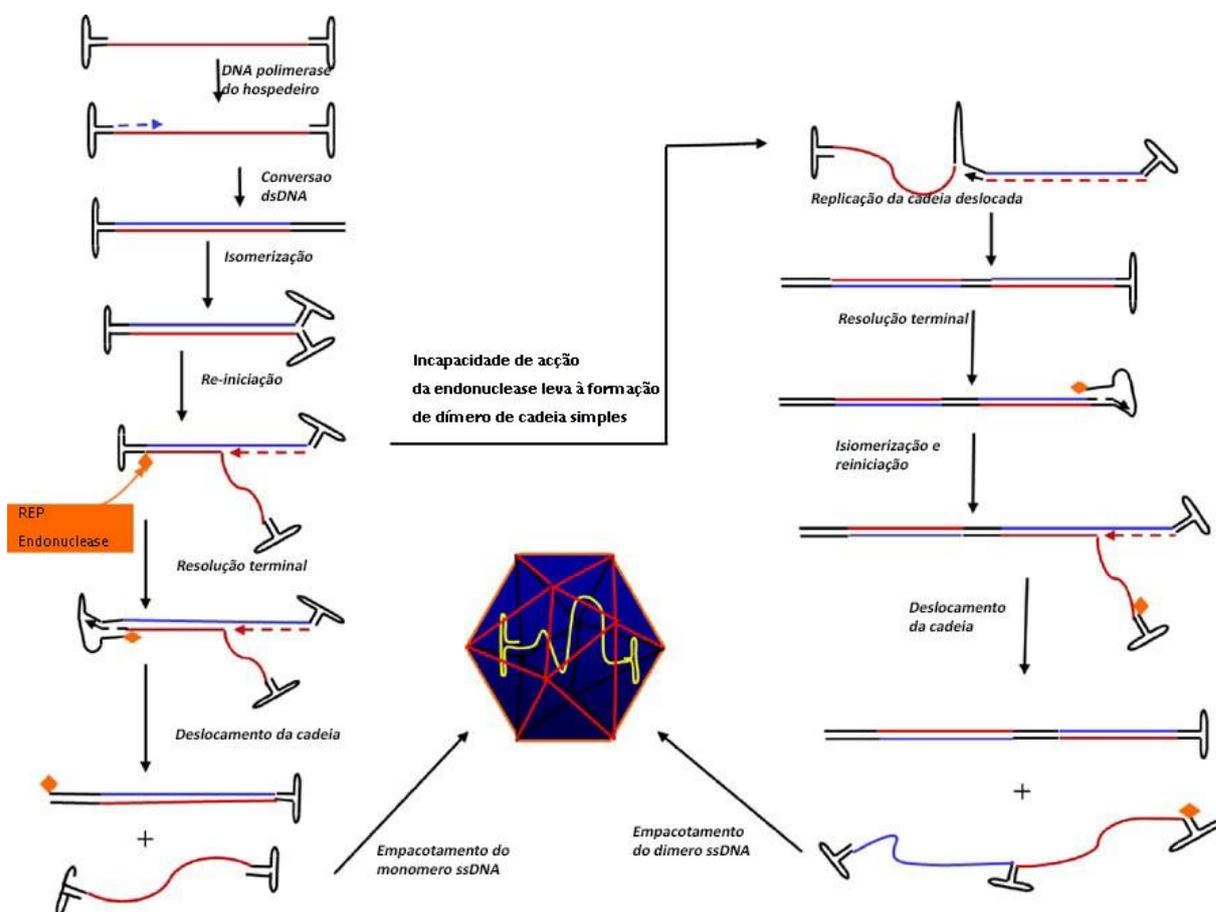


Figura 1- Ciclos de replicação de AAV. No lado esquerdo é possível observar esquematicamente os processos que ocorrem para a formação de um genoma de cadeia simples. No lado direito observam-se os acontecimentos que ocorrem no caso de um genoma auto-complementar. O genoma do tipo selvagem é composto por duas repetições terminais invertidas. Para produzir eficientemente o vetor auto-complementar é feita uma alteração ao nível de uma das repetições terminais, ou seja, é apagado o local de resolução terminal. Assim, fica comprometida a iniciação da replicação nessa terminação mutada. Como a molécula não é cortada, é replicada como um todo sendo constituída por duas repetições terminais invertidas do tipo selvagem e uma repetição terminal mutada no meio da molécula. Após a descapsidação, o genoma dobra sobre si mesmo e assim ultrapassa o passo limitante da síntese do intermediário de cadeia dupla, melhorando a capacidade de transdução.

Este método apresenta uma vantagem notável em termos de rapidez de início de expressão, mas tem limitações dada a pequena capacidade de carga que os sistemas de transporte de AAV apresentam (cerca de 4,7 a 5,0 kb incluindo a ITR). Assim, os vetores de cadeia simples (ssAAV) têm capacidade para carregar uma sequência recombinante de cerca de 4,4-4,7kb, enquanto os vetores autocomplementares (scAAV) são capazes de carregar uma sequência apenas com metade do tamanho. O espaço é, portanto, nestes vetores autocomplementares um problema ainda maior, o que requer uma grande otimização dos elementos reguladores bem como dos codões do transgene. Alguns grupos de investigação tentaram passar este problema usando dois plasmídeos para fazer recombinação homóloga.

Outras limitações podem ser o transporte para o núcleo e a descapsidação. Existe também um período de instabilidade no dsDNA que leva a alguma perda de expressão gênica. O conhecimento destes passos limitantes contribui para o estabelecimento de uma dose terapêutica adequada (Grieger e Samulski, 2012).

3. Tipos séricos dos AAV

Como já anteriormente referido, estão identificados mais de 100 serotipos, mas apenas alguns estão devidamente estudados e disponíveis para terapia gênica.

Um requisito essencial e a principal limitação da terapia gênica é a capacidade de dirigir a entrega de genes para um tecido alvo e evitar a entrega num tecido não desejável. Assim, torna-se imperativo a construção de um sistema dirigido para um alvo que evite a introdução de material genético na célula errada, doses terapêuticas muito elevadas e transdução ineficiente no tecido alvo. O serotipo de AAV a usar deve ser minuciosamente escolhido, pois os recetores da superfície da cápside são essenciais para a ligação do vírus à célula alvo e consequente internalização, e estes variam, respetivamente, consoante o serotipo. Como pode ser verificado no anexo I, foram injetados murganhos com cada um dos tipos séricos de AAV contendo o gene marcador da luciferase e mediu-se a luminescência para cada um dos AAV ao longo de vários meses. Isto permitiu avaliar o tropismo e a duração da expressão gênica.

Perante os dados foi possível dividir os serotipos em 3 grupos, classificaram-se os serotipos 2 e 4 como de baixa expressão, 1, 5 e 20 como de média expressão, e os serotipos 7, 8 e 9 como de alto nível de expressão. Quanto ao tropismo, é possível verificar que o serotipo 9 é preferencial para transdução no sistema nervoso e coração, o serotipo 6 é preferencial para a medula espinhal, o serotipo 8 para o tecido muscular e retina, enquanto o serotipo 4 expressa melhor no pulmão (Koichi Miyake, Noriko Miyake, Yoshiyuki Yamazaki, 2012).

Analisando a sequência de aminoácidos das proteínas da cápside, verifica-se que a variabilidade não está distribuída uniformemente, mas sim concentrada nos domínios enrolados expostos na superfície da cápside. Verificou-se também que de uma forma geral os vários serotipos têm uma homologia de 45% entre si, destacando-se o 4 e 5 como mais divergentes. No entanto não foi possível concluir se os domínios são diferentes pelos diferentes níveis de expressão gênica. Um outro estudo mais recente (Keiser *et al.*, 2011) mostrou que cada serotipo utiliza mecanismos de tráfego intracelular diferentes, bem como

mecanismos pós-nucleares que determinam a eficiência de transdução. Assim, ultrapassando as barreiras que limitam a descapsidação e promovendo a degradação do vetor pode-se melhorar o nível de expressão gênica em tecidos específicos.

Recorrendo a todos os dados disponíveis, incluindo a estrutura cristalina e microscopia eletrônica sobre os serotipos estudados é possível selecionar o serotipo mais adequado para um grupo de doenças em particular, o design racional da cápside com características específicas e ainda a geração de bibliotecas de cápsides que podem ser usadas em estudos dirigidos.

4. Métodos de produção

Os vetores virais adeno-associados têm mostrado ser uma tecnologia muito promissora em terapia gênica, que se encontra em constante evolução. Têm sido descobertos novos serotipos, bem como forma de os vetorizar para determinado órgão ou tecido alvo, entre outras descobertas. Paralelamente a estes desenvolvimentos, estão a ser feitos esforços no sentido de alcançar um processo de produção escalável que possa gerar vetores AAV recombinantes em grande quantidade, com elevada pureza e elevada potência.

A forma mais usual de produção era, até aqui, a transfeção transiente de células aderentes HEK293 (células embrionárias de rim humano transformadas com DNA de adenovírus). Os novos avanços encaminham-se no sentido de procurar métodos passíveis de transposição de escala o que tem levado os investigadores a afastarem-se um pouco do uso de células HEK293 aderentes. Três das possíveis abordagens emergentes são a) o desenvolvimento de linhas celulares HEK293, capazes de crescer em suspensão num meio isento de soro animal, b) o sistema de vetores de expressão de baculovirus (BEVS), usando células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) e c) a dupla infecção de células de rim de hamster bebé por HSV recombinantes. Qualquer uma das abordagens se apresenta como uma abordagem promissora passível de transposição de escala, com aplicação das GMP e capacidade de produção de material para aplicações clínicas (Grieger e Samulski, 2012).

4.1. Produção de AAVs por transfeção transiente

Este método consiste na introdução de plasmídeos de DNA em células eucarióticas, normalmente as células HEK293. Isto é, conseguido através da precipitação dos plasmídeos com fosfato de cálcio, o que induz a criação um poro temporário na membrana, que é

reparado após a entrada do plasmídeo. No meio de cultura são colocadas as células, o fosfato de cálcio e os plasmídeos de interesse em concentrações equimolares, quer sejam dois plasmídeos (empacotamento e vetor) quer sejam três (empacotamento, vetor e auxiliar). Este método tem sido o mais utilizado e tem sido objeto de intensa investigação, como se pode verificar no anexo 2, sendo diversas as variantes testadas por diversos autores, em que se alterna entre transfeção tripla ou apenas dupla, se utilizam as células em culturas aderentes ou em frasco, com diferentes serotipos e diferentes métodos de purificação.

A principal limitação deste método é a dificuldade em aumentar a escala, pois requer um aumento linear do número de placas ou frascos, e para produção de material para uso clínico seria necessário um aumento tão grande que seria impraticável (Clément e Grieger, 2016).

Tem sido desenvolvido trabalho considerável com as células HEK293 no sentido de criar uma linha celular adaptada capaz de crescer em suspensão num meio isento de soro animal, mas normalmente resulta numa produção muito inferior às células aderentes.

Grieger e Col. (2015) desenvolveram uma linha celular HEK293 que cresce e é facilmente transfetável num meio otimizado isento de soro. Estas células resultaram de um clone inicial de células em que foram escolhidas as que tinham alta eficiência de transfeção e alta produção de vetores rAAV. Utilizando o método da transfeção tripla, a suspensão de células é capaz de gerar vetores na ordem de 1×10^5 vetores por célula, valores aproximados aos obtidos por células aderentes. Este método não recorre a componentes animais nem a antibióticos. As células são cultivadas em bioreactores WAVE, com agitação em onda e cerca de 48 horas após a transfeção, as células são colhidas, seguindo-se o processo de purificação. Este método permite a transposição de escala para produção de vetores para ensaios pré-clínicos e clínicos de acordo com as respetivas Boas Práticas de Fabrico.

4.2. Produção em linhas celulares estáveis

Este método consiste numa fase inicial na obtenção de uma linha celular estável contendo no seu genoma os genes de empacotamento Rep e Cap e o rAAV. A linha celular normalmente é de células HeLa (linhagem celular imortal de origem cancerígena), por ser muito resistente. As células são carregadas com os genes Rep e Cap, e ainda com o gene de interesse recombinante mediante transfeção, ocorrendo assim a integração no genoma da célula. Após esta fase, as células são infetadas com adenovírus, que cedem as funções auxiliares à replicação viral, é feito um screening da produção viral e é feita também a quantificação.

Feita a seleção das células capazes de produzir o vetor pretendido são então colocadas em cultura. Tendo esta cultura celular estável, através da infecção de um adenovírus ou um rHSV, que lhes fornecem as funções auxiliares de replicação, as células começam a produzir rAAV (Clark, 2002). Neste sistema de produção conseguem-se produções na ordem de 1×10^4 , o que em 2002 seria um bom valor, mas está muito aquém das produções atualmente alcançáveis.

4.3. BEVS- Sistema vetorial de expressão de baculovírus

O sistema BEVS utiliza células de inseto que crescem a 27°C num meio isento de soro. Este método não requer a utilização de um vírus auxiliar, mas requer a infecção por um a quatro baculovírus que codificam os genes Rep e Cap e o transgene de interesse.

O sistema BEVS apresenta a vantagem de ser um método isento de componentes animais e passível de transposição de escala. Uma outra vantagem é utilizar a infecção em vez da transfeção (considera-se que a infecção é mais consistente e estável de lote para lote) e já é um método usado a nível comercial para produção de proteínas (Grieger e Samulski, 2012).

Contudo, este sistema apresenta também algumas desvantagens, como o facto de serem necessários mais de 2 meses para produzir um baculovírus totalmente caracterizado, necessário para infetar as células de inseto. Os baculovírus têm baixa estabilidade podendo perder o transgene e os AAV recombinantes são menos infecciosos do que os formados por células HEK293. Uma outra desvantagem é a razão de subunidades incorporadas na cápside ser diferente quando comparada com os formados por células HEK293 e a existência de diferenças nas modificações pós-translacionais entre as células de inseto e as células de mamífero.

4.4. Sistemas de infecção baseados em rHSV

Os métodos de produção de AAV recombinantes por sistemas de infecção por rHSV são baseados apenas em infecção e não dependem de uma linha celular pró-viral. Os elementos reguladores *cis* e *trans* necessários à replicação e empacotamento são fornecidos nos vetores recombinantes de HSV, e o rAAV é produzido por um passo simples de infecção usando dois vetores rHSV. Um contém os genes Rep e Cap do AAV e o segundo tem o transgene de interesse. Este método é passível de transposição de escala mediante substituição da utilização de células HEK293 por células de inseto em suspensão. Avanços recentes permitem a redução

da quantidade de rHSV necessário para infectar as células em suspensão, proporcionam uma maior densidade celular no momento da infecção e um decréscimo no tempo de cultura.

Têm sido despendidos grandes esforços no sentido de caracterizar os rHSV necessários para produção de AAV em grande escala. É também um desafio obter títulos de HSV elevados mas sem capacidade de replicação de forma a assegurar a sua segurança, o que por sua vez também baixa o rendimento, pois são sensíveis às condições de processamento (Grieger e Samulski, 2012).

Um trabalho recente, (Adamson-Small *et al.*, 2016), descreve um método de produção de rAAV, aplicado ao serotipo 9, que permite a utilização para ensaios clínicos respeitando as Boas Práticas de Laboratório e ainda com características que permitem a ampliação e cumprimento de Boas Práticas de Fabrico a uma escala comercial. Este método baseia-se na infecção de células HEK 293 aderentes por um rHSV. Neste estudo foi conseguida uma produção quatro a cinco vezes superior quando comparado com o método de transfeção. No entanto, quando experimentado para o serotipo 1, o mesmo não aconteceu, verificando-se uma produção ainda menor.

O aumento verificado deve-se a características intrínsecas do serotipo e a um aumento de produção em cerca de duas vezes do número de vetores por célula. Outro aspeto interessante foi a diminuição da razão vetores genómicos/partículas infecciosas, que se traduz num aumento de dezoito vezes mais de unidades infecciosas em relação aos métodos de transfeção. O aumento da infecciosidade pode estar relacionado com a estabilidade melhorada e características da cápside, que permitem uma melhor entrega do genoma no núcleo. A razão pela qual existe este aumento pode estar relacionada com funções auxiliares fornecidas pelo HSV. O pH baixo dos excipientes, baixa a atividade das proteases endógenas e aumenta também a estabilidade da preparação.

Uma outra variante do método de produção de rAAV por infecção por HSV foi estudada em (Thomas *et al.*, 2009), que consiste na infecção de células de rim de hamster bebé em suspensão num bioreator capaz de suprir as necessidades em material para estudos pré-clínicos e clínicos. Também neste estudo foi observada uma baixa razão de vetores genómicos/unidades infetantes e uma relação de cápsides cheias/vazias semelhantes às obtidas para as células HEK293. Neste trabalho conseguiram-se cerca de 1×10^{16} vetores num total de 100 litros, com uma recuperação de 23%, resultando assim em sensivelmente $1,4 \times 10^4$ vetores genómicos por célula, apresentando-se como um valor relativamente baixo para os métodos atuais.

4.5. Ideias a reter dos métodos de produção

Atualmente existem várias plataformas de produção de rAAV, tendo cada uma as suas dificuldades a superar para alcançar a escala comercial. No entanto, os avanços no desenvolvimento de vetores, nomeadamente a melhoria do direcionamento e aumento da efetividade, levam a exigências de produção em larga escala mais baixas. Por exemplo, vetores cuja cápside apresente tirosina mutada apresentam uma capacidade de transdução 20 vezes superior. A cápside apresenta sete resíduos de tirosina que podem sofrer fosforilação e foram identificados dois resíduos de tirosina que ao ser mutados atrasam a degradação do vetor, aumentando assim a capacidade de transdução. Os métodos de produção utilizados mais frequentemente assentam, sem dúvida, na transfeção de células HEK293, por ser um método mais fácil e apresentar menor custo, no entanto, quando se pretende uma produção em mais elevada escala é de ponderar utilizar um método de infeção por rHSV. O tempo e custo de desenvolvimento do HSV recombinante pode ser elevado, mas a longo prazo com vista a uma larga produção pode vir a ser recuperado, uma vez que é capaz de gerar um título de AAV elevado e com alta potência.

5. Métodos de purificação

Os processos de purificação a jusante são fundamentais para o sucesso dos rAAV, nomeadamente para atingir material com alto título, alta potência e alta pureza. No entanto pretende-se ainda que, para efeitos de produção em larga escala, seja um método com alta recuperação de produto. As principais barreiras a ultrapassar são a separação dos rAAV das impurezas celulares e virais, remoção das cápsides vazias, que ainda depende de gradientes de densidade e a potência e estabilidade dos rAAV purificados, que depende dos métodos utilizados para produção, purificação e formulação (Clément e Grieger, 2016).

São muitos os métodos utilizados na purificação de AAV, por vezes desenvolvidos para um serotipo em particular, havendo assim uma lacuna na padronização. No entanto, os processos de purificação têm no mínimo cinco fases, (a) colheita das células produtoras, (b) lise celular, química ou mecânica com vista a libertar os rAAV, (c) digestão enzimática, geralmente com uma benzonase dos ácidos nucleicos virais e celulares, (d) um a três passos de separação cromatográfica ou por gradiente de densidade, (e) concentração, formulação e filtração estéril.

Normalmente os meios de cultura são sujeitos a centrifugação para a recolha das células produtoras, descartando-se o sobrenadante, apesar de, dependendo do método de produção, tempo de colheita e serotipo produzido, se poder também purificar uma quantidade

significativa de rAAV. Depois da lise segue-se uma filtração por fluxo tangencial para clarificar o lisado e produzir um volume de trabalho menor, visto que o volume da amostra elevado requer espaço e equipamento adaptado e aumenta os tempos de processamento. Por isso é ainda uma questão a avaliar, se o material que se recupera do sobrenadante compensa o acréscimo de trabalho de processamento.

A cromatografia de afinidade e de troca iônica são os métodos mais amplamente utilizados para a separação de rAAV, devido à sua eficiência, versatilidade e potencial de ampliação de escala.

A cromatografia de afinidade assenta na afinidade da partícula viral a um substrato semelhante ao recetor celular, já a cromatografia de troca iônica depende da interação eletrostática entre as cápsides e os grupos da matriz da coluna (ambos com grupos ionizados). A cromatografia de troca iônica é teoricamente aplicável a todos os serotipos, mas as propriedades físico-químicas requerem ajustes individuais. As colunas são escolhidas com base na sua qualidade, fiabilidade, que se traduz por consistência entre lotes e possibilidade de aumento de escala. Os serotipos 1, 2, 8, 9 e rh10 já foram, até ao momento, purificados com sucesso utilizando um ou dois passos de cromatografia de troca iônica. A principal limitação é a incapacidade para separar partículas cheias de partículas vazias. Atualmente a única forma de separar partículas cheias de partículas vazias é por gradiente de iodixanol ou cloreto de céσιο. Dependendo do volume da amostra, a separação pode ser efetuada num passo precoce ou mais tardiamente após a purificação. O problema deste método é o facto de se tornar muito demorado, existir o risco de contaminação e a necessidade de análise de contaminantes, assim como a dificuldade no aumento de escala. Usualmente, após a purificação existem um ou dois passos de concentração e ajuste de pH (Clément e Grieger, 2016).

5.1. Iodixanol e cloreto de céσιο

A purificação por gradiente de iodixanol ou cloreto de céσιο está presente na maioria dos protocolos de purificação de rAAV, geralmente como um passo anterior a uma cromatografia ou outro método separativo. Seria útil saber os prós e contras de cada método para melhor escolher o método mais adequado, e foi esta comparação que foi descrita em (Strobel *et al.*, 2015).

Numa primeira análise pode-se verificar que o método por cloreto de céσιο é mais demorado e trabalhoso como se demonstra detalhadamente a figura 2.

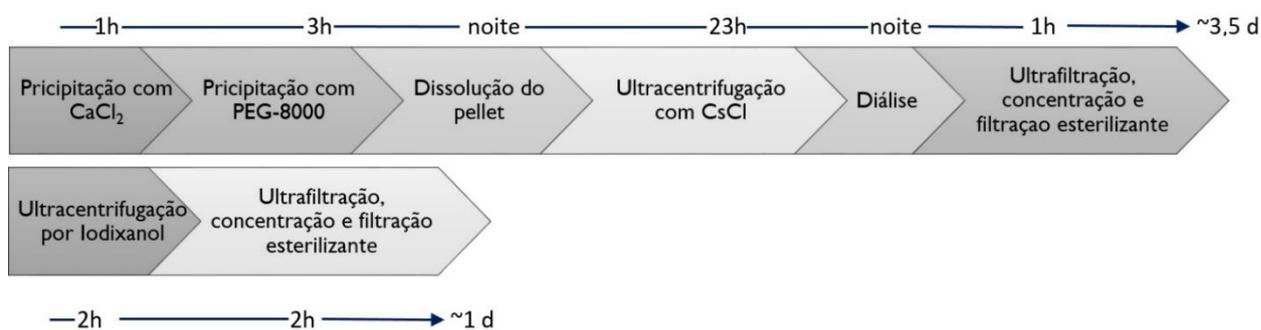


Figura 2- Comparação esquemática dos dois processos de purificação. Após a lise celular por 3 ciclos de congelamento e descongelamento o lisado é purificado por cloreto de céσιο ou iodixanol. No caso de cloreto de céσιο (fluxograma superior) é feita uma precipitação com CaCl₂ e com PEG-8000 para remover ácidos nucleicos e proteínas respetivamente. O pellet formado fica a dissolver durante a noite e é sujeito a ultracentrifugação por CICs. Durante a noite, por diálises consecutivas é removido o CICs, concentrado por ultracentrifugação e esterilizado por filtração. No fluxograma inferior está representado o método de purificação por iodixanol em que o lisado celular é sujeito a uma ultracentrifugação por gradiente de densidade de iodixanol. De seguida o iodixanol é removido por 3 ciclos de ultrafiltração e finalmente esterilizado por filtração.

Além do tempo requerido para uma purificação por cloreto de céσιο, não é o método em que se obtém uma maior pureza, pois ainda é possível encontrar resíduos proteicos na amostra. No entanto é o método mais eficaz na separação das cápsides vazias, no purificado final são encontradas menos de 1%, enquanto que purificado por iodixanol é possível encontrar cerca de 20%, assim o purificado por CsCl apresenta maior atividade. A remoção do iodixanol é também um passo importante uma vez que não é desejável que fique na formulação final. A sua remoção pode ser feita por vários métodos sendo que por ultrafiltração se consegue uma maior recuperação, cerca de 92,6%.

Balaceando todos os aspetos pode-se considerar que o iodixanol se torna um pouco melhor apresentado um grau de pureza ligeiramente melhor e tem a vantagem visível do tempo. Estes métodos numa perspetiva de produção industrial não são passíveis de transposição de escala, mas continuam a ser úteis em investigação laboratorial.

5.2. Cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade na purificação de rAAV baseia-se na afinidade das moléculas da superfície da cápside para o material de que é composta a coluna. Zolotukhi e Col. descreveram um método de purificação para os serotipos 1, 2 e 5 (Zolotukhin et al.,

2002). Neste caso a lise celular foi promovida por ciclos de congelamento e descongelamento, seguida de digestão com benzonase. Por último, antes da cromatografia foi feita uma purificação inicial por gradiente de iodixanol. A cromatografia propriamente dita, tendo em conta as características físico-químicas da cápside, para o serotipo 2 pode ser efetuada com recurso a uma coluna de heparina. Como os serotipos 1 e 5 não podem ser purificados na coluna de heparina, utilizou-se uma coluna Q-Sepharose que é capaz de purificar os serotipos 1, 2 e 5. O método mostrou ser capaz de separar adequadamente as impurezas e permaneceu intacta a integridade da cápside e do genoma.

5.3. Cromatografia de troca aniónica

Grieger e Col. descreveram um método de purificação por cromatografia de troca iónica aplicável à purificação de vários serotipos (1 a 6, 8 e 9). As células são colhidas por centrifugação a baixa velocidade formando um agregado do qual se descarta o sobrenadante (Grieger, Soltys e Samulski, 2015). O agregado de células é sujeito a um banho de ultra-sons, do qual se obtém um lisado celular que é então incubado com benzonase. A benzonase vai remover todo o material genómico em solução, quer seja de origem celular ou viral, segue-se uma clarificação por centrifugação a baixa velocidade e depois a clarificação final por gradiente descontínuo de iodixanol. Os rAAV são colhidos na interface de 60/70% de iodixanol e são então sujeitos a cromatografia de troca aniónica. À saída, os picos cromatográficos são dialisados num tampão adequado e, após filtração esterilizante, obtêm-se os AAV recombinantes de alta qualidade e pureza com uma percentagem de cápsides cheias acima de 90%.

5.4. Cromatografia de troca catiónica

São várias as publicações que relatam a utilização de cromatografia de troca iónica, neste caso catiónica. O método descrito em (Potter *et al.*, 2014) tira vantagens de duas propriedades bioquímicas dos rAAV, a sua estabilidade em meio ácido e o baixo ponto isoelétrico. Descreve, portanto, um processo de cromatografia de troca iónica precedido de um método inicial de purificação parcial pouco usual. Após a colheita das células produtoras (células de mamífero ou células de inseto) e lise celular, o lisado é sujeito a uma floculação a pH baixo (acidificação do meio com ácido cítrico). O passo de floculação elimina os contaminantes, nomeadamente ácidos nucleicos e proteínas, permitindo assim a purificação

posterior por cromatografia. Após a cromatografia o produto final é concentrado por filtração de fluxo tangencial. Este é um método que é aplicável a qualquer serotipo e verificou-se que o passo da floculação não altera a função do vetor. No entanto continua a ser um desafio técnico a separação das cápsides vazias sem um passo de ultracentrifugação.

5.5. Cromatografia de troca iônica e filtração em gel

Os métodos de cromatografia normalmente têm um passo anterior de ultracentrifugação por iodixanol ou por cloreto de céσιο, o que além dos problemas inerentes à toxicidade destes compostos acarreta ainda o problema da dificuldade em aumento de escala.

Nesse sentido, Tomono e Col. desenvolveram um método para resolver as limitações da cromatografia por si só não ser capaz de separar as partículas vazias, mas que não precisa de recorrer a métodos de ultracentrifugação e com potencial de utilização em larga escala. Neste trabalho tirou-se partido da razoável quantidade de partículas AAV do serotipo I que pode ser obtida no sobrenadante, com uma pureza muito superior à do lisado celular (Tomono *et al.*, 2016). O sobrenadante é então sujeito a uma filtração de fluxo tangencial, dialisado num tampão adequado e sujeito a uma separação por cromatografia de afinidade iônica. Numa fase inicial a amostra passa numa coluna catiónica Mustang SXT, remove as partículas vazias, de seguida uma passa numa coluna aniônica Mustang QXT, que absorve as partículas cheias, após a cromatografia de troca iônica segue-se a cromatografia de exclusão molecular numa coluna Superdex 200 responsável pela remoção de algumas impurezas de natureza proteica. Em suma, este apresenta-se como um método muito efetivo e possível de utilização em larga escala de acordo com as Boas Prática de Laboratório e de Produção, no entanto, o método de separação assenta no ponto isoelétrico do rAAV. Neste trabalho foi estudada a sua aplicação ao serotipo I, no entanto, fica por estudar se pode ser aplicado a outros serotipos, uma vez que a absorção da coluna varia consoante a carga elétrica da partícula.

6. Métodos de determinação do título

Para utilização clínica os rAAV têm que preencher determinados requisitos e especificações estabelecidos pelas autoridades competentes como a FDA. Esses requisitos incluem a determinação da segurança, pureza, concentração, identidade, potência e estabilidade.

Na determinação do título inclui-se a determinação da concentração de vetores genômicos, mas também a determinação do título infeccioso, que se traduz na potência da preparação. Quanto ao método a utilizar exige-se que seja linear, reprodutível, específico, sensível e robusto nos intervalos dos padrões internos. Atualmente ainda existe uma falta de padronização quanto aos métodos não só de determinação do título, mas também de todos os métodos de caracterização do material obtido. Isto gera uma grande dificuldade de comparação entre laboratórios (Clément e Grieger, 2016).

6.1. Medidas com base na infetividade viral

6.1.1. Ensaio de transdução

O ensaio de transdução permite, em certa medida, determinar a capacidade de infecção da preparação, quando comparados os resultados com o título de partículas. Geralmente faz-se uma construção do vetor em estudo com um transgene GFP que codifica uma proteína fluorescente. A preparação é incubada em células e mais tarde faz-se a contagem das unidades emissoras de fluorescência ao microscópio de fluorescência (Grieger, Soltys e Samulski, 2015).

6.1.2. Fluorescent Focus Assay (FFA)

Ensaio semelhante ao ensaio em placa descrito abaixo, mas em que não é utilizada nenhuma camada de agar. Após um tempo de infecção de 24-72 horas, as proteínas virais expressas pelas células infetadas são detetadas através da utilização de anticorpos marcados com fluorescência. O resultado pode ser obtido por visualização direta ao microscópio de fluorescência. É um método muito mais rápido e sensível que os ensaios em placa, mas muito mais dispendioso devido ao preço dos anticorpos. Comparar os anticorpos adequados para determinadas preparações pode ser também uma barreira ao uso deste método, e o uso de anticorpos não específicos pode resultar num valor obtido por excesso uma vez que podem ocorrer ligações inespecíficas (Virocyt, 2013).

6.1.3. Ensaio viral em placa

Trata-se de um método biológico de quantificação viral. Fazem-se uma série de diluições da amostra. Algumas dessas diluições são usadas para infetar células num meio nutriente adequado, e espera-se até que se observe efeito citopático. O número de partículas

infeciosas na amostra é calculado com base no fator de diluição. Este ensaio é muito útil para saber o número de partículas com capacidade infecciosa. No entanto, existem algumas desvantagens: é moroso, o efeito citopático pode demorar ou pode não alterar significativamente a morfologia da célula. A contagem do resultado como positivo depende do observador, o que aliado à variabilidade natural do ensaio pode originar 5% a 44% de variação. Outra desvantagem é o facto de ser bastante trabalhoso e demorado (Virocyt, 2013).

6.2. Medidas com base na concentração antigénica ou expressão génica

6.2.1. PCR em tempo real quantitativo

O PCR em tempo real quantitativo (qPCR) é utilizado com muita frequência para a quantificação de rAAV. É um método que se apresenta como rápido, fácil de executar, barato e preciso. Contudo, a qPCR sofre uma grande variação de resultados, que se torna ainda mais acentuada quando se trata de AAV auto complementares. Isto acontece porque, como anteriormente descrito, o genoma dos AAV tem duas sequências ITR que podem formar estruturas palindrómicas. No caso de genomas auto complementares há ainda o risco de se formarem moléculas em gancho, resultantes da ligação de dois monómeros de cadeia simples através das suas ITR mutadas que não têm o local de resolução terminal. Estas estruturas que se formam interferem com a hibridização dos *primers* de qPCR, levam a uma ligação muito inferior e daí surgem títulos muito subestimados de AAV.

Como forma de melhorar este método de PCR introduziu-se uma modificação, um passo de incubação com uma enzima de restrição *SmaI* (Wang *et al.*, 2013). Esta enzima digere o DNA de forma anormal, por criar extremidades de pontas rombas (Withers e Dunbar, 1993). Desta forma torna-se mais difícil ocorrer a formação de estruturas que impeçam a ligação dos *primers*. Assim conseguem-se obter títulos muito mais elevados e diminui-se a variação entre ensaios. Outro fator importante é a sonda que é utilizada, idealmente seria preferível a SYBR[®] Green, uma vez que se apresenta como mais barata e conveniente. No entanto a TaqMan[®] é mais sensível e reprodutível permitindo uma melhor quantificação.

6.2.2. Ensaio Dot-blot

Uma outra técnica à qual se pode recorrer para determinar o título de uma preparação é o ensaio *dot-blot*. É um ensaio desenhado para detetar apenas genomas empacotados, e traduz o número de partículas, sejam elas funcionais ou não. A amostra é sujeita a um

tratamento por benzonase para remover o DNA não empacotado, de seguida o DNA do vetor é extraído e transferido para uma membrana de nylon juntamente com uma série de padrões do plasmídeo. Cada ponto dessa membrana é sondado para o transgene e é feita uma comparação (figura 3) do sinal gerado pela amostra com o gerado pela série de padrões, determinando-se assim o título. Esta particularidade pode ser usada para comparar a potência entre diversos serotipos quando comparado com o título infeccioso para determinada célula (Zolotukhin *et al.*, 2002).

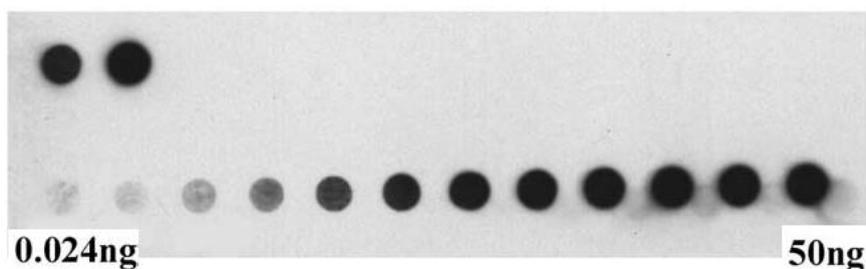


Figura 3 - Fotografia de uma membrana de Dot blot. Na linha superior as duas manchas correspondem as dois pontos de inserção de amostras, na linha inferior são os pontos correspondentes a uma serie de padrões de massa conhecida (0.024ng a 50ng). O cruzamento de dados, comparação do sinal obtido pela amostra com o sinal obtido para os padrões permite a determinação do título.

6.3. Contagem direta das partículas

6.3.1. Microscopia eletrónica de transmissão

A microscopia eletrónica de transmissão é um método que permite visualizar e determinar o título de partículas presentes na preparação. A amostra é aplicada numa malha, que é depois observada com uma ampliação na ordem de 50.000 vezes. Faz-se a contagem das partículas em alguns campos e determina-se o título. Tem que se enfrentar uma possível dificuldade, que é a amostra ter que estar uniformemente espalhada. Um aspeto positivo é o facto de na contagem ser possível distinguir partículas vazias de partículas cheias, como se pode verificar na figura 4 (Zeltner *et al.*, 2011).

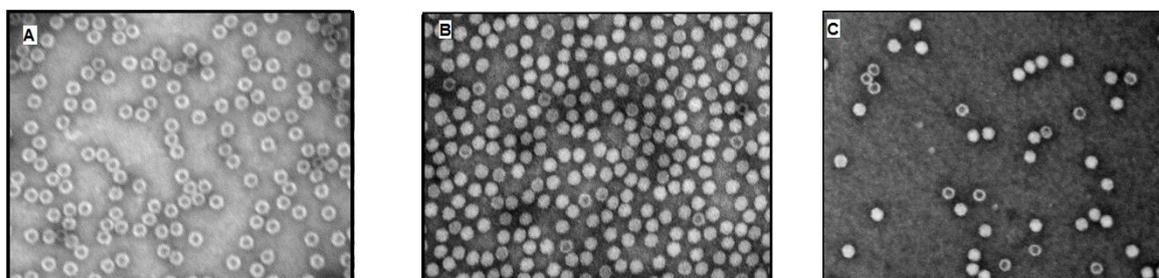


Figura 4- Imagens de microscopia eletrónica (ampliação de 50000) onde é possível distinguir partículas virais carregadas com o genoma e as partículas vazias. Na imagem A observa-se uma preparação com cerca de 0,8% de partículas carregadas. Na imagem B, por oposição observa-se 94% de partículas carregadas. Por último, na imagem C, há uma razão intermedia, sendo possível observar cerca de 64% de partículas carregadas.

6.3.2. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Os rAAV têm estruturas bem conhecidas, mas continua ainda a ser difícil medir rapidamente a concentração. Os ensaios em placas exigem muito trabalho e os resultados demoram muito tempo, por isso têm sido adotadas técnicas mais avançadas como qPCR ou ensaios ELISA para estimar o título de partículas. Apesar destas técnicas terem vantagens em relação aos ensaios em placas, continuam a precisar de dias para obtenção do resultado. É por isso que existe uma grande procura por um método rápido e direto.

O NTA é um método novo que permite obter em simultâneo a concentração e o tamanho das partículas, ou pode ainda ser usado como complemento às técnicas tradicionais como indicador do estado de agregação de forma muito rápida e fácil. O NTA tira partido da dispersão da luz e dos movimentos brownianos obtendo uma distribuição do tamanho de partículas da amostra, como se pode observar na figura 5. O tamanho mínimo detetado está de acordo com o índice de refração da partícula, pelo que não seria normalmente possível medir AAV. Através da ligação de nanopartículas de ouro às cápsides dos rAAV aumenta-se a quantidade de luz dispersa pela partícula, e já é possível fazer uma determinação rápida da concentração, tamanho e estado de agregação, o que não seria possível sem o acoplamento das partículas de ouro. Este acoplamento é feito através de atração eletrostática. O NTA não analisa um grande número de partículas, mas mede cada partícula por si individualmente. Tendo em conta o campo fixo de visão é possível estimar a concentração de partículas bem como a concentração de cada classe de tamanho. Este é, portanto, um método pioneiro que permite medir a concentração de partículas de AAV em minutos em vez de horas ou dias. Outra vantagem é o facto de ser uma medição direta do tamanho de partícula e da concentração, e não necessita de quaisquer conhecimentos sobre o genoma, eficiência de carga, eficiência de infeção, integridade da proteína da cápside ou estado de agregação (Malvern Instruments, 2015).

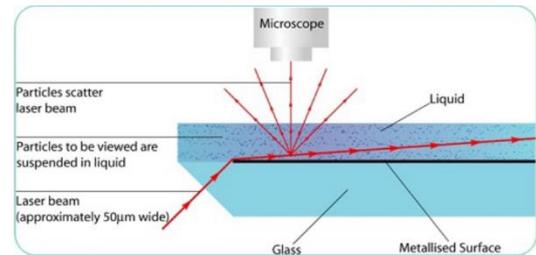


Figura 5 - Um feixe de laser atravessa a amostra encontrando as partículas que estão em suspensão. A interferência das partículas com o feixe laser é visível ao microscópio com uma ampliação de 20x onde está acoplada uma câmara que faz um vídeo de 30 fotogramas por segundo do campo de visão.

6.3.3. Vírus Counter 3100

O Vírus Counter 3100 é um equipamento novo, desenvolvido pela ViroCyt, uma empresa líder no que diz respeito à quantificação de partículas virais, que permite a determinação da concentração total de partículas com resultados precisos apenas em alguns minutos. Trata-se de uma tecnologia rápida para a deteção de partículas virais intactas, baseada na citometria de fluxo, desenhada para ambientes industriais, dispondo ainda de software compatível com ambiente GMP.

Este equipamento está otimizado para a quantificação viral com uma análise em menos de 5 minutos, utilizando um sistema de dupla coloração de fluorescência em que os genomas e cápsides são corados com uma combinação de corantes que apresentam fluorescência nas regiões do amarelo e vermelho do espectro visível. Esta abordagem permite uma deteção de uma grande variedade de vírus utilizando um ensaio simples, sem lavagem. As partículas coradas são sujeitas a focagem hidrodinâmica num fluxo estreito e forçadas a passar num ponto de inserção de laser. A fluorescência é detetada em dois canais óticos separados e tratada com *software* e *hardware* de compensação ótica para remover qualquer interferência entre os canais. A emissão de fluorescência em cada canal é medida em função do tempo e quando detetada simultaneamente corresponde a uma partícula viral intacta. O número de medições simultâneas contadas durante o tempo de análise tendo em conta o caudal da amostra permite calcular a concentração de partículas.

A conceção do aparelho garante que a taxa de fluxo é medida em tempo real com precisão e exatidão, pelo que não é necessário um padrão interno como nos métodos tradicionais.

O Virus Counter 3100, representado na figura 6, tem a possibilidade de melhorar o fluxo de trabalho, uma vez que é possível adicionar um amostrador automático que permite o processamento das amostras durante a noite e reduz a mão de obra.

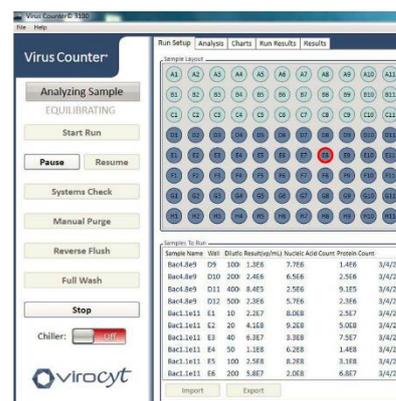


Figura 6 – (esquerda) fotografia do equipamento com montado em cima do amostrador automático. (direita) layout do software que controla o equipamento.

Outras características positivas são o facto de ter reagentes e recipiente para resíduos que garantem 15 horas de operação contínua, possui um desenho vertical e compacto que

minimiza o espaço ocupado na bancada, possui um isolamento que protege a amostra dos contaminantes ambientais e dispõe ainda de uma placa de refrigeração.

Assim, trata-se de um equipamento sofisticado capaz de analisar uma preparação de AAV ou outro qualquer vírus de uma extensa lista, garantindo resultados precisos e reprodutíveis em tempo real.

6.3.4. Tunable resistive pulse sensing – qViro-X

O TRPS é um Sistema de caracterização de nanopartículas poderoso que permite avaliar a concentração e tamanho das partículas. Baseia-se num sistema de impedância. É aplicada uma voltagem através de um poro que é preenchido com um eletrólito, resultando numa corrente elétrica. A partícula, ao atravessar o poro, aumenta a resistência elétrica. Este acontecimento cria um impulso proporcional ao volume da partícula. Este sistema está na base dos equipamentos qNano Gold e qViro-X (qNano funciona de forma semelhante, mas tem condições de pressão otimizadas para a medição da carga de superfície, enquanto que o qViro-X está otimizado para medir a concentração de partículas). Este equipamento foi desenvolvido pela Izon Science, que ao TRPS clássico adicionou um poro de tamanho ajustável e desenvolveu ferramentas de medição com forças motrizes ajustáveis, nomeadamente a tensão e pressão. A medição real de cada partícula que atravessa o poro é conseguida com base na calibração efetuada com partículas de tamanho e concentração conhecida.

O método TRPS determina a concentração e tamanho de partículas com alta precisão e exatidão. Além disso apresenta-se como um método fácil de executar, confiável e muito reprodutível (Weatherall e Willmott, 2015).



Figura 7- Imagem ilustrativa da instrumentação utilizada. A- qNano; B- qViro-X uma versão modificado do qNano com condições de pressão e tensão otimizadas para a medição da concentração de partículas; C- especificações operacionais do qViro-x.

6.4. Prós e contras dos vários métodos

Os métodos de quantificação com base na transdução originam sempre títulos inferiores ao obtidos por métodos que quantificam por exemplo ácidos nucleicos, isto porque para a infeção estão envolvidos outros fatores como proximidade da célula, estado de agregação e fatores biológicos. Outro facto importante é que das partículas virais produzidas nem todas têm capacidade infecciosa. No entanto, em terapia génica, as capacidades de infeção condicionam significativamente a eficácia de transferência de genes sendo, portanto, um importante parâmetro de controlo de qualidade. Técnicas que permitam medir o tamanho de partícula ajudam a saber o estado de agregação.

Os métodos de contagem física permitem distinguir partículas virais de componentes celulares, uma vez que não são sensíveis a proteínas nem ácidos nucleicos. No entanto, não permitem distinguir exossomas de partículas virais.

Do ponto de vista económico é difícil decidir qual dos métodos escolher, todos apresentam várias configurações diferentes. Por outro lado, têm que ser tomados em consideração os custos de consumo. Não há, até ao momento, um método em que se possam enumerar apenas aspetos positivos.

Tabela 2- Síntese dos métodos de determinação do título atualmente disponíveis com as suas respetivas características, nomeadamente o que é avaliado, a carga de trabalho exigida, o tempo, a reprodutibilidade e o custo envolvido.

Técnica	Avaliação	Trabalho	Tempo	Reprodutibilidade	Custo
Ensaio de transdução	Unidades de infeção	Elevado	Dias	Baixa	Moderado
FFA	Unidades de infeção	Elevado	Dias	Baixa	Alto
Ensaio viral em placa	Unidades de infeção	Elevado	Dias	Baixa	Baixo
qPCR	Expressão génica viral	Alto	Horas	Excelente	Alto
Ensaio dot-blot	Genoma viral	Moderado	Horas	Baixa	Moderado
Microscopia eletrónica de transmissão	Partículas virais	Elevado	Dias- semanas	Boa	Muito alto
Nanoparticle Tracking Analysis	Partículas virais	Baixo	Minutos	Excelente	Baixo
Virus counter	Partículas virais	Baixo	Minutos	Excelente	Baixo
Tunable resistive pulse sensing – qViro-X	Partículas virais	Baixo	Minutos	Excelente	Baixo

7. Conclusão

A terapia gênica constitui atualmente uma das tecnologias em saúde mais inovadoras e promissoras, uma vez que se propõe não o controlo dos sintomas de uma doença, mas sim a sua cura. Aplica-se sobretudo a patologias que assentam numa deficiência genética hereditária ou adquirida e consiste na entrega de um gene saudável para a correção de determinada função.

O meio de entrega é um vetor, na maioria das vezes viral, que pode ser um vírus adeno-associado (AAV), um tipo de vetores virais extensamente estudado e com mais de cem ensaios clínicos a decorrer para diversas patologias, e já com um medicamento no mercado para o tratamento da dislipidémia. Apesar disso, o processo de produção e purificação está ainda em fase de desenvolvimento e não há ainda um protocolo modelo definido a seguir.

Até ao momento estão identificados mais de 100 tipos séricos de AAV. O genoma do vírus selvagem é composto por uma molécula de DNA de cadeia simples e necessita da função auxiliar de outro vírus para completar o seu ciclo de vida.

Os métodos de produção assentam em quatro tipos; transfeção transiente (introdução de plasmídeos em células eucarióticas, geralmente células HEK 293), empacotamento em linhas celulares estáveis (linha celular com os genes virais expressos de forma estável), sistema de expressão recorrendo a baculovírus (infecção de células de inseto por baculovírus carregando os genes virais), sistemas de infecção baseados em rHSV (infecção de células eucariotas por HSV recombinantes contendo os genes virais).

Os métodos de produção mais extensamente utilizados consistem em protocolos de transfeção, por se apresentarem como métodos simples e rápidos de executar, no entanto, quando se exigem maiores volumes de produção é preferível optar um método baseado na infecção por um rHSV.

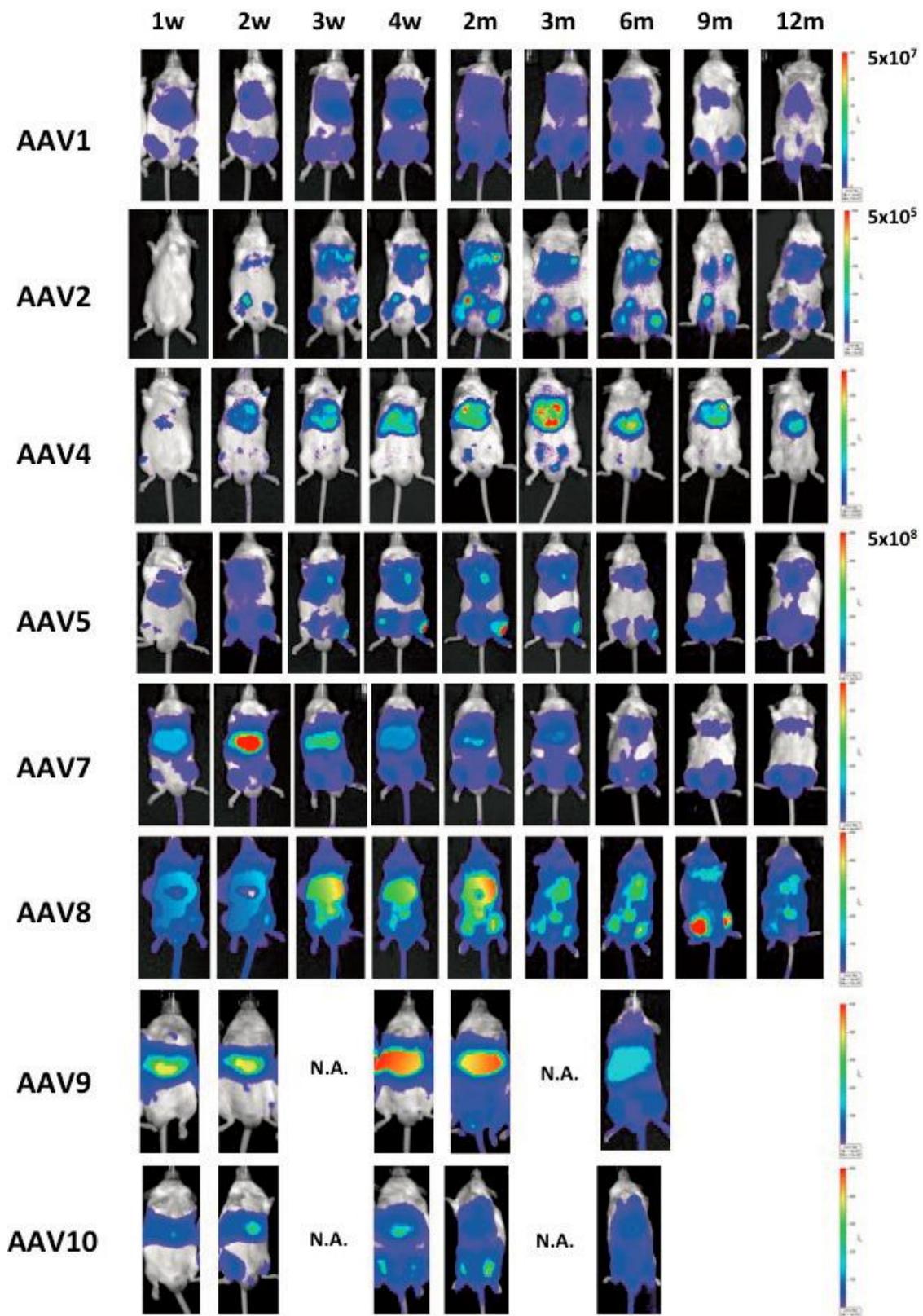
Para o sucesso das preparações de rAAV é fundamental o processo de purificação com vista a atingir um uma preparação com elevada pureza. Os processos de purificação têm no mínimo cinco fases, (a) colheita das células produtoras, (b) lise celular, química ou mecânica com vista a libertar os rAAV, (c) digestão enzimática, geralmente com uma benzonase dos ácidos nucleicos virais e celulares, (d) um a três passos de separação cromatográfica ou por gradiente de densidade, (e) concentração, formulação e filtração estéril, sendo o ponto (d) a maior variável. A purificação por gradiente de iodixanol e cloreto de céσιο apresentam um elevado desempenho, mas tem limitações ao nível da transposição de escala. Dentro dos métodos cromatográficos inclui-se a cromatografia de afinidade, cromatografia de troca iónica

e a filtração em gel. Estes métodos apresentam-se como muito promissores ao nível da transposição de escala e mais rápidos.

A determinação do título é fundamental para a padronização e definição da dose terapêutica. Neste momento ainda não há um método definido como ideal. Os métodos assentam na medição de 3 características dos vetores, a infetividade, a expressão génica e contagem direta das partículas. Os métodos que assentam na medição da infetividade ou da expressão génica, medem características importantes para avaliar o desempenho da preparação *in vivo*, no entanto apresentam-se como muito trabalhosos e demorados. Os métodos de contagem física das partículas são os mais promissores principalmente quando estão automatizados. Atualmente o *Virus Counter*, *Nanoparticle Tracking Analysis* e o *Tunable Resistive Pulse Sensing* são técnicas automatizadas que assentam num equipamento específico e revelam ser muito rápidas, com baixo custo e apresentam resultados com excelente reprodutibilidade.

De um modo geral a terapia génica ainda tem um longo caminho a percorrer para encontrar um processo de produção com boas características, simples e passível de aumento de escala. Os processos de purificação e titulação são também muito variados, apresentam características mais ou menos favoráveis, mas não estão ainda definidos métodos padrão. São já vários os ensaios clínicos, mas o mercado é ainda muito imaturo, e há ainda um longo caminho a percorrer para a terapia génica se tornar uma realidade clínica.

Anexos



Anexo 1 Comparação do tropismo, duração e intensidade da expressão gênica dos diferentes rAAV, transportando o gene da Luciferase. O desempenho dos vetores foi avaliado in vivo por IVIS durante 12 meses.

Adaptado de (Koichi Miyake, Noriko Miyake, Yoshiyuki Yamazaki, 2012)

Centro de investigação	Produção	Células e plataforma	Purificação	Tipos séricos	Remoção de cápsides vazias
Powell Gene Therapy Center, Human Applications Laboratory, University of Florida, Gainesville, FL	Transfecção de 2 plasmídeos (CaPO ₄)	HEK293 Células aderentes	Colheita por microfluidização ou floculação ácida e lise, benzona-se, cromatografia de afinidade de heparina, cromatografia de troca iónica (IEC) e filtração de fluxo tangencial em fibra oca (TFF)	1, 2, 2(Y444, 500, 730F), 9	Não
Center for Cellular and Molecular Therapeutics, Children's Hospital of Philadelphia, PA	Transfecção de 3 plasmídeos (CaPO ₄)	HEK293 Frascos em agitação	Colheita das células e do meio, TFF e microfluidização, benzona-se, IEC, gradiente CsCl e TFF.	2	Sim
Avigen Incorporation, Alameda, CA	Transfecção de 3 plasmídeos (CaPO ₄)	HEK293	Colheita das células, precipitação com PEG, gradiente CsCl, diálise e concentração.	2	Sim
St Jude Children Hospital	Transfecção de 2 plasmídeos (CaPO ₄)	293-T Células aderentes	Colheita por microfluidização, 3 passos cromatográficos: Sephacryl, Poros 50HQ, Sephacryl; TFF	8	Sim
Children's GMP, Memphis, TE					
Belfer Gene Therapy Core Facility, Weill Cornell Medical college, New York, NY	Transfecção de 2 plasmídeos (CaPO ₄)	293-T Células aderentes	Colheita por congelamento/descongelamento, iodixanol, cromatografia de afinidade de Heparina e diálise.	2, rh10	Sim
Neurologix, Ft Lee, NJ	Transfecção	HEK 293	Cromatografia de afinidade de Heparina.	2	
Asklepios Bio-Pharmaceuticals and University of North Carolina, Vector Core, Chapel Hill, NC	Transfecção de 3 plasmídeos (PEImax)	Suspensão de células HEK 293 em frascos de agitação e biorreator em onda.	Colheita das células, ultrassons, benzona-se, clarificação, gradiente de iodixanol, cromatografia de troca aniónica, diafiltração	2, 2.5, 2i8, 8, 9	Sim
Harvard Gene Therapy Initiative, Boston, MA	Transfecção (CaPO ₄)	HEK293 frascos CF10	congelamento/descongelamento, benzona-se, detergente, iodixanol, cromatografia	1,2	
Ceregene Inc, San Diego, CA	Transfecção (CaPO ₄)	HEK 293	Cromatografia de afinidade de heparina	2	Nao
Targeted Genetics Corporation, Seattle, WA	Infeção por wtAd5	HEK 293 e HeLa em biorreator em onda ou em tanque com agitação.	Filtragem fina, benzona-se, cromatografia de troca iónica, inativação por calor, cromatografia e nanofiltração.	1,2	
AGTC, FL at SAFC, CA	Infeção por HSV	BHK - Biorreator em onda	Lise por detergente, benzona-se, filtração fina, TFF, IEC, cromatografia de afinidade e TFF	1	Sim
UniQure/AMT	Infeção por baculovirus	Sf9 -Biorreator em onda	Proprietário	1	

Anexo 2 Métodos de produção e purificação de rAAV adotados pelos vários centros de investigação em conformidade com as Boas Práticas de Fabrico.
Adaptado de (Clément e Grieger, 2016)

Referências bibliográficas

ADAMSON-SMALL, Laura *et al.* - A scalable method for the production of high-titer and high-quality adeno-associated type 9 vectors using the HSV platform. **Molecular Therapy — Methods & Clinical Development**. . ISSN 2329-0501. 3:March (2016) 16031. doi: 10.1038/mtm.2016.31.

CLARK, K. R. - Recent advances in recombinant adeno-associated virus vector production. **Kidney Int.** . ISSN 1523-1755. 61:1 Suppl (2002) S9–15. doi: kid2 [pii]r10.1046/j.1523-1755.2002.0610s1009.x.

CLÉMENT, Nathalie; GRIEGER, Joshua C. - Manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors for clinical trials. **Molecular Therapy — Methods & Clinical Development**. . ISSN 2329-0501. 3:November 2015 (2016) 16002. doi: 10.1038/mtm.2016.2.

GAUDET, Daniel; MÉTHOT, Julie; KASTELEIN, John - Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. **Current opinion in lipidology**. . ISSN 1473-6535. 23:4n (2012) 310–20. doi: 10.1097/MOL.0b013e3283555a7e.

GRIEGER, Joshua C.; SAMULSKI, R. Jude - **Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications** [Em linha]. 1. ed. [S.l.] : Elsevier Inc., 2012 Disponível em WWW:<URL:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-386509-0.00012-0>. ISBN 0076-6879

GRIEGER, Joshua C.; SOLTYS, Stephen M.; SAMULSKI, Richard Jude - Production of Recombinant Adeno-associated Virus Vectors Using Suspension HEK293 Cells and Continuous Harvest of Vector From the Culture Media for GMP FIX and FLT1 Clinical Vector. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**. . ISSN 1525-0024. October (2015) 1–11. doi: 10.1038/mt.2015.187.

KEISER, Nicholas W. *et al.* - Unique characteristics of AAV1, 2, and 5 viral entry, intracellular trafficking, and nuclear import define transduction efficiency in HeLa cells. **Human gene therapy**. . ISSN 1557-7422. 22:11 (2011) 1433–44. doi: 10.1089/hum.2011.044.

KOICHI MIYAKE, NORIKO MIYAKE, YOSHIYUKI YAMAZAKI, Takashi Shimada And Yukihiro Hirai - Serotype-independent Method of Recombinant Adeno-associated Virus (AAV) Vector Production and Purification. **Nippon Med Sch.** . ISSN 1098-6596. 1:2012). doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

MALVERN INSTRUMENTS - Adeno-Associated Virus titer and aggregation characterization. Figure 1 (2015) 1–7.

MCCARTY, D. M. *et al.* - Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. **Gene therapy**. . ISSN 0969-7128. 10:26 (2003) 2112–2118. doi: 10.1038/sj.gt.3302134.

POTTER, Mark *et al.* - A simplified purification protocol for recombinant adeno-associated virus vectors. **Molecular therapy. Methods & clinical development**. . ISSN 2329-0501. 1:March (2014) 14034. doi: 10.1038/mtm.2014.34.

STROBEL, Benjamin *et al.* - Comparative analysis of cesium chloride- and iodixanol-based purification of recombinant adeno-associated virus (AAV) vectors for preclinical applications. **Human gene therapy methods**. . ISSN 1946-6544. 112:4 (2015) 1–29. doi: 10.1089/hgtb.2015.051.

THOMAS, D. L. *et al.* - Scalable recombinant adeno-associated virus production using recombinant herpes simplex virus type 1 coinfection of suspension-adapted mammalian cells. **Human Gene Therapy**. . ISSN 10430342 (ISSN). 20:8 (2009) 861–870. doi: 10.1089/hum.2009.004.

TOMONO, Taro *et al.* - Ultracentrifugation-free chromatography-mediated large-scale purification of recombinant adeno-associated virus serotype 1 (rAAV1). **Molecular Therapy — Methods & Clinical Development**. . ISSN 2329-0501. 3:August 2015 (2016) 15058. doi: 10.1038/mtm.2015.58.

VIROCYT - An Overview of Virus Quantification Techniques. **Axiomathes**. . ISSN 1122-1151. 2013) 7. doi: 10.1007/s10516-014-9260-9.

WANG, Feng *et al.* - A reliable and feasible qPCR strategy for titrating AAV vectors. **Medical science monitor basic research**. . ISSN 2325-4416. 19:2013) 187–93. doi: 10.12659/MSMBR.883968.

WEATHERALL, Eva; WILLMOTT, Geoff R. - Applications of Tunable Resistive Pulse Sensing. **Royal Society of Chemistry**. . ISSN 15205207. 119:16 (2015) 5328–5335. doi: 10.1021/acs.jpcc.5b00344.

WITHERS, B. E.; DUNBAR, J. C. - The endonuclease isoschizomers, SmaI and XmaI, bend DNA in opposite orientations. **Nucleic acids research**. . ISSN 0305-1048. 21:11 (1993) 2571–7.

ZELTNER, Nadja *et al.* - Near-perfect infectivity of wild-type AAV as benchmark for infectivity of recombinant AAV vectors Nadja. **Gene Ther.** 17:7 (2011) 872–879. doi: 10.1038/gt.2010.27.Near-perfect.

ZOLOTUKHIN, Sergei *et al.* - Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors. **Methods.** . ISSN 10462023. 28:2 (2002) 158–167. doi: 10.1016/S1046-2023(02)00220-7.