



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Nuno Rafael Fernandes Canoeiro

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Transposição de Escala da Produção de Vírus Adeno-Associados”, referentes à Unidade Curricular “Estágio” sob orientação do Dr. João Maia, da Dra. Ana Andrade e do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Julho de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Nuno Rafael Fernandes Canoeiro

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Transposição de Escala da Produção de Vírus Adeno-Associados”, referentes à Unidade Curricular “Estágio” sob orientação do Dr. João Maia, da Dra. Ana Andrade e do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Julho de 2020

Eu Nuno Rafael Fernandes Canoeiro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2014205464, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Transposição de Escala da Produção de Vírus Adeno-Associados” apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

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

Coimbra, 17 de julho de 2020,

Nuno Rafael Fernandes Canoeiro

(Nuno Rafael Fernandes Canoeiro)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus pais, pois sem eles nada disto seria possível, pelo esforço, pelo apoio, por tudo o que podia esperar, sem eles não teria sido possível terminar o mestrado. Mesmo quando tudo parecia perdido, estavam lá e deram-me a força necessária para continuar.

À equipa da Farmácia Machado, por todo o carinho e dedicação com que me acolheram e por todos os ensinamentos transmitidos. Ao Dr. João Maia, à Dra. Graziela Grade, à Rita Garret, à Mariana Lopes, à Raquel Gonçalves e ao Sr. Eduardo, o mais sincero obrigado por todos os momentos proporcionados ao longo do meu estágio.

À *Owlpharma* e colaboradores, pelo voto de confiança e perseverança para a realização do estágio em regime de teletrabalho. Ao Dr. César Gonçalves, ao Dr. Ricardo Andrade, à Dra. Ana Andrade e a toda a equipa dos Assuntos Regulamentares um obrigado por todos os conhecimentos transmitidos mesmo numa situação tão particular.

Ao meu orientador, o Professor Doutor Luís Pereira de Almeida, pela disponibilidade e pela sugestão de um tema tão desafiante e exigente, mas ao mesmo tempo fascinante.

A todos os amigos que me ajudaram e que marcaram o meu percurso no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas e por Coimbra, por todos os momentos, os bons e menos bons, pelas gargalhadas, pelos choros, por tudo.

Índice

Parte I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

Abreviaturas.....	6
1. Introdução.....	7
2. Farmácia Machado.....	7
3. Análise SWOT.....	8
3.1. Pontos Fortes.....	8
3.1.1. Plano de estudos.....	8
3.1.2. Empatia.....	8
3.1.3. Competências Linguísticas.....	8
3.1.4. Sentido de Iniciativa e Interesse pela aprendizagem.....	9
3.2. Pontos Fracos.....	9
3.2.1. Timidez e Nervosismo inicial.....	9
3.2.2. Falta de conhecimento de procedimentos obrigatórios.....	9
3.3. Oportunidades.....	10
3.3.1. Regime de observação inicial de atendimentos.....	10
3.3.2. Acordo com a Liga Portuguesa Contra o Cancro.....	10
3.3.3. Acompanhamento pela Glintt.....	10
3.3.4. Novo módulo de Atendimento Sinfarma®.....	10
3.3.5. Equipa Heterogénea.....	11
3.4. Ameaças.....	11
3.4.1. Medicamentos esgotados/rateados.....	11
3.4.2. Volume inexistente de Manipulados.....	11
3.4.3. Inexistência de produtos de Puericultura.....	11
3.4.4. Produtos veterinários.....	12
4. Casos Práticos.....	12
5. Considerações Finais.....	14
Bibliografia.....	15

Parte II – RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM ASSUNTOS REGULAMENTARES DO MEDICAMENTO

Abreviaturas.....	17
1. Introdução.....	18
2. Owlpharma – Consulting, Lda.....	18
3. Análise SWOT.....	19
3.1. Pontos Fortes.....	19
3.1.1. Plano de estudos.....	19
3.1.2. Responsabilidade e Autonomia.....	19
3.1.3. Competências Linguísticas.....	19
3.2. Pontos Fracos.....	20
3.2.1. Repetição de algumas tarefas.....	20

3.2.2. Não oportunidade de desenvolver tarefas noutros departamentos.....	20
3.3. Oportunidades.....	20
3.3.1. Formações iniciais.....	20
3.3.2. Atividades Desenvolvidas.....	20
3.4. Ameaças.....	21
3.4.1. COVID-19.....	21
4. Considerações Finais.....	22
Bibliografia.....	23

Parte III – MONOGRAFIA

Transposição de Escala da Produção de Vírus Adeno-Associados

Abreviaturas.....	25
Resumo.....	27
Abstract.....	29
Introdução.....	30
1. Biologia dos Vírus Adeno-Associados (AAVs).....	32
1.1. Genoma.....	32
1.2. Cápside.....	33
1.3. Serotipos e Tropismo.....	34
1.4. Ciclo de Vida/Infeção.....	35
2. Vírus Adeno-Associados recombinantes (rAAVs).....	37
2.1. Vantagens e Desvantagens.....	38
2.2. Estudos Clínicos.....	39
2.3. Medicamentos Aprovados pela EMA e FDA.....	40
3. Introdução às plataformas de produção de rAAVs.....	42
3.1. Transfeção transiente de células HEK293 em suspensão.....	43
3.2. Sistema de produção de vetores baseados em expressão mediada por Baculovírus (BEVS) ..	46
3.3. Linhas celulares produtoras de mamífero.....	49
3.4. Ideias a reter sobre a Produção.....	51
4. Introdução à Purificação de rAAVs.....	52
4.1. Cromatografia.....	57
4.1.1. Cromatografia de Exclusão Molecular.....	58
4.1.2. Ponto Isoelétrico (pI) dos AAVs e Cromatografia de Troca Iónica (IEX).....	59
4.1.3. Estrutura da cápside e Cromatografia de Afinidade (AC).....	61
4.2. Filtração Tangencial.....	62
4.3. Ideias a reter da Purificação.....	63
Conclusão.....	64
Bibliografia.....	66
ANEXOS	75

**Parte I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA
COMUNITÁRIA**

FARMÁCIA MACHADO

Abreviaturas

CHUC – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

FI – Folheto Informativo

IPO – Instituto Português de Oncologia

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MSRM – Medicamento Sujeito a Receita Médica

RCM – Resumo das Características do Medicamento

SWOT – Do inglês, *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

I. Introdução

Ao longo dos cinco anos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) foi-nos transmitida a ideia da responsabilidade social e da diferença que o farmacêutico pode exercer enquanto agente de saúde pública. Esta responsabilidade advém, em grande parte, pela proximidade do farmacêutico com os utentes, que veem o farmacêutico como o profissional de saúde que se encontra sempre disponível para esclarecer dúvidas sobre a atual terapêutica, dúvidas sobre uma terapêutica nova que será instituída e que se encontra disponível para resolver algumas afeções menores e determinados problemas de saúde quando não têm a possibilidade de ter uma consulta com o seu médico, tornado assim o farmacêutico e a farmácia um elo essencial do Sistema Nacional de Saúde.

O Estágio em Farmácia Comunitária é sem sombra de dúvidas o pináculo dos cinco anos do plano de estudos do MICF, encerrando assim o 2º ciclo de estudos do. É no Estágio que se visa a integração dos conhecimentos adquiridos nas várias unidades curriculares, tanto teóricos como práticos, proporcionando assim aos estudantes uma oportunidade única de contacto com os utentes de forma a aplicar os conhecimentos, bem como adquirir competências essenciais para o futuro enquanto Farmacêuticos, como por exemplo, a gestão e organização de um farmácia, o contacto direto com os utentes e a realização do aconselhamento terapêutico.

O meu estágio decorreu na Farmácia Machado entre o dia 16 de setembro de 2019 e o dia 02 de fevereiro de 2020, sob orientação do Dr. João Maia, diretor técnico.

O presente relatório será exposto segundo uma análise SWOT, da sigla em inglês para *Strengths* (Pontos Fortes), *Weaknesses* (Pontos Fracos), *Opportunities* (Oportunidades) e *Threats* (Ameaças), tendo por base toda a experiência vivida durante a realização do estágio na Farmácia Machado. Serão igualmente expostos alguns casos práticos que tive a oportunidade de resolver durante a realização do estágio.

2. Farmácia Machado

A Farmácia Machado situa-se na Rua Bernardo Albuquerque, no coração da Cruz de Celas, sendo um local de passagem quase obrigatória para estudantes, moradores e trabalhadores. Apresenta ainda elevada proximidade do Instituto Português de Oncologia (IPO), da Maternidade Dr. Bissaya Barreto, do Centro de Saúde de Celas, do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), da Faculdade de Economia da Universidade de Coimbra e da Escola Secundária José Falcão, tornado assim a Farmácia Machado um ponto de confluência

de utentes com diferentes faixas etárias e *backgrounds*. Esta heterogeneidade, tornou possível o contacto com utentes fidelizados que apresentam uma elevada confiança na equipa da Farmácia Machado, utentes de passagem provenientes das unidades de saúde e até jovens estudantes do programa Erasmus. Deste modo, é imprescindível conseguir adaptar o discurso às diferentes realidades, culturas e línguas, melhorando assim a comunicação e, conseqüentemente, o aconselhamento.

A Farmácia Machado possui um horário alargado, funcionando das 8h às 21 h de segunda a sexta, e ao sábado das 9h às 13h, efetuando rotativamente serviço de atendimento noturno, de forma a suprimir as necessidades dos utentes.

A equipa da Farmácia Machado, é formada por cinco farmacêuticos e um técnico auxiliar de farmácia, existindo uma heterogeneidade de idades.

3. Análise SWOT

3.1. Pontos Fortes

3.1.1. Plano de estudos

O vasto plano curricular do MICF, prepara-nos para um contexto de Farmácia Comunitária, uma vez que, das inúmeras unidades curriculares relacionadas com farmacologia e aconselhamento farmacológico que são de extrema importância para o aconselhamento farmacêutico, existem todas as outras que mesmo que muitas vezes não seja perceptível qual a utilidade numa Farmácia Comunitária, fazem toda a diferença na hora de responder a questões mais técnicas, como exposta no caso prático.

3.1.2. Empatia

Fruto da localização da Farmácia Machado, surgiram muitas situações que nem sempre eram muito fáceis de gerir, quer por medicamentos esgotados (ameaças), quer pelo estado de saúde fragilizado que alguns utentes apresentavam, especialmente os utentes provenientes do IPO e, como tal, tentava compreender as suas necessidades e problemas, de forma a que pudesse fazer o que estava ao meu alcance para a ajudar, porque algumas vezes apresentavam quadros clínicos complexos e queria demonstra-lhes que têm um profissional de saúde interessado sobre o seu estado de saúde como um todo.

3.1.3. Competências Linguísticas

O domínio do inglês revelou-se importante, visto que a Farmácia Machado se encontra localizada numa zona perto de polos da universidade e, como tal, existia uma grande afluência

de estudantes de Erasmus, facilitando tanto a compreensão dos sintomas, bem como a explicação sobre a posologia e modos de administração/aplicação.

3.1.4. Sentido de Iniciativa e Interesse pela aprendizagem

Apesar da localização central da Farmácia Machado, existiam alguns períodos com menor atividade e, como tal, aproveitei esses momentos para questionar a equipa sobre dúvidas que iam surgindo e, que não tive oportunidade de ver esclarecidas pelo facto da equipa se encontrar ocupada. Deste modo, quando no futuro aconteciam situações similares pude corresponder às necessidades dos utentes de forma mais célebre e exímia. Para além disso, aproveitava também estes momentos mais parados para executar algumas tarefas como gestão e receção de encomendas, gestão de *stocks* de medicamentos não sujeitos a receita médica e listagem dos prazos de validade.

3.2. Pontos Fracos

3.2.1. Timidez e Nervosismo inicial

O início do meu estágio foi marcado por uma timidez e nervosismo iniciais, uma vez que esta era apenas a segunda vez que estava num contexto de estágio em farmácia comunitária. Esta timidez e nervosismo encontravam-se alicerçados no medo de falhar e, por sua vez, de prejudicar a farmácia e o utente. Contudo, a equipa da Farmácia Machado foi-me transmitindo a confiança e ajuda necessárias para ultrapassar este receio.

3.2.2. Falta de conhecimento de procedimentos obrigatórios

Embora o plano formativo do MICF seja extenso e nos prepare para o desempenho de inúmeras funções numa farmácia comunitária, senti uma grande lacuna no que toca a procedimentos obrigatórios, como por exemplo, o caso dos medicamentos psicotrópicos e estupefacientes. Estes medicamentos foram abordados ao longo do curso como sendo medicamentos com uma legislação e procedimentos próprios, mas nunca nos foi explicado que é necessário a recolha de informação do utente (pessoa que levanta o medicamento, e que este pode ou não ser o mesmo que o doente), do médico prescritor, que após esta recolha são emitidos dois documentos que é necessário arquivar e posteriormente comunicar ao INFARMED I.P., de forma mensal, e que para além disso é necessário proceder à contagem física de embalagens, mensalmente, para posterior comparação com o número indicado no sistema informático, de forma a confirmar inexistência de atos ilícitos (INFARMED I.P., 2010). Outro procedimento em que senti muita dificuldade encontra-se associado ao processamento de lotes de receitas manuais e aos planos adicionais de participação.

3.3. Oportunidades

3.3.1. Regime de observação inicial de atendimentos

Na Farmácia Machado é proporcionado aos estagiários um contacto precoce com o atendimento ao público em regime observacional, o que se revelou de extrema importância no entendimento e integração da logística e organização da farmácia desde a receção dos medicamentos até à dispensa dos mesmos ao público. Deste modo, e a título exemplificativo, importa destacar o sistema de medicamentos reservados, uma vez que após a compreensão do procedimento tornou-se muito mais lógico e fácil o desempenho do trabalho no *BackOffice*.

3.3.2. Acordo com a Liga Portuguesa Contra o Cancro

A Farmácia Machado possui um acordo com a Liga Portuguesa Contra o Cancro em que permite a aquisição de medicamentos a custo zero a utentes com dificuldades económicas. A maioria da medicação destes utentes era para a dor, nomeadamente, medicamentos psicotrópicos ou estupefacientes, como por exemplo, o fentanilo, que se encontrava comercializado em várias apresentações, tomando como exemplos os sistemas transdérmicos, os comprimidos sublinguais e as soluções para pulverização nasal. Estes utentes também apresentavam terapêutica complementar, como por exemplo medicamentos antieméticos (por exemplo contendo ondansetron – antagonista dos recetores 5-HT3) e profiláticos (por exemplo nistatina – profilaxia da candidíase oral em doentes imunodeprimidos).

3.3.3. Acompanhamento pela Glintt

A Farmácia Machado possui acompanhamento por parte de um consultor da Glintt, empresa responsável pelo desenvolvimento e distribuição do *software* de atendimento e gestão, *Sinfarma 2000*[®]. Este acompanhamento tinha como base uma filosofia “*Kaizen*”, uma filosofia originária do Japão e cuja base consiste na “melhoria contínua”. As mudanças decorrentes desta filosofia foram muito notórias para mim, enquanto estagiário, porque ao fazer uma análise retrospectiva desde o início até ao final do estágio a organização e funcionamento da farmácia alterou significativamente e foi uma oportunidade única de puder fazer parte dessa mudança, e considerando como um aspeto extremamente enriquecedor e fulcral.

3.3.4. Novo módulo de Atendimento Sinfarma[®]

Igualmente proveniente do acompanhamento por parte da Glintt, a Farmácia Machado foi uma das farmácias piloto a ter acesso ao novo módulo de atendimento do Sinfarma[®], tornando-se realmente única a participação ativa no desenvolvimento deste *software* através de *feedbacks* de alguns erros encontrados e algumas sugestões.

3.3.5. Equipa Heterogénea

A equipa da Farmácia Machado à data da realização do meu estágio era heterogénea em termos de idades, o que se revelou muito proveitoso devido ao facto de poder aprender com a Dra. Graziela Grade questões mais relacionadas com o aconselhamento farmacêutico devido à sua larga experiência em farmácia comunitária e, por outro lado, de aprender com as farmacêuticas mais jovens, a Dra. Rita, a Dra. Mariana e Dra. Raquel aspetos relacionados com a organização, gestão e aconselhamento de produtos dermocosméticos.

3.4. Ameaças

3.4.1. Medicamentos esgotados/rateados

Os medicamentos esgotados e rateados foram uma constante durante a realização de todo o meu estágio, colocando-me muitas vezes em situações constrangedoras, em que tentava explicar que o medicamento não estava disponível de momento, e que não tínhamos previsões de quando iria voltar. No entanto, compreendia perfeitamente o lado do utente, visto que muitas vezes eram medicamentos crónicos e que os utentes já procuravam há algum tempo. De forma a colmatar esta falta de medicamentos procurávamos diariamente, no *Sinfarma*[®], se os medicamentos em questão já se encontravam disponíveis e, ligávamos muitas vezes diretamente aos armazenistas. Na Farmácia Machado tentávamos fazer uma gestão destes medicamentos para que não faltasse, mas também para que não tivéssemos medicamento em excesso de forma a não condicionar o acesso à medicação dos utentes de outras farmácias.

3.4.2. Volume inexistente de Manipulados

Uma área exclusiva da farmácia é a preparação de Medicamentos Manipulados. Durante a realização do meu estágio não chegou nenhuma prescrição de Medicamentos Manipulados, o que considero uma ameaça porque não tive a oportunidade de ver todo o procedimento desde a manufatura do medicamento, passando pelo cálculo do preço do medicamento e terminando no processamento da receita.

3.4.3. Inexistência de produtos de Puericultura

Embora Celas seja uma área residencial com elevado número de famílias, a maioria da população são estudantes e, como tal, não é economicamente rentável para a Farmácia Machado ter uma gama de produtos dietéticos pediátricos uma vez que estes apresentam um curto prazo de validade. Desta forma apenas tive a possibilidade de contactar com produtos de puericultura quando recebíamos prescrições do Hospital Pediátrico.

3.4.4. Produtos veterinários

A Farmácia Machado possui várias referências de produtos veterinários, porém, atendendo à reduzida procura, não pude colocar em prática os conhecimentos adquiridos ao longo do MICF.

4. Casos Práticos

Caso I

Uma senhora dirigiu-se à Farmácia Machado preocupada com um novo medicamento que o seu filho iria iniciar, uma vez que este apresenta alergia diagnosticada a frutos secos (incluindo ao amendoim). O medicamento em questão era Isotretinoína Orotrex 10 mg cápsulas moles prescrita pelo dermatologista para o tratamento da acne grave. A preocupação da mãe prendia-se com menção presente no Folheto Informativo (FI) deste medicamento (INFARMED I.P., 2019):

“Isotretinoína Orotrex contém óleo de soja refinado e óleo de soja hidrogenado. Se for alérgico ao amendoim ou soja, não utilize este medicamento.”

Inicialmente consultei o Resumo das Características do Medicamento (RCM) de forma a confirmar qual a menção sobre a alergia ao amendoim, e esta encontrava-se referida tanto na secção 4.3 – “Contraindicações”, como na secção 4.4 – “Advertências e precauções especiais de utilização” (INFARMED I.P., 2019). Verifiquei no *Sinfarma*[®] se existia algum medicamento contendo Isotretinoína, mas que não contivesse óleo de soja, pelo que pude verificar que não existia nenhuma alternativa, uma vez que todos estes medicamentos apresentam todos os medicamentos óleo de soja. No momento em que estava a fazer o atendimento os colaboradores da farmácia encontravam-se ocupados e, desde modo, de forma a dar uma informação mais concreta e aconselhar devidamente, consultei a base de dados *PubMed*, com vista à obtenção de uma resposta e averiguar se existia alguma evidência científica sobre a alergia ao amendoim e a administração de cápsulas moles de Isotretinoína, utilizando na pesquisa os termos (“*Isotretinoin*” AND “*peanut allergie*”). Assim, li rapidamente os artigos presentes na bibliografia, que apresentavam conclusões semelhantes, nomeadamente, a alergia ao amendoim não constitui uma contra-indicação definitiva à administração de Isotretinoína cápsulas moles, caso o doente não apresentasse concomitantemente alergia à soja (McCarthy, Murphy e Hourihane, 2016; Paugam *et al.*, 2018).

Posto isto, e de forma a garantir a segurança do utente e a não sobreposição da indicação do médico, aconselhei a mãe a expor a situação ao dermatologista (médico prescritor) e ao

alergologista, explicando sucintamente as informações que havia encontrado. Deste modo, salientei que a decisão sobre a administração deveria ser conjunta, entre o médico prescritor e o alergologista, e que o facto de ter encontrado a informação supracitada não tornava a administração de Isotretinoína cápsulas moles ao utente isenta de riscos.

Passadas algumas semanas a mãe volta à Farmácia Machado, e questionei-lhe se já havia contactado os médicos, expondo-lhes a situação suprarreferida. A Senhora afirmou que já havia comunicado com os médicos especialistas e que, atendendo às informações encontradas no RCM e na PubMed, ambos concordaram que a primeira administração de Isotretinoína deveria efetuar-se no hospital, de forma a garantir a segurança do doente e intervir celeremente caso alguma reação alérgica fosse desencadeada.

Após um mês a mãe volta à Farmácia Machado acompanhada do filho, uma vez que pretendiam adquirir produtos hidratantes para a secura de pele, um efeito indesejável muito frequentemente associado à administração de Isotretinoína. Como tinha feito o acompanhamento da situação com mãe, deduzi que a secura de pele se devia à administração da Isotretinoína e, como tal, questionei se a administração tinha ocorrido sem nenhum percalço e, de acordo com a informação cedida pela utente, felizmente o filho não teve nenhuma reação alérgica. Após uma breve conversa sobre qual a área do corpo mais afetada pela secura cutânea, o jovem referiu que o rosto e lábios eram as áreas mais afetadas. Assim, para a aplicação no rosto recomendei um creme hidratante para peles oleosas, mas que estão a ser sujeitas a tratamentos que causam ressequimento cutâneo, o *Effaclar H*, da *La Roche-Posay*, uma vez que para além de hidratante contém água termal que ajuda a apaziguar as irritações, e aconselhei uma aplicação de manhã e à noite após a limpeza da pele com produtos adequados. Para os lábios gretados aconselhei um bálsamo, que para além da função reparadora tem uma função barreira, permitindo que não haja irritação por agentes externos, nomeadamente o bálsamo *Cicaplast Lábios* da *La Roche-Posay*.

Caso 2

F.A., utente do sexo feminino com idade compreendida entre 30-40 anos, dirige-se à Farmácia Machado, queixando-se de prurido, sensação de ardor ocular e descrevendo uma sensação de “olhos colados”. A F.A. pretendia adquirir o Terricil[®], uma pomada antibiótica oftálmica, uma vez que referiu já ter utilizado numa situação semelhante, tendo-se dirigido a uma outra farmácia onde o Terricil[®] lhe havia sido dispensado sem receita médica e que a sintomatologia reportada tinha desaparecido ao fim de dois dias.

Pedi permissão para poder observar o olho afetado de forma a despistar uma possível infeção bacteriana. O olho apresentava uma secreção purulenta que indicava uma potencial infeção bacteriana. Como tal, disse-lhe que possivelmente teria uma infeção bacteriana, mas que necessitava de ser vista por um oftalmologista, uma vez que a minha função não passava por fazer um diagnóstico e que apenas o médico poderia diagnosticar e prescrever a terapêutica mais adequada. Por conseguinte, não cedi o Terricil® e alertei a utente para a problemática da resistência aos antibióticos, reforçando o uso racional do medicamento.

5. Considerações Finais

O estágio na Farmácia Machado teve a duração de 810 horas, nas quais tive a oportunidade de aplicar os conhecimentos tanto práticos, como teóricos adquiridos ao longo do percurso académico, proporcionando ainda a possibilidade de adquirir novas competências que revelar-se-ão preponderante na minha vida profissional.

Embora tenham existido algumas lacunas da minha parte e determinados aspetos negativos associados ao estágio, considero que o resultado final foi uma experiência única e a concretização da ideia transmitida ao longo do MICEF, que o farmacêutico é um profissional de saúde pública e que constitui um elo essencial no Sistema Nacional de Saúde, porque a função de um farmacêutico não é “apenas ceder medicação”. Deste modo, e em sentido oposto, por vezes o facto de não cedermos um medicamento a contribui tanto para a saúde do utente, a nível individual, como para a saúde pública, promovendo desta forma o uso racional dos medicamentos.

Para além das componentes informativa e de aprendizagem, o estágio em farmácia comunitária fez-me crescer enquanto pessoa, uma vez que tive de lidar com situações complexas, que requereram um desenvolvimento de inteligência emocional importante para a gestão de conflitos e de emoções.

Em suma, após a conclusão do estágio e ao fazer uma análise retrospectiva do mesmo, considero que todos os ensinamentos e vivências farão de mim, certamente, um melhor farmacêutico, um melhor profissional, e ao mesmo tempo alguém mais humano, que consiga lidar com situações futuras com uma outra perspetiva.

Bibliografia

INFARMED I.P. - **Psicotr3picos e Estupefacientes** (2010). [Consult. 25 out. 2019].
Dispon3vel em: https://www.infarmed.pt/documents/15786/1228470/22_Psicotropicos_Estupefacientes.pdf

INFARMED I.P. - **Folheto Informativo - Isotretino3na Orotrex** (2019). [Consult. 5 nov. 2019].
Dispon3vel em: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=607947&tipo_doc=fi

INFARMED I.P. - **Resumo das Caracter3sticas do Medicamento - Isotretino3na Orotrex** (2019). [Consult. 5 nov. 2019]. Dispon3vel em: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=607947&tipo_doc=rcm

MCCARTHY, S.; MURPHY, M.; HOURIHANE, J. O'B. - Peanut allergy and isotretinoin.
Clinical and Experimental Dermatology. ISSN 03076938. 41:7 (2016) 814–815. doi:
10.1111/ced.12880.

PAUGAM, C. *et al.* - Isotretinoin treatment and peanut allergy: a new case report and review
of the literature. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**.
ISSN 09269959. 32:9 (2018) e341–e343. doi: 10.1111/jdv.14916.

**Parte II – RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM ASSUNTOS
REGULAMENTARES DO MEDICAMENTO**

OWLPHARMA – CONSULTING, LDA.

Abreviaturas

AIM – Autorização de Introdução no Mercado

CCDS – *Company Core Data Sheet*

CMDh – *Coordination Group for Mutual Recognition and Decentralised Procedure*

DCP – *Decentralised Procedure*

eAF – *Electronic Application Form*

EuCSI – *European Core Safety Information*

FI – Folheto Informativo

IPN – Instituto Pedro Nunes

MedDRA – *Medical Dictionary for Regulatory Activities*

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

QRD – *Quality Review of Documents*

RCM – Resumo das Características do Medicamento

SWOT – Do inglês, *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

I. Introdução

No âmbito da unidade curricular “Estágio Curricular”, que integra o plano de estudos do 5º ano do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), surgiu a oportunidade de desenvolver estágio numa área diferente da farmácia comunitária, proporcionando assim aos estudantes um contacto diferenciado com as diferentes áreas de atuação do Farmacêutico.

Após o vasto plano curricular proporcionado pelo MICF, houve várias unidades curriculares que me despertaram um interesse acrescido, nomeadamente “Assuntos Regulamentares e do Medicamento”, unidade curricular de carácter obrigatório do 4º ano do MICF, onde nos foi outorgada uma visão mais teórica dos Assuntos Regulamentares. Com o intuito de conhecer melhor a área e de me poder desafiar, decidi escolher no 5º ano do MICF a unidade curricular de “Gestão de Processos Regulamentares”, onde pude desenvolver várias atividades práticas no âmbito do ciclo de vida do medicamento. Após estas unidades curriculares, com o desenvolvimento de competências teóricas e práticas e com o interesse pela área, optei por realizar uma experiência adicional em contexto real. Deste modo, surgiu a oportunidade de estágio na *Owlpharma – Consulting, Lda.*, e, através do *feedback* positivo da empresa, decidi que seria vantajoso ter uma ideia ainda mais abrangente do Departamento de Assuntos Regulamentares.

O estágio curricular decorreu entre o dia 2 de março de 2020 e o dia 29 de maio de 2020, sob a orientação do Dr. César Gonçalves, do Dr. Ricardo Andrade e da Dra. Ana Andrade. Importa salientar que, devido à pandemia e à decretação de estado de emergência, para segurança dos estagiários e colaboradores, o estágio decorreu em regime de teletrabalho a partir do dia 12 de março.

No presente relatório será exposta uma análise SWOT, da sigla em inglês para Pontos Fortes (*Strengths*), Pontos Fracos (*Weaknesses*), Oportunidades (*Opportunities*) e Ameaças (*Threats*), com base na minha experiência enquanto estagiário na *Owlpharma – Consulting, Lda.*

2. Owlpharma – Consulting, Lda.

A *Owlpharma – Consulting, Lda.* é uma empresa de consultoria direcionada essencialmente para as indústrias farmacêuticas. A empresa foi fundada em 2013, tendo a sua sede no Instituto Pedro Nunes (IPN), uma incubadora de empresas sediada em Coimbra. Desde a sua fundação, a *Owlpharma* tornou-se numa referência na consultoria na área farmacêutica, recebendo o prémio “Gazela 2018”, que distingue as empresas com um rápido crescimento (*Owlpharma, 2020*).

O core de atividades da *Owlpharma* prende-se com as quatro áreas essenciais, nomeadamente os Assuntos Regulamentares, a Garantia da Qualidade, a Farmacovigilância e *Medical and Scientific Affairs*. Por conseguinte, a empresa presta serviços especializados que cobrem todo o ciclo de vida do medicamento, encontrando-se articulada com as agências regulamentares tanto a nível nacional como internacional, e tendo sempre em consideração a legislação em vigor (*Owlpharma*, 2020).

Durante o estágio na *Owlpharma* tive a oportunidade de realizar tarefas no Departamento de Garantia da Qualidade e no Departamento de Assuntos Regulamentares.

3. Análise SWOT

A análise SWOT é uma ferramenta simples e prática que permite avaliar retrospectivamente a prestação de uma empresa, no entanto, a análise SWOT pode ser adaptada para fazer uma avaliação crítica de um estágio, ajudando a sistematizar os pontos fortes e fracos, bem com as oportunidades e ameaças do mesmo. Assim sendo, a análise SWOT é o método utilizado no presente relatório para sistematizar a experiência de estágio na *Owlpharma*.

3.1. Pontos Fortes

3.1.1. Plano de estudos

As unidades curriculares de Assuntos Regulamentares e Gestão de Processos Regulamentares (opcional do 5º ano) providenciaram conhecimentos teóricos e práticos, que se revelaram fundamentais para o desempenhar das funções no Departamento de Assuntos, uma vez que parte das tarefas que realizei na *Owlpharma* já tinham sido abordadas nestas unidades curriculares.

3.1.2. Responsabilidade e Autonomia

Uma vez que a maior parte do meu estágio foi realizado à distância (em teletrabalho devido à conjuntura do COVID), senti uma grande responsabilidade e exigência pelo cumprimento das tarefas que me eram atribuídas. Para além disso, tendo em consideração que não tinha ninguém para acompanhar em tempo real o trabalho desenvolvido, senti-me ainda mais instigado a dar o meu melhor de forma a corresponder ao voto de confiança que me foi concedido.

3.1.3. Competências Linguísticas

Atendendo à internacionalização das indústrias farmacêuticas e ao facto de o inglês ser considerado uma língua universal, é necessário ter alguns conhecimentos de forma a compreender, escrever e traduzir documentos. Desta forma, consegui praticar e evoluir nas minhas competências nesta língua através na tradução e compreensão de textos técnicos.

Adicionalmente, durante a execução de algumas tarefas como a pesquisa de informação sobre procedimentos, taxas e requisitos para a submissão de uma Autorização de Introdução no Mercado (AIM), tive a oportunidade de contactar com outros línguas, como o francês, o alemão e o espanhol o que se revelou verdadeiramente desafiante a nível da pesquisa e da compreensão textual, acabando por reforçar a importância do desenvolvimento de competências linguísticas.

3.2. Pontos Fracos

3.2.1. Repetição de algumas tarefas

Visto que não tinha acesso à rede da *Owlpharma* e novas tarefas requeriam explicações extensas ou o acompanhamento do trabalho desenvolvido por um colaborador, nem sempre era fácil designarem-me tarefas diferenciadas, o que culminou, por vezes, na realização de algumas tarefas rotineiras.

3.2.2. Não oportunidade de desenvolver tarefas noutras departamentos

Não surgiu a oportunidade de desenvolver trabalhos nos departamentos de Farmacovigilância e do *Medical and Scientific Affairs*, mais uma vez condicionado pela conjuntura atual, o que impossibilitou ter uma noção aprofundada do trabalho também destes departamentos.

3.3. Oportunidades

3.3.1. Formações iniciais

O início do estágio na *Owlpharma* foi marcado por um vasto plano formativo, que, para além de dar a conhecer um pouco melhor a empresa, permitiu também a revisão de diversos conceitos das diferentes unidades curriculares do MICEF, possibilitando assim uma melhor compreensão das tarefas e facilitando a comunicação. Importa ainda referir que as formações suprarreferidas se encontram inseridas no âmbito dos conhecimentos básicos de Assuntos Regulamentares, quer de medicamentos de uso humano, quer de cosméticos, preparação e redação de Resumo das Características do Medicamento (RCM), Folheto Informativo (FI) e Rotulagem segundo o *Quality Review of Documents* (QRD) e conceitos básicos de Farmacovigilância.

3.3.2. Atividades Desenvolvidas

Departamento de Assuntos Regulamentares:

- Comparação de RCMs aprovados com *European Core Safety Information* (EuCSIs) e *Company Core Data Sheet* (CCDS) (documentos internos das empresas farmacêuticas que compilam as informações de segurança de uma substância ativa), de forma a garantir que os RCMs contêm as informações de segurança mais atualizadas;

- Pesquisa em vários *sites* das Agências Regulamentares Europeias (nomeadamente Alemanha, França e Espanha) de informações sobre procedimentos, taxas e requisitos para a submissão de uma AIM através de um procedimento descentralizado (DCP);
- Harmonização de textos de medicamentos genéricos (RCM e FI) a partir dos textos do medicamento de referência;
- Tradução de RCMs do inglês para português, consultando a plataforma *Medical Dictionary for Regulatory Activities* (MedDRA);
- Preparação de *electronic Application Form* (eAF) para pedidos iniciais de AIM e para pedidos de alterações aos termos de AIM;
- Elaboração de RCM, FI e rotulagem segundo os *Templates* QRD.

Departamento de Garantia de Qualidade:

- Avaliação do risco da presença de Nitrosaminas em Medicamentos de uso Humano contendo fármacos de síntese química. Esta avaliação é consequente do pedido do *Coordination Group for Mutual Recognition and Decentralised Procedure* (CMDh) após a deteção inicial de níveis elevados de nitrosaminas em medicamentos contendo valsartan e posteriormente em outros medicamentos designados de “sartans”. A avaliação do risco da presença de nitrosaminas é uma avaliação integral de todo o medicamento sendo incluídos para além das substâncias ativas, os excipientes, o material de acondicionamento primário, os métodos de fabrico do medicamento, bem como o contexto de uso do medicamento. Assim sendo, esta é a primeira fase do procedimento proposto pelo CMDh, que é seguida pela fase de testes confirmatórios caso seja detetada uma potencial presença de nitrosaminas e subseqüentes alterações aos termos de AIM dependentes do *outcome* da avaliação e dos testes confirmatórios, presando assim pela segurança do uso dos medicamentos pelos doentes (EMA-CMDh, 2019, 2020).

3.4. Ameaças

3.4.1. COVID-19

A principal ameaça à realização do estágio nos moldes habituais foi a pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2 que causa a doença conhecida por COVID-19. Devido a esta pandemia e ao estado de emergência decretado pelo governo, foi necessário, para a segurança dos trabalhadores da *Owlpharma* e dos seus estagiários, que fosse adotado o regime de teletrabalho. Posto isto, tive apenas a possibilidade de estagiar presencialmente nas instalações da *Owlpharma* por um período de duas semanas, tendo-se prolongado o estágio em regime de

teletrabalho até ao final do período de tempo previamente definido. De forma a ter as condições necessárias para a realização do estágio foi-me fornecido um computador da *Owlpharma* com todos os programas que necessitava para a realização dos projetos que tinha em curso. Contudo, a execução de novos projetos tornou-se um desafio, uma vez que nem sempre era perceptível qual o seu objetivo final e qual a melhor metodologia para o executar, devido a algumas falhas de comunicação. Todavia, o empenho e dedicação da equipa da *Owlpharma* para esclarecimentos adicionais foram notórios, mostrando-se sempre disponíveis para esclarecer todas as dúvidas.

4. Considerações Finais

O estágio na *Owlpharma – Consulting, Lda.* teve uma duração de 3 meses, resultando numa experiência enriquecedora, e uma oportunidade de aquisição de conhecimentos práticos na área dos Assuntos Regulamentares no âmbito farmacêutico, tais como, a preparação de novos pedidos de AIM e de alterações aos termos da AIM. Este estágio também permitiu o desenvolvimento de aptidões importantes para o mundo do trabalho como gestão de tempo e organização pessoal, desenvolvimento de autonomia e sentido de responsabilidade, de seleção de metodologias de trabalho, desenvolvimento de competências linguísticas e de competências informáticas através da utilização de várias ferramentas do *Microsoft Office®*, tais como *Word* e *Excel*.

Embora a maior parte do estágio tenha sido em regime de teletrabalho, considero que foi um desafio não só para mim, enquanto estagiário, porque tive de me adaptar a uma realidade de trabalho bastante diferente das minhas expectativas, mas também para a *Owlpharma*, uma vez que houve a necessidade de se ajustarem à realidade que infelizmente vivemos e ainda dar-me todo o apoio para que tivesse a melhor experiência pedagógica possível.

Resta-me agradecer ao Dr. César Gonçalves, ao Dr. Ricardo Andrade e a todos os colaboradores da *Owlpharma*, com quem direta ou indiretamente estagiei, por toda a aprendizagem e experiências profissionais que me proporcionaram ao longo destes meses.

Bibliografia

EMA-CMDH - **Information on nitrosamines for marketing authorisation holders** (2019). [Consult. 4 mar. 2020]. Disponível em: https://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human_Medicines/CMD_h_/Advice_from_CMDh/CMDh_404_2019_Rev.0_2019_09_-_Nitrosamines_Information_on_nitrosamines_for_MAHs_.pdf

EMA-CMDH - **Questions and answers on “Information on nitrosamines for marketing authorisation holders”** (2019). [Consult. 4 mar. 2020]. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-questions-answers-information-nitrosamines-marketing-authorisation_en.pdf

EMA-CMDH - **CMDh practical guidance for Marketing Authorisation Holders of nationally authorised products (incl. MRP/DCP) in relation to the Art. 5(3) Referral on Nitrosamines** (2020). [Consult. 4 mar. 2020]. Disponível em: https://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human_Medicines/CMD_h_/Advice_from_CMDh/Nitrosamins/CMDh_412_2019_Rev.4_clean_2020_03_-_PG_to_MAHs_on_nitrosamines.pdf

OWLPHARMA - **Owlpharma - Consulting, Lda.** (2020). [Consult. 9 jun. 2020]. Disponível em: <https://www.owlpharma.pt/>

Parte III – MONOGRAFIA

**TRANSPOSIÇÃO DE ESCALA DA PRODUÇÃO DE VÍRUS
ADENO-ASSOCIADOS**

Abreviaturas

- AAP** – *Assembly Activating Protein* (Proteína Ativadora da Montagem)
- AAV** – *Adeno-Associated Virus* (Vírus Adeno-Associados)
- AC** – *Affinity Chromatography* (Cromatografia de Afinidade)
- Ad** – Adenovírus
- AEX** – *Anion Exchange Chromatography* (Cromatografia de Troca Aniônica)
- ATMPs** – *Advanced Therapy Medicinal Products* (Medicamentos de Terapia Avançada)
- BEVS** – *Baculovirus Expression Vector System* (Sistemas de produção de vetores baseados em expressão mediada por Baculovírus)
- BHK** – *Baby Hamster Kidney* (células de rim de hamster bebê)
- Cap** – Cápside
- CEX** – *Cation Exchange Chromatography* (Cromatografia de Troca Catiônica)
- CIM** – *Convective Interaction Media* (meio de interação convectiva)
- CMAs** – *Critical Material Attributes* (Características Críticas das Matérias Primas)
- CPP** – *Critical Process Parameters* (Características/Parâmetros Críticos do Processo)
- CQAs** – *Critical Quality Attributes* (Atributos Críticos de Qualidade)
- CsCl** – Cloreto de Césio
- DIAM** – *Dual Ion-exchange Adsorptive Membranes* (membrans adsortivas de troca iônica)
- DNA** – *DeoxyriboNucleic Acid* (ácido desoxirribonucleico)
- EMA** – *European Medicines Agency* (Agência Europeia do Medicamento)
- EPAR** – *European Public Assessment Report*
- FDA** – *Food and Drug Administration*
- GMP** – *Good Manufacture Practices* (Boas Práticas de Fabrico)
- GOI** – *Gene of interest* (gene de interesse flanqueado pelas sequências ITR)
- HEAC** – *Heparin Affinity Chromatography* (Cromatografia de Afinidade à Heparina)
- HEK293** – *Human Embryonic Kidney 293 cells* (células embrionárias de rim humano)
- HeLa** – *Cervical cancer cells*
- HIC** – *Hydrophobic Interaction Chromatography* (Cromatografia de Interação Hidrofóbica)
- HPV** – Vírus do Papiloma Humano
- HSPG** – Proteoglicano Sulfato de Heparina
- HSV** – Herpes Simplex vírus
- IAC** – *Immunoaffinity Chromatography* (Cromatografia de Imunoafinidade)
- IEX** – *Ion Exchange Chromatography* (Cromatografia de Troca Iônica)

IMAC – *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (Cromatografia de Afinidade a Metais Imobilizados)

ITR – *Inverted Terminal Repeat*

LPL – Lipoproteína lípase

LPLD – Deficiência da lipoproteína lípase

MOI – *Multiplicity of infection*

MWCO – *Molecular Weight Cut-Off* (Cut-off de peso molecular)

NAbs – *Neutralizing Antibodies* (anticorpos neutralizantes)

NLS – *Nuclear Localization Signal* (sinal de localização nuclear)

ORF – *Open Reading Frame* (pautas de leitura)

P – Promotor

pAAV – Plasmídeo contendo os genoma do vírus adeno-associado recombinante

PEI – Polietilenimina

pHelper – Plasmídeo contendo as funções auxiliar

pI – Ponto Isoelétrico

pI_E – Ponto Isoelétrico de cápside de AAV vazias

pI_F – Ponto Isoelétrico de cápside de rAAV

PLA2 – Phospholipase A2 (fosfolipase A2)

pSMN – Plasmídeo contendo o gene de sobrevivência do neurónio motor

QbD – *Quality by Design*

QTPP – *Quality Target Product Profile* (Perfil de Qualidade Alvo do Produto)

rAAVs – Vírus Adeno-Associados recombinantes

Rep – Replicação

rHSV – Vírus Herpes Simplex recombinante

RNA – *Ribonucleic Acid* (ácido ribonucleico)

RPE – *Retinal Pigment Epithelium*

SEC – *Size Exclusion Chromatography* (Cromatografia de Exclusão Molecular)

Sf9 – Células de *Spodoptera frugiperda*

SMA – Atrofia Muscular Espinhal

SMN – Sobrevivência do Neurónio Motor

TFF – *Tangential Flow Filtration* (Filtração Tangencial)

VP – *Viral Protein* (Proteínas Virais – cápside)

Resumo

Nos últimos anos temos assistido a progressos extraordinários no domínio da terapia génica, sobretudo nas terapias que fazem uso de Vírus Adeno-Associados como vetores, revelando-se uma abordagem vanguardista nos mais variados aspetos, assinalada pela aprovação em 2012 do *Glybera* pela EMA. De facto, este foi o primeiro medicamento de terapia génica aprovado no mundo ocidental, abrindo um novo capítulo na medicina moderna, juntamente com o *Luxturna* e o *Zolgensma*, recentemente aprovados, que ao atuarem na base molecular das patologias resultam numa melhoria significativa dos sintomas e, por conseguinte, da qualidade de vida dos doentes. Este progresso só foi possível através de ensaios clínicos, que confirmaram as inúmeras aplicações dos vetores AAVs na terapia génica de doenças genéticas hereditárias e doenças genéticas adquiridas.

No entanto, a acompanhar o aumento das aplicações clínicas, emergiu a necessidade de produzir mais e melhor. Por um lado, a apoiar a necessidade de produzir em maior quantidade encontra-se a crescente procura por parte dos doentes e, por outro lado, a apoiar a necessidade de produzir com melhor qualidade encontram-se as crescentes exigências regulamentares. Desta forma, surgiu a necessidade da transposição de escala da produção de AAVs, de modo a que esta tecnologia continue na vanguarda da terapêutica.

Contudo, existem três aspetos que influenciam a transponibilidade de escala da produção de AAVs. O primeiro aspeto aprende-se com a biologia dos AAVs, uma vez que o conhecimento das características básicas do genoma, dos serotipos, bem como do ciclo de infeção desempenham um papel fundamental na introdução das transformações necessárias para adaptar os AAVs à sua utilização como vetores para terapia génica (AAVs recombinantes – rAAVs), assim como para otimizar as fases de produção e de purificação.

O segundo aspeto diz respeito às estratégias atualmente disponíveis para a replicação dos rAAVs. Estas estratégias assentam na utilização de células de mamífero ou inseto às quais são fornecidas os elementos genéticos necessários. Todavia, não é possível determinar a técnica de “eleição”, visto que todas apresentam algumas vantagens e desvantagens, porém, nos últimos anos as estratégias de produção têm sofrido diversas modificações de forma a permitir a obtenção de títulos mais elevados.

Por fim, o terceiro aspeto a considerar na transposição de escala é a purificação, etapa onde se procede à separação dos rAAVs das restantes impurezas e subsequente concentração, revelando-se de extrema importância na produção de rAAVs para a utilização clínica. Assim

para a transposição de escala da produção de AAVs é necessário termos uma visão holística de todas as etapas, desde a conceção original do vetor, até ao produto final, garantido os pilares de qualidade, de segurança e de eficácia.

Palavras-chave: AAVs; Produção; Purificação; Transposição de Escala; Terapia Génica.

Abstract

In recent years we have seen exceptional progresses in gene therapy, and more prominently in vector-based therapy with Adeno-Associated Virus (AAVs), revealing an avant-garde approach in a wide variability of aspects, particularly marked by the approval of Glybera in 2012 by EMA. This was the first medicine-based gene therapy approved in the western world, opening a new chapter in modern medicine, together with newly approved Luxturna and Zolgensma, which allows a significant improvement in symptoms and, consequently, in the quality of life. This progress is only possible through clinical trials, which reaffirm the numerous applications of AAV vectors in gene therapy of hereditary genetic diseases and acquired genetic diseases.

However, to accompany the increase in clinical applications, the need to produce more and better emerged. On the one hand, supporting the need to produce in greater quantities is the growing demand from patients and, on the other hand, supporting the need to produce with better quality are the growing regulatory requirements. Thus, the need for the transposition of scale of the production of AAVs arose, so that this technology remains at the forefront of novel therapies.

However, three aspects influence the scalability of AAVs production. The first aspect is related to the AAV's biology, since the understanding of the basic characteristics of the genome, serotypes, as well as the infection cycle, play a key role in granting the transformations necessary to adapt AAVs to its use as vectors gene therapy (recombinant AAVs – rAAVs), as well as in the production and purification phases.

The second aspect concerns the strategies currently available for rAAV's replication. These strategies are based on the use of mammalian or insect cells to which the necessary genetic elements are provided. However, it is not possible to determine the technique of "election", since all have some advantages and disadvantages, nevertheless, in recent years production strategies have undergone several modifications to allow the achievement of higher titers.

Finally, the third aspect to be considered in the scale transposition is purification, a stage where the rAAVs are separated from the remaining impurities and subsequently concentrated, proving to be extremely important in the rAAV's production for the clinical uses. Thus, to scale-up the production of AAVs, it is necessary to have a holistic view of all stages, from the original vector design to the final product, guaranteeing the pillars of quality, safety, and efficacy.

Keywords: AAVs; Production; Purification; Scale Transposition; Gene Therapy

Introdução

De acordo com a definição da Agência Europeia do Medicamento, a Terapia Génica enquadra-se, conceptualmente, no grupo dos Medicamentos de Terapia Avançada (ATMPs), sendo um medicamento biológico que possui as seguintes características: a) contém uma substância ativa que inclui ou constitui um ácido nucleico recombinante usado ou administrado no ser humano tendo em vista a regulação, a reparação, a substituição, a adição ou a supressão de uma sequência genética; b) os seus efeitos terapêuticos, profiláticos ou de diagnósticos estão diretamente relacionados com a sequência do ácido nucleico recombinante que contém, ou com o produto da expressão genética desta sequência. Para além disso, salienta-se que nos medicamentos de terapia génica não se incluem as vacinas contra doenças infecciosas (*Directiva 2009/120/CE da Comissão - Medicamentos De Terapia Avançada, 2009*).

Atentando no suprarreferido, o principal objetivo da terapia génica é melhorar ou curar os sintomas de doenças genéticas, através da expressão prolongada e a um nível suficiente, do gene terapêutico ou “transgene”. Importa realçar que a expressão deve ser a mais próxima possível dos valores fisiológicos, de modo a minimizar os potenciais efeitos adversos e promover os melhores efeitos terapêuticos (Collins e Thrasher, 2015; High e Roncarolo, 2019; Kay, Liu e Hoogerbrugge, 1997). Este objetivo é apenas alcançável caso existam veículos de entrega do material genético às células, isto é, vetores, tomando como exemplos plasmídeos, nanoestruturas ou vírus (Gonçalves e Paiva, 2017). Um requisito essencial da terapia génica é a capacidade de vetorizar, isto é, a capacidade de entregar o gene terapêutico de uma forma seletiva às células alvo sem que o gene seja cedido a células para as quais não seja necessária a correção providenciada pelo transgene (Grieger e Samulski, 2012). Os vetores virais são os mais estudados no campo da terapia génica, uma vez que estes exibem a capacidade natural de invadirem as células seletivamente, bem como a capacidade de inserirem o seu material genético nas células, passando estas a expressar o genoma viral. Destaca-se ainda que, na terapia génica o genoma inserido e expresso designado de transgene, pode ser expresso por longos períodos de tempo (Gonçalves e Paiva, 2017; Warnock, Daigre e Al-Rubeai, 2011). Entre os vírus mais ativamente estudados, destacam-se os Vírus Adeno-Associados, que devido às inúmeras vantagens tornaram possível que o *Glybera* fizesse o longo caminho desde o laboratório até aos ensaios clínicos e por fim até à prática clínica, conseguindo alcançar assim o título de primeiro medicamento de terapia génica aprovado. Este medicamento foi sucedido pelo *Luxturna* e mais recentemente pelo *Zolgensma*, abrindo assim um novo capítulo na terapêutica da medicina moderna, alterando o paradigma de doenças crónicas raras (Li e Samulski, 2020).

Contudo, existe uma questão emergente no que diz respeito a este campo de investigação e desenvolvimento – os atuais métodos para a Produção de vetores virais Adeno-Associados não estão a conseguir atender às quantidades crescentes exigidas tanto pelos ensaios clínicos, como pelo consumo dos medicamentos aprovados. Por um lado, as atuais estratégias para a produção de vetores são dispendiosas e laboriosas e, por outro lado, não produzem títulos suficientemente elevados para a produção de medicamentos, revelando-se como a maior ameaça para a manutenção dos medicamentos atualmente disponíveis, bem como para a implementação desta tecnologia em doenças mais prevalentes. Consequentemente, torna-se imprescindível proceder ao melhoramento das técnicas presentemente disponíveis, otimizando-as tanto a nível de recursos, como a nível dos processos, passos essenciais para a transponibilidade de escala da produção de vírus Adeno-Associados, de forma a tornar esta tecnologia amplamente disponível.

I. Biologia dos Vírus Adeno-Associados (AAVs)

Os Vírus Adeno-Associados (AAVs) são vírus pertencentes ao género *Dependovirus* e à família *Parvovirus*, inicialmente identificados em 1965 como contaminantes de preparações de Adenovírus (Ad) (Atchison, Casto e Hammon, 1965; Naso *et al.*, 2017). Estes vírus não possuem a capacidade de se replicarem naturalmente e, como tal, nos vírus selvagens encontram-se dependentes de uma coinfeção por um outro vírus (vírus auxiliar), tais como os Ad, vírus Herpes Simplex (HSV), vírus vaccinia ou o vírus do Papiloma Humano (HPV), de forma a assegurarem a replicação e garantirem, deste modo, uma infeção produtiva (Chen, Keiser e Davidson, 2018; Grieger e Samulski, 2012; Naso *et al.*, 2017; Warnock, Daigre e Al-Rubeai, 2011). Embora a infeção por AAVs seja comum na população humana, a infeção nunca foi associada a patogenicidade. Esta particularidade aliada ao facto dos AAVs serem pouco imunogénicos faz destes bons candidatos para terapia génica (Pillay *et al.*, 2017).

Os AAVs são vírus sem envelope (nus), com cápside icosaédrica proteica, e com aproximadamente 22-26 nm de diâmetro (Wang, Tai e Gao, 2019; Warnock, Daigre e Al-Rubeai, 2011).

I.1. Genoma

Os AAVs têm um genoma constituído por DNA linear de cadeia simples com aproximadamente 4,8 kb, com duas pautas de leitura (ORFs) flanqueadas em ambas as extremidades por sequências terminais repetidas e invertidas (*Inverted Terminal Repeats*, ITRs) com 145-bp. Estas sequências desempenham um papel fundamental na replicação do genoma viral e na correta formação dos viriões (Chen, Keiser e Davidson, 2018; Naso *et al.*, 2017; Wang, Tai e Gao, 2019). As ORFs contêm os três genes necessários para a replicação e montagem dos vírus, o *rep* (replicação), o *cap* (cápside) e o *aap* (montagem) (Naso *et al.*, 2017; Warnock, Daigre e Al-Rubeai, 2011).

A extremidade 5' contém as sequências de nucleótidos que codificam as quatro proteínas não estruturais (Chen, Keiser e Davidson, 2018) mas essenciais para a replicação do genoma viral e para a montagem do virião, nomeadamente, a Rep78, Rep68, Rep52 e a Rep40, cuja designação tem por base o peso molecular das proteínas (Naso *et al.*, 2017). Existem dois promotores internos (P) na ORF 5', o P5 facilita a transcrição da Rep78 e Rep68 e o P19 facilita a transcrição da Rep52 e Rep40. Estes promotores são ativados após a coinfeção com um vírus auxiliar. A Rep78 e a Rep68 são multifuncionais e desempenham um papel em quase todos os estadios do ciclo de vida dos AAVs, sendo responsáveis pela transcrição e replicação

do DNA viral bem como a integração no local específico do cromossoma 19 humano (Grieger e Samulski, 2012; Samulski *et al.*, 1991).

A proteína Rep78 também demonstrou ligar-se à cromatina da célula hospedeira. A Rep68 é uma endonuclease e, como tal, reconhece sequências específicas de DNA, podendo também desenrolar o DNA de cadeia dupla. As proteínas Rep52 e Rep40 são helicases de DNA com polaridade 3'→5', sendo essenciais para a reunião e inserção do genoma viral no interior da cápside preformada no núcleo da célula hospedeira (Grieger e Samulski, 2012). Estas proteínas Rep também desempenham um papel importante na regulação génica, reprimindo a transcrição a partir do promotor P5 na ausência de uma infeção por um vírus auxiliar (Balakrishnan e Jayandharan, 2014).

A extremidade 3' (gene *cap*) codifica as proteínas da cápside VP1, VP2 e VP3. A transcrição inicia-se no promotor P40 do gene *cap*, gerando as três proteínas. Dois dos transcritos sofrem processamento ou *splicing* alternativo formando as VP2 e VP3, ao passo que o transcrito que não sofre *splicing* gera a proteína VP1. Como resultado, a VP1 e a VP2 possuem os mesmos aminoácidos que a parte C-terminal da VP3 (Balakrishnan e Jayandharan, 2014; Li e Samulski, 2020).

O gene *aap* codifica a proteína ativadora da montagem (AAP) numa pauta de leitura alternativa que se sobrepõe ao do gene *cap* (Li e Samulski, 2020; Naso *et al.*, 2017). A proteína AAP facilita a importação nuclear das proteínas da cápside e promove a sua montagem e maturação (Chen, Keiser e Davidson, 2018; Wang, Tai e Gao, 2019). No entanto, há evidências que a AAP não é essencial para a montagem dos AAV4, AAV5 e AAV11 (Chen, Keiser e Davidson, 2018; Earley *et al.*, 2017; Naso *et al.*, 2017).

1.2. Cápside

A cápside tem como principal função a proteção do genoma viral e as suas proteínas estão diretamente envolvidas na ligação aos recetores da célula hospedeira, na internalização da partícula viral e no seu tráfego dentro da célula (Balakrishnan e Jayandharan, 2014; Naso *et al.*, 2017). A cápside dos AAVs é constituída por 60 subunidades das proteínas VP1, VP2 e VP3, que se encontram na maioria das vezes num rácio de aproximadamente 1:1:10 (Naso *et al.*, 2017; Wang, Tai e Gao, 2019). Foi demonstrado que é possível que os viriões apresentem diferentes rácios das subunidades da cápside, podendo estes apresentar apenas VP3, apenas VP3-VP1 ou apenas VP3-VP2. A variação da proporção destas subunidades tem impacto na infecciosidade dos vírus, especialmente naqueles que apresentam uma baixa densidade da proteína VP1 (Grieger e Samulski, 2012). A região N-terminal da proteína VP1 tem uma

fosfolipase A2 (PLA2) que é responsável pelo sinal de localização nuclear (NLS). A disrupção seletiva da PLA2 pela troca dos aminoácidos histidina e aspartato por alanina e asparagina, diminui a eficácia da infecção viral. Esta diminuição é atribuída à redução da capacidade do virião de escapar dos endossomas, sugerindo assim que a PLA2 desempenha um papel importante na infecção (Balakrishnan e Jayandharan, 2014). Cada subunidade tem nove regiões variáveis na superfície do virião que determinam o tropismo e o tráfego intracelular do AAV, sendo estes os domínios tipicamente reconhecidos pelos anticorpos neutralizantes (NAbs). Modificar geneticamente estas regiões variáveis pode alterar a eficácia da transdução dos AAVs e a capacidade dos NAbs para se ligarem à superfície dos viriões (Li e Samulski, 2020). Cada serotipo dos AAVs tem uma cápside característica (diferentes rácios das proteínas da cápside bem como da sua simetria), apresentando assim afinidade dissemelhante para os diferentes recetores das células hospedeiras (tropismo tecidual). (Balakrishnan e Jayandharan, 2014; Warnock, Daigre e Al-Rubeai, 2011).

1.3. Serotipos e Tropismo

Como referido na secção anterior, as cápsides dos AAVs podem apresentar diferentes rácios e conformações das proteínas, sendo estas diferenças responsáveis pela preferência da transdução e pelos diferentes tropismos (Balakrishnan e Jayandharan, 2014; Grieger e Samulski, 2012; Li e Samulski, 2020; Naso *et al.*, 2017; Wang, Tai e Gao, 2019; Warnock, Daigre e Al-Rubeai, 2011).

Inicialmente distinguidos serologicamente, foram identificadas centenas de estirpes de AAVs em inúmeras espécies de hospedeiros (Naso *et al.*, 2017). Até agora, foram classificados 12 serotipos de AAV diferentes, e foram classificados 108 novos isolados (variantes séricas) com base na análise filogenética. Os serotipos 1, 3, 4, 6, 7 10 e 11 foram isolados inicialmente de primatas não humanos enquanto os serotipos 2, 5, 6 e 9 foram isolados a partir de amostras humanas (Balakrishnan e Jayandharan, 2014; Chen, Keiser e Davidson, 2018).

Estes serotipos apresentam diferentes tropismos para os tecidos tendo em conta as interações que desenvolvem com os diferentes recetores (primários) e corretores (secundários) celulares. Estes podem ser açúcares, tais como ácido siálico, galactose, sulfato de heparina, ou recetores proteicos (recetor AAV; AAVR) (Chen, Keiser e Davidson, 2018; Naso *et al.*, 2017). Observou-se por microscopia eletrónica de criofractura (cryo-EM) e por cristalografia que a VP3 era a proteína mais abundante, observou-se também que cada VP podia ter conformações diferentes formando regiões variáveis. Atualmente, acredita-se que as VPs sejam responsáveis pelo tropismo celular e pela eficácia da transdução (Balakrishnan e Jayandharan, 2014). O tropismo celular manifestado pelos diferentes serotipos dos AAVs é uma característica

essencial para a vetorização da terapia gênica. Presente no **ANEXO I** encontram-se sumariados os diferentes serotipos, qual a espécie de onde foi isolado, os recetores e corretores que medeiam o tropismo, bem como, aplicações clínicas.

I.4. Ciclo de Vida/Infeção

O Ciclo de Vida/Infeção dos AAVs é um processo dinâmico que se inicia com a ligação das proteínas da cápside aos recetores primários da célula hospedeira. Os diferentes serotipos de AAVs têm diferentes recetores celulares (**Figura 1**). (Balakrishnan e Jayandharan, 2014). Após a ligação aos recetores celulares, os AAVs sofrem internalização por endocitose dependente ou independente de clatrina. A endocitose é procedida por uma acidificação do endossoma que induz alterações conformacionais nas proteínas da cápside. Deste modo, após acidificação, o domínio N-terminal da fosfolipase A2 (PLA2) e o sinal de localização nuclear (NLS) da VPI ficam expostos o que facilita a libertação do AAV do endossoma e a entrada para o núcleo da célula (Chen, Keiser e Davidson, 2018; Grieger e Samulski, 2012; Warnock, Daigre e Al-Rubeai, 2011). Embora o mecanismo de translocação do AAV através da membrana nuclear ainda não esteja bem estabelecido (Warnock, Daigre e Al-Rubeai, 2011), há evidências que os AAVs deficientes na VPI não são infecciosos (Grieger e Samulski, 2012). Após libertação do genoma no núcleo da célula hospedeira, a cadeia simples de DNA é convertida em DNA de cadeia dupla, e esta serve de intermediário na replicação, sendo este um passo limitante da infeção (Balakrishnan e Jayandharan, 2014; Grieger e Samulski, 2012). Uma vez no núcleo, e na ausência de um vírus auxiliar o DNA do AAV permanece sob a forma de um epissoma circular, embora em casos muito raros o DNA do AAV possa também ser integrado preferencialmente no local SI do cromossoma 19, AAVSI [(Chr) 19 (q13.4)], esta integração é mediada pelas proteínas Rep (Chen, Keiser e Davidson, 2018; Grieger e Samulski, 2012; Samulski *et al.*, 1991). Na presença de um vírus auxiliares ou de stress celular, a transcrição e a replicação do DNA do AAV são reativadas (os vírus auxiliares ou promovem a produção das proteínas do AAV necessárias para sua a replicação ou providenciam as proteínas de replicação diretamente) (Chen, Keiser e Davidson, 2018), sendo este passo importante para que o AAV selvagem complete o seu ciclo de replicação. Os AAVs recentemente formados são então libertados por lise celular induzida pelos vírus auxiliares. O mecanismo de migração das cadeias de DNA assegura a produção de genomas de cadeia simples para a incorporação viral e a expressão dos genes virais através do intermediário de cadeia dupla. Durante a inserção do genoma viral na cápside, ambas as cadeias *sense* e *anti-sense* são inseridas com uma frequência e eficácia semelhante (Balakrishnan e Jayandharan, 2014; Grieger e Samulski, 2012; Warnock, Daigre e Al-Rubeai, 2011). Os AAVs podem infetar células com ou sem capacidade

de divisão, contudo, o genoma episossomal não é integrado no cromossoma da célula hospedeira sendo por isso mais rapidamente perdido durante a divisão celular (Chen, Keiser e Davidson, 2018).

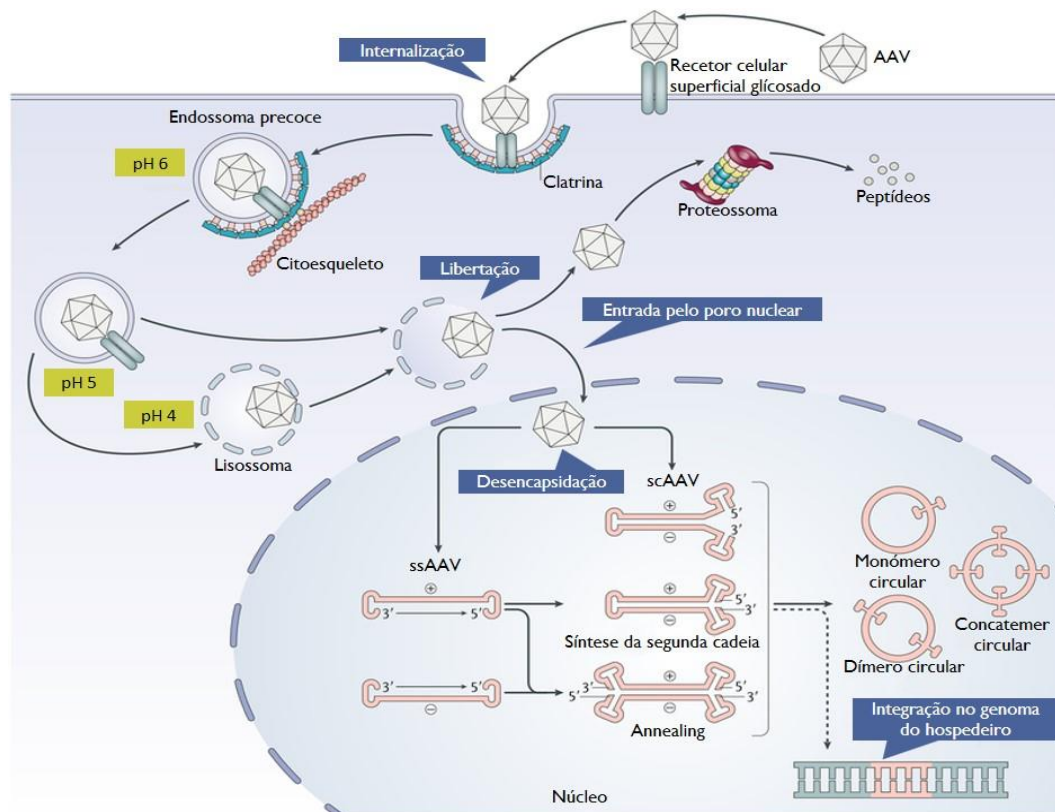


Figura 1 – Diagrama da via de transdução do rAAV – Os vírus adeno-associados (AAV) são reconhecidos por recetores celulares glicosilados da superfície da célula hospedeira. Esta interação desencadeia a internalização do vírus por endocitose mediada por clatrina. O AAV percorre então o citoplasma pela rede de citoesqueleto. Devido ao baixo pH do ambiente endossomal, as regiões da VP1/VP2 sofrem alterações conformacionais. Após a libertação do AAV do endossoma, este é transportado para o núcleo e sofre desencapsidação. O AAV pode também sofrer proteólise pelo proteossoma. Atualmente, existem duas classes de AAVs recombinantes (rAAVs) em utilização; AAVs de cadeia simples (ssAAV) e AAV autocomplementares (scAAVs). Nos ssAAVs o genoma pode ser inseridos em cadeias sense (cadeia positiva) ou em cadeias anti-sense (cadeias negativas). Estas formas de cadeia simples são transcricionalmente inertes quando chegam ao núcleo e devem ser convertidas em DNA de cadeia dupla, como um pré-requisito para a transcrição. Esta conversão pode ser realizada pela síntese da segunda cadeia a partir das polimerases de DNA da célula hospedeira ou por emparelhamento de uma cadeia positiva e negativa que têm de coexistir no núcleo. Uma vez que os scAAVs são concebidos de forma a já terem cadeia dupla quando são formados, estas podem sofrer transcrição imediatamente. As sequências ITRs presentes no genoma do rAAV podem conduzir a recombinações inter ou intra-moleculares formando um genoma circular episossomal que pode persistir no núcleo da célula. O genoma do vetor poder também sofrer integração no genoma da célula hospedeira, mas em muito baixas frequências, representado pela linha a tracejado (Adaptado de Wang, Tai e Gao, 2019).

2. Vírus Adeno-Associados recombinantes (rAAVs)

Os vírus Adeno-Associados recombinantes (rAAVs) são em termos práticos uma nanopartícula formada pelas proteínas da cápside dos AAVs, que encapsulam uma sequência genética desprovida de todos os genes codificantes de proteínas virais, sendo substituídos pelo transgene de interesse acoplado a genes reguladores (*cassette* de expressão). As únicas sequências genéticas originais dos AAVs que se mantêm são as sequências ITRs. Estas sequências vão flanquear o transgene, revelando-se essenciais para a replicação e montagem dos rAAVs durante a fase de produção e induzem a expressão do transgene *in vivo*, assegurando a transdução persistente da célula (Chen, Keiser e Davidson, 2018; Grieger e Samulski, 2012; Li e Samulski, 2020; Naso *et al.*, 2017; Wang, Tai e Gao, 2019). Estas sequências formam concatêmeros (sequências repetitivas) que persistem como epissomas no núcleo da célula transduzida. Como o DNA não é integrado no cromossoma, uma vez que esta integração do genoma viral na célula hospedeira é mediada pelas proteínas Rep (Grieger e Samulski, 2012), o transgene será eventualmente diluído ao longo do tempo à medida que a célula se divide, o que acaba por levar à sua perda e, conseqüentemente, à perda da sua expressão. A taxa de perda do transgene é dependente da taxa de replicação celular (Naso *et al.*, 2017). A remoção dos genes codificantes das proteínas virais dos AAVs (aproximadamente 96% do genoma do AAV) maximiza a capacidade dos rAAVs para acomodarem o transgene e contribui também para a sua baixa imunogenicidade e citotoxicidade em administrações *in vivo* (Li e Samulski, 2020; Wang, Tai e Gao, 2019). Assim, os rAAVs podem ser produzidos através da substituição dos genes *rep* e *cap* pelo promotor e pelo gene terapêutico de interesse. Os genes *rep* e *cap* podem então ser expressos na forma *trans* num plasmídeo diferente que não tenha o gene terapêutico flanqueado pelas ITRs. Esta separação dos genes (*rep* e *cap*) do plasmídeo que contém os ITRs é crítica para impedir a formação de AAVs do tipo selvagem (Grieger e Samulski, 2012).

Os rAAVs não conseguem acomodar sequências genéticas com mais de 5,0 kb e, como tal, no *design* da sequência de DNA a ser inserido no vetor final, deve ter-se em atenção o tamanho dos dois ITRs em ambas as extremidades, o tamanho do transgene, bem como o tamanho de elementos reguladores necessários para a expressão génica (por exemplo, promotores e sinais de poliadenilação) (Wang, Tai e Gao, 2019). Tentativas de inserção de genomas recombinantes com mais de 5 kb podem resultar numa redução do título de rAAVs final ou numa possível recombinação do transgene, levando a truncagem do genoma, no entanto, surgiram estratégias para contornar o limite de 5 kb (Naso *et al.*, 2017; Wu, Yang e Colosi, 2010), por exemplo através da divisão da *cassette* de expressão em dois (até 9 kb) (Duan, Yue e Engelhardt, 2001;

Trapani *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2000) ou três (até 14 kb) (Maddalena *et al.*, 2018) vetores distintos; uma *cassette* funcional é então reconstituída a partir dos genomas dos rAAVs após recombinação no núcleo da célula hospedeira (Chen, Keiser e Davidson, 2018; Warnock, Daigre e Al-Rubeai, 2011). Mais recentemente, e de forma a melhorar a estratégia da divisão e recuperação da *cassette* de expressão, apostou-se na utilização de inteínas divididas na extremidade das proteínas (*split-inteins*). As inteínas são expressas como dois polipeptídeos na parte terminal de duas proteínas (N- e C-exteínas), catalisando o seu *trans-splicing* ou processamento resultando na promoção da associação das duas proteínas numa única proteína maior (Tornabene *et al.*, 2019; Truong *et al.*, 2015).

Deve ter-se em consideração qual o tecido alvo e células alvo de forma a escolher qual a melhor via de administração e melhor serotipo dos AAVs devido às diferenças nas interações com os recetores celulares e subsequente internalização (Balakrishnan e Jayandharan, 2014; Chen, Keiser e Davidson, 2018; Wang, Tai e Gao, 2019). Poderá ser vantajoso o desenvolvimento de um serotipo híbrido, onde ocorre o cruzamento dos genes *cap* de diferentes serotipos, tornando-se possível obter novas propriedades e novas interações, melhorando a capacidade de vetorização (Goswami *et al.*, 2019). Por outro lado, também é possível fazer a uma combinação entre as sequências ITRs de um AAV com a cápside de um outro serotipo, a esta técnica chama-se *pseudo-tipagem*, e permite otimizar tanto o tropismo tecidular, proporcionado pela cápside do AAV, como a eficácia da transdução do rAAV, providenciada pelas sequências ITRs (Burger *et al.*, 2004; Chen, Keiser e Davidson, 2018; Thomas *et al.*, 2004).

2.1. Vantagens e Desvantagens

Na maioria dos casos, os AAVs não exibem patogenicidade nem citotoxicidade nas doses necessárias para uma transdução efetiva. Quando administrados *in vivo*, a cápside dos AAVs é menos imunogénica que a dos Adenovírus. Uma vantagem dos AAVs é que o seu genoma episomal consegue persistir por vários anos em células sem capacidade de divisão, tais como os neurónios, sendo assim possível manter a expressão génica do transgene por longos períodos. Uma vez que os rAAVs não apresentam as proteínas Rep, não há integração do genoma recombinante no genoma da célula hospedeira, diminuindo assim o risco de inserções mutagénicas.

Por outro lado, os vetores AAVs possuem um amplo tropismo quer para vários hospedeiros, quer para vários tipos de células pós-mitóticas. Para além disso, os vetores conseguem transduzir tanto células em divisão assim como células sem capacidade de divisão. Uma limitação desta estratégia de vetorização é o tamanho reduzido do gene que os AAVs

conseguem comportar (<5 kb) que constitui um fator limitante quando se pretende vetorizar genes grandes e com sequências reguladoras mais complexas. No entanto, esta desvantagem pode ser superada através da divisão da *cassette* de expressão por dois ou três vetores distintos; uma *cassette* funcional é então reconstituída após recombinação no núcleo da célula hospedeira, ou com a utilização de inteínas que permitem o *trans-splicing* ou reconstituição da proteína de interesse (Duan, Yue e Engelhardt, 2001; Maddalena *et al.*, 2018; Tornabene *et al.*, 2019; Trapani *et al.*, 2014; Truong *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2000).

Uma outra desvantagem prende-se com o facto de a expressão génica poder ter um início lento. Este atraso deve-se ao transgene inserido no vetor AAV ser de cadeia simples, o que obriga a que após a transdução para a célula hospedeira necessite de ser convertido em DNA de cadeia dupla, constituindo então um passo limitante. A utilização dum transgene com a sequência complementar (cadeia dupla) torna o início da expressão genética mais rápida, uma vez que neste caso a tradução é independente da síntese do DNA de cadeia dupla. A única ressalva desta estratégia é que a capacidade do vetor diminui para aproximadamente 3,3 kb (Naso *et al.*, 2017; Warnock, Daigre e Al-Rubeai, 2011).

2.2. Estudos Clínicos

Após o sucesso nos ensaios pré-clínicos e de forma a dar o salto para a prática clínica, é necessário submeter as terapias inovadoras a ensaios clínicos. Os ensaios clínicos são ferramentas indispensáveis para desenvolvimento de um novo medicamento, fazendo a ponte entre a investigação científica e a aprovação do medicamento, permitindo assim avaliar tanto a segurança como a eficácia de uma intervenção, possibilitando deste modo a obtenção de evidência clínica com elevada robustez.

Existem atualmente 213 estudos clínicos com Vírus Adeno-Associados, desses 28 são Estudos Observacionais (sem intervenção direta) e 185 são Ensaios Clínicos (estudos intervencionais). (NIH - U.S. National Library of Medicine, 2020). Como é possível observar no **Gráfico 1**, a partir do ano de 2017 houve um aumento significativo no número total de estudos clínicos com AAVs. Este aumento pode ser em parte explicado pelo sucesso da aprovação do *Glybera*, bem como pelo sucesso nos resultados dos ensaios clínicos. Embora os ensaios clínicos de fase 1 e fase 2 se mantenham mais ou menos estáveis nos últimos anos, assistimos a uma diminuição dos ensaios clínicos de fase 3. Esta diminuição pode estar associada às dificuldades inerentes ao desenvolvimento dos processos de produção de vetores AAVs em larga escala e à aprovação dos ensaios clínicos por parte das Autoridades Regulamentares.

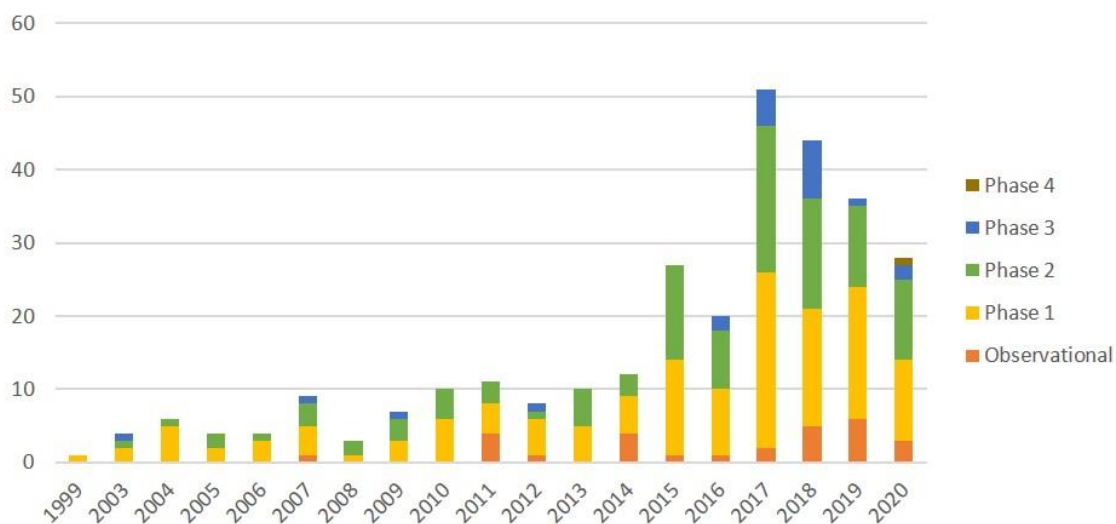


Gráfico 1 - Número de estudos clínicos ao longo dos anos (Fonte: NIH - U.S. National Library of Medicine, 2020).

No entanto, dos medicamentos experimentais que fizeram o caminho até aos ensaios clínicos, houve três que conseguiram dar o salto até à aprovação de comercialização e utilização clínica, sendo muito provável que nos próximos anos estes sejam acompanhados por outros medicamentos, os medicamentos experimentais que se encontram neste momento em ensaios clínicos de fase 3. Destes medicamentos destacam-se os aplicados a doenças genéticas da retina, que incluem doenças como a Retinite Pigmentosa, a Acromatopsia, a Neuropatia Ótica Hereditária de Leber e a Coroidermia, em que os rAAVs codificam os genes responsáveis pela produção de proteínas que se encontram alteradas nestas doenças (Prado, Acosta-Acero e Maldonado, 2020). Para além destes, salientam-se também os medicamentos aplicados à Hemofilia A e à Hemofilia B, havendo um elevado número de terapias candidatas codificando os fatores de coagulação (Ohmori, 2020). Por último acresce ainda destacar os medicamentos aplicados à Mucopolissacaridose, que transportam uma cópia do gene *SGSH* (Marcó, Haurigot e Bosch, 2019).

2.3. Medicamentos Aprovados pela EMA e FDA

Atualmente existem dois medicamentos aprovados pela Agência Europeia do Medicamento (EMA) e pela *Food and Drug Administration* (FDA) utilizando AAVs como vetores de terapia génica.

O primeiro medicamento de terapia génica aprovado pela EMA em 2012 foi o *Glybera* indicado para tratar indivíduos adultos com deficiência familiar da lipoproteína lipase (LPLD). Este medicamento continha um vetor AAV do serotipo I que codificava uma variante da lipoproteína lípase LPL^{S447X} do gene da LPL humana. Destinava-se a infectar o músculo, passando

os miócitos a produzir a proteína codificada pelo transgene da LPL. Atualmente a AIM deste medicamento encontra-se caducada desde 2017 devido aos elevados custos de produção e à falta de retorno financeiro (European Medicines Agency, 2012, 2017).

Mais recentemente, um outro medicamento baseado em AAVs, o *Luxturna* foi aprovado pela FDA em 2017 (Food and Drug Administration, 2018) e pela EMA em 2018, e está indicado para o tratamento de doentes adultos e pediátricos com perda de visão por mutações no gene *RPE65*. Este medicamento tem como vetor um AAV do serotipo 2 que é usado como veículo de transporte para o DNA complementar do gene *hrPE65*. Este medicamento é administrado por via subretiniana, onde o vetor infecta as células retinianas viáveis, que passam a expressar a proteína codificada pelo rAAV (European Medicines Agency, 2018, 2020).

Por fim, o último medicamento desta categoria aprovado até ao momento é o *Zolgensma*, aprovado em 2019 pela FDA (Food and Drug Administration, 2020) e aprovado a 18 de maio de 2020 pela EMA. Este medicamento contém AAVs do serotipo 9 como vetor e o transgene codifica para a proteína de sobrevivência do neurónio motor (SMN). O *Zolgensma* está indicado para doentes com Atrofia Muscular Espinhal (SMA) com mutações no gene *SMN1* com diagnóstico de SMA tipo I e em doentes com mutações no gene *SMN1* e com até 3 cópias do gene *SMN2*. O gene *SMN1* é responsável pela grande parte da produção da proteína SMN, enquanto o gene *SMN2* por apenas uma pequena parte da produção da proteína SMN funcional, podendo existir um número variável de cópias do gene *SMN2*. Logo, o número de cópias do gene *SMN2* é inversamente proporcional à gravidade da doença (Foust *et al.*, 2010; Kolb e Kissel, 2015; Mendell *et al.*, 2017). A administração do *Zolgensma* é tipicamente feita a crianças com menos de 2 anos de idade, e com uma única perfusão intravenosa conseguem-se alcançar melhorias dramáticas ao nível do fenótipo da doença graças à expressão da proteína SMN funcional (European Medicines Agency, 2020).

3. Introdução às plataformas de produção de rAAVs

Os vetores virais Adeno-Associados têm demonstrado ser uma estratégia promissora para a vetorização de terapia génica, desde os primeiros ensaios pré-clínicos, clínicos e mais recentemente confirmado pelos primeiros medicamentos aprovados para uso clínico. Com o avanço da tecnologia e do conhecimento sobre os AAVs foi possível a descoberta de novos serotipos, bem como o desenvolvimento de estratégias para melhorar esta técnica de vetorização. Nos últimos anos, com o aumento do número de ensaios clínicos utilizando AAVs e com a aprovação dos primeiros medicamentos, surgiu como novo desafio a transposição de escala da produção de AAVs. Assim existe uma necessidade emergente de otimizar e aperfeiçoar as plataformas atualmente disponíveis, de forma a aumentar a produção, garantindo títulos elevados, pureza e potência do vetor, bem como o cumprimento das GMPs, essenciais para a produção de rAAVs para o uso clínico, de forma a garantir sempre a qualidade, a segurança e a eficácia dos vetores AAVs.

Os vários protocolos para a produção de rAAVs em culturas de células assentam em três elementos básicos: (1) o transgene de interesse juntamente com as sequências reguladoras/promotoras (que completam a *cassette* de expressão) flanqueados em ambas as extremidades pelas sequências ITRs; (2) as sequências genéticas codificantes das proteínas Rep e Cap do AAV; (3) as funções do vírus *auxiliar* (Ayuso, Mingozzi e Bosch, 2010; Wang *et al.*, 2012). Estes elementos podem ser introduzidos nas diferentes plataformas recorrendo a diversas estratégias, tais como a transfeção das células com plasmídeos, a infeção de células por vírus (pode ser o próprio vírus *auxiliar* ou um vírus recombinante que irá transportar os elementos essenciais), e por fim, estas sequências podem ainda ser integradas no genoma das células que servem como plataforma para a produção. Nos diversos protocolos pode-se usar uma ou a junção de várias estratégias (Naso *et al.*, 2017).

Uma das primeiras plataformas a surgir e a mais comumente utilizada para a produção de rAAVs nas primeiras fases de desenvolvimento de um novo medicamento (fase pré-clínica e primeiros ensaios clínicos) envolve a transfeção de células HEK293 aderentes (linha celular constituída por células embrionárias de rim humano) com dois ou três plasmídeos que introduzem no sistema os elementos necessários para a produção de rAAVs. Apesar de ser uma técnica eficiente e ter como vantagem a não utilização de vírus auxiliar, esta apresenta algumas limitações, para além de ser elaborada e morosa, apresenta desvantagens inerentes ao facto das células serem aderentes (Wang *et al.*, 2012). As células aderentes necessitam de um suporte sólido para aderirem e se multiplicarem, estando assim intrinsecamente ligadas com a área de superfície do biorreator. Esta desvantagem é especialmente notória aquando

da transposição de escala, como demonstrado por Cecchini, Negrete e Kotin (2008) e presente no **ANEXO 2**, em que para cada aumento do número de cópias do genoma do AAV é necessário um número crescente de células e uma maior área de superfície, pelo que o espaço ocupado pelos biorreatores se torna irrealisticamente grande. Ao ser usado um elevado número de placas/frascos a variabilidade de rendimentos e composição entre lotes passa a constituir um problema (Cecchini, Negrete e Kotin, 2008; Clément e Grieger, 2016; Kotin, 2011; Robert *et al.*, 2017). Por outro lado, a composição do meio de cultura de células HEK293 aderentes necessita da presença de soro para que as células se possam multiplicar, aumentando assim a possibilidade de inserir agentes potencialmente patogénicos na produção. É importante também denotar que diferenças entre lotes de soros podem contribuir para uma variabilidade acrescida do rendimento da produção de rAAVs (Robert *et al.*, 2017).

Uma das abordagens para maximizar a produção dos AAVs foi deixar de usar células aderentes e passar a utilizar células em suspensão. Três destas novas abordagens são (1) Linhas celulares HEK293 adaptadas à suspensão, (2) Sistemas de expressão de vetores através da utilização de baculovírus (BEVS) utilizando células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) e (3) Sistemas de infeção de células de mamíferos modificadas em suspensão (infeção por rHSV em células de rim de hamster recém-nascido [BHK] ou infeção de Adenovírus em células HeLa modificadas). (Grieger e Samulski, 2012; Naso *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2012). No **ANEXO 3** apresenta-se uma tabela comparativa das diferentes plataformas para a produção de rAAVs.

O *Glybera* foi inicialmente desenvolvido utilizando a transfeção de plasmídeos em células HEK293 aderentes, tendo sido pedido aconselhamento científico à EMA de forma a alterar o sistema de produção para a utilização de baculovírus para a produção a nível comercial (European Medicines Agency, 2012). O *Luxturna* é produzido através da transfeção de células de mamífero por três plasmídeos (European Medicines Agency, 2018). Por fim, o *Zolgensma* é produzido utilizando a transfeção de células HEK293 aderentes com uma solução contendo três plasmídeos, o plasmídeo vetor (pSMN), o plasmídeo AAV (pAAV2/9) que contem os genes *rep* do AAV2 e os genes *cap* do AAV9 e por fim, o plasmídeo com as funções auxiliares do Adenovírus (pHELP) (European Medicines Agency, 2020).

3.1. Transfeção transiente de células HEK293 em suspensão

A transfeção transiente para a produção de rAAVs envolve a transfeção de células HEK293 com dois a quatro plasmídeos (o número de plasmídeos é dependente do tipo de construção, isto é, que elementos cada plasmídeo transporta). Geralmente um plasmídeo contém o gene de interesse flanqueado pelas sequências ITRs (codificadas em *cis*), um segundo plasmídeo que codifica para as proteínas Rep e Cap do AAV (codificadas em *trans*) e por fim, outro plasmídeo

que contém os genes auxiliares (Ayuso, Mingozi e Bosch, 2010; Matsushita *et al.*, 1998; Naso *et al.*, 2017; Penaud-Budloo *et al.*, 2018; Sharon e Kamen, 2018).

A transfeção transiente de células HEK293 em suspensão é uma evolução natural da estratégia inicial em que se utilizavam células HEK293 aderentes a um suporte sólido. Contrariamente, nesta nova abordagem as células HEK293 foram modificadas para se adaptarem à suspensão, ultrapassando assim a limitação inicial da necessidade incomportável de superfícies cada vez maiores, tornando desta forma possível aumentar a escala de produção. Embora tenham sido alcançados rendimentos mais robustos com as células aderentes, nos últimos anos foi possível alcançar rendimentos similares com as células HEK293 adaptadas à suspensão, sendo os rendimentos alcançados aproximadamente de 10^{14} genomas do vetor rAAV por litro de cultura de células, utilizando para isso um sistema de colheita contínua de meio, em que se fazem várias colheitas de meio ao longo do tempo e procede-se à substituição com meio fresco, de forma a refletir uma colheita descontínua, maximizando o *output* da produção (Grieger, Soltys e Samulski, 2016). Com a exceção da linha celular HEK293, este sistema de produção é considerado como isento de componentes de origem animal, isto é, isento de soro, e adicionalmente, este sistema também é isento de antibióticos. A adaptação das células HEK293 à suspensão permitiu também aumentar a eficácia e reprodutibilidade da transfeção, bem como, permitiu a transposição de escala utilizando “Shake-flasks”, biorreatores Wave e tanques com agitação (Clément e Grieger, 2016; Grieger e Samulski, 2012; Grieger, Soltys e Samulski, 2016; Naso *et al.*, 2017; Robert *et al.*, 2017; Wang, Tai e Gao, 2019).

A composição dos meios de cultura é conhecida por influenciar a eficácia da transfeção dos plasmídeos, por exemplo, pela presença de dextrano. Como tal, a adição de certos meios de cultura (ou constituintes) deve ser evitada antes do processo de transfeção. Adicionalmente, uma vez que a composição do meio pode influenciar o rendimento, esta deve ser testada e otimizada para a produção de rAAVs por transfeção de plasmídeos. (Robert *et al.*, 2017)

Nos diferentes protocolos para a produção de rAAVs através de transfeção estão descritos diversos reagentes ou métodos físicos que promovem a internalização do plasmídeo na célula, no entanto para células em suspensão, o fosfato de cálcio e a polietilenimina (PEI) são os mais utilizados. O PEI é normalmente o reagente preferido para a transfeção, uma vez que é um reagente comercialmente disponível e apresenta maior reprodutibilidade, bem como, uma melhor relação custo/efetividade quando comparado com lípidos catiónicos. Para além disso, apresenta ainda menos sensibilidade a flutuações no pH e aos solutos dissolvidos no meio de cultura quando comparado com o fosfato de cálcio (Ayuso, Mingozi e Bosch, 2010; Kotin, 2011; Loo, van der e Wright, 2016; Robert *et al.*, 2017; Sharon e Kamen, 2018). A utilização

de PEI elimina a necessidade de alterar o meio de cultura pós-transfecção, diminuindo por sua vez os custos associados à renovação do meio de cultura, bem como, a diminuição da carga de trabalho (Grieger, Soltys e Samulski, 2016; Huang *et al.*, 2013). O PEI é um polímero que apresenta vários grupos amina, sendo estes responsáveis pela elevada densidade de cargas positivas do PEI, permitindo que sejam estabelecidas interações iônicas com os grupos fosfato do DNA, condensando-o. Após a formação do complexo PEI-DNA, este é então incorporado pela célula por endocitose. Uma vez no interior da célula, a bomba de prótons presente na membrana do endossoma promove a tumescência osmótica do complexo até à ruptura da membrana do endossoma (Huang *et al.*, 2013; Longo *et al.*, 2012). No entanto, ainda se desconhece o mecanismo responsável pela migração do plasmídeo para o núcleo da célula. O complexo PEI-DNA apresenta um rácio ideal entre as unidades molares dos átomos de azoto do PEI (N) e as unidades molares dos átomos de fósforo do DNA (P), este é normalmente conhecido como o rácio N/P, relacionando-se com eficiência do processo de transfecção. Embora os rácios variem entre os diferentes protocolos, estes apresentam uma característica em comum, o excesso de PEI, uma vez que a tumescência no interior do endossoma é dependente desta. Portanto a otimização do rácio de N/P resulta no uso de menores quantidade de DNA (sob a forma de plasmídeos), diminuindo assim a necessidade de uma purificação mais extensa e morosa, bem como, a diminuição dos custos associados ao uso de excesso de reagentes (Huang *et al.*, 2013). No entanto, mesmo após a otimização do rácio N/P continuam a ser necessárias elevadas quantidade de DNA sob a forma de plasmídeos. Na produção em larga escala, normalmente utiliza-se uma densidade de células no momento da transfecção que varia entre 1,0 e $2,0 \times 10^6$ células/ml. Para uma transfecção eficiente é requerido aproximadamente 1 mg de DNA (sob forma de plasmídeos) por litro de cultura de células (Huang *et al.*, 2013; Naso *et al.*, 2017; Robert *et al.*, 2017; Sharon e Kamen, 2018). Atualmente, encontra-se comercialmente disponível um reagente que deriva da polietilenimina, a PEI MAX, que apresenta a mesma cadeia linear e os mesmo grupos amina que a PEI, mas que contém aproximadamente mais 11% de azotos livres, o que demonstrou ser superior na eficiência de transdução (Delafosse, Xu e Durocher, 2016; Grieger, Soltys e Samulski, 2016).

Adicionalmente, para que a produção de rAAV por transfecção seja efetiva é necessário um rácio ótimo de cada um dos plasmídeos, uma vez que, a ausência ou o excesso de um determinado plasmídeo pode contribuir para a heterogeneidade do produto final. Este facto pode levar, por exemplo, à variação da razão entre cápsides vazias/cheias na ausência do plasmídeo que codifica o transgene. Normalmente, o número de cápsides vazias representam uma fração significativa do produto final e, como tal, é necessário o desenvolvimento de

métodos de purificação e métodos de controlo analítico capazes de distinguir entre as variantes com e sem o transgene, de forma a assegurar a reprodutibilidade e similaridade entre os lotes (Grieger, Soltys e Samulski, 2016; Naso *et al.*, 2017; Wang, Tai e Gao, 2019).

Geralmente, os rAAVs são recuperados entre 48 e 72 horas após a transfeção, podendo ser recuperados a partir das células e/ou a partir do sobrenadante. Embora alguns autores defendam que o sobrenadante não contribui significativamente para a titulação final de rAAVs (Reed *et al.*, 2006), outros obtiveram um resultado mais satisfatório, quando procederam à purificação isolada do sobrenadante com subsequente adição dos rAAVs obtidos a partir do lisado das células, alcançando assim títulos mais elevados (Grieger, Soltys e Samulski, 2016; Huang *et al.*, 2013; Miyake *et al.*, 2012). Ver secção sobre a purificação.

3.2. Sistema de produção de vetores baseados em expressão mediada por Baculovírus (BEVS)

O sistema de produção de vetores através da utilização de Baculovírus (BEVS) utiliza como plataforma de produção as células de inseto da espécie *Spodoptera frugiperda*, mais especificamente as células Sf9, que são um subclone das células Sf21AE resultantes da imortalização de células de ovário (Penaud-Budloo *et al.*, 2018). As células Sf9 estão adaptadas a crescer em suspensão, num meio isento de soro e com uma temperatura de 27 °C (Grieger e Samulski, 2012). Neste sistema os baculovírus infetam as células Sf9, transportando os genes *rep* e *cap*, bem como a *cassete* de expressão flanqueada pelas sequências ITRs, não sendo necessárias as funções do vírus auxiliar (Adenovírus ou Herpes vírus), uma vez que o próprio baculovírus providencia as funções auxiliares necessárias para a replicação do genoma dos AAVs (Aponte-Ubillus *et al.*, 2018; Ayuso, Mingozzi e Bosch, 2010; Kotin, 2011; Penaud-Budloo *et al.*, 2018; Sandro, Relizani e Benchaouir, 2019; Wang *et al.*, 2012; Zolotukhin, 2005). No entanto, o número de baculovírus utilizados para a produção de rAAVs é dependente do tipo de construção genética dos baculovírus recombinantes e das células Sf9, bem como da estratégia utilizada para a produção, podendo este número variar entre um e quatro baculovírus (Grieger e Samulski, 2012; Naso *et al.*, 2017). Por exemplo, num sistema que utilize três baculovírus, o primeiro pode conter o gene *rep*, o segundo conter o gene *cap* e, por fim, o terceiro conter o gene de interesse. Num sistema alternativo, as células Sf9 podem ser modificadas de forma a incluírem o gene de interesse no seu genoma, neste caso são apenas necessárias duas preparações de baculovírus (uma com o gene *rep* e outra com o gene *cap*). Por fim, e de forma a simplificar ainda mais o sistema, desenvolveram-se células Sf9 que contêm os genes *rep* e *cap* integrados no seu genoma, mas que estão sob o controlo de um promotor/potenciador, sendo que este é ativado apenas após uma infeção por um baculovírus.

Neste sistema, a infecção pode ocorrer apenas com o baculovírus contendo o gene de interesse flanqueado pelas sequências ITRs, pois este ao ativar o promotor/potenciador desencadeia a produção dos rAAVs (Clément e Grieger, 2016; Galibert e Merten, 2011; Naso *et al.*, 2017; Penaud-Budloo *et al.*, 2018).

Uma vez que os baculovírus utilizados na produção de rAAVs pelo BEVS apresentam capacidade replicativa, estes podem sofrer amplificação durante a produção, causando inicialmente uma infecção produtiva, com a libertação de aproximadamente 100 baculovírus infecciosos por célula. Os baculovírus produzidos poderão secundariamente infectar novas células, ficando a cultura de células completamente infetada após um ou dois ciclos de infecção, dependendo do número inicial de baculovírus utilizado (Galibert e Merten, 2011; Kotin, 2011). A necessidade de uma baixa Multiplicidade de infecção (MOI) melhora a transposição de escala do sistema, uma vez que no início da produção é necessário um baixo número de baculovírus, tornando o sistema mais económico. A principal desvantagem desta abordagem é o aumento do tempo de produção após infecção, passando de geralmente 72 para 96 horas (Ayuso, Mingozzi e Bosch, 2010; Galibert e Merten, 2011; Wang *et al.*, 2012). Acresce ainda referir que a infecção constitui uma estratégia mais reprodutível quando comparada à transfeção, embora ambos sejam processos transientes por natureza. (Grieger e Samulski, 2012).

Um dos benefícios do BEVS é a transponibilidade volumétrica, sendo que o processo é linear entre volumes de 0,02 e 200 L (Clément e Grieger, 2016; Kotin, 2011; Loo, van der e Wright, 2016). Foram obtidos rendimentos pelo sistema BEVS na ordem dos 10^5 genomas de vetor/célula, o que dá aproximadamente 10^{15} genomas de vetor/L (Naso *et al.*, 2017; Penaud-Budloo *et al.*, 2018; Zolotukhin, 2005). Estes rendimentos são conseguidos uma vez que as células Sf9 são de fácil manipulação e conseguem crescer em meios com elevada densidade celular, tornando assim este sistema apetecível e rentável para a produção em larga escala (Joshi *et al.*, 2019; Naso *et al.*, 2017).

No entanto, o processo de clonagem e completa caracterização dos baculovírus no banco viral mãe (*Master Virus Bank*) é um processo moroso, podendo chegar até 2 meses (Grieger e Samulski, 2012; Wang *et al.*, 2012). Para além da clonagem ser um processo demorado, os baculovírus apresentam baixa estabilidade genómica, caracterizada pela perda dos genes recombinantes após múltiplas passagens. Esta perda limita a expansão dos baculovírus para menos de 6 passagens, sendo necessário recorrer regularmente a uma passagem precoce do banco mãe, uma vez que a instabilidade genética leva a quebras significativas na produção, o que acentua após várias passagens (Cecchini, Negrete e Kotin, 2008; Galibert e Merten, 2011; Grieger e Samulski, 2012; Kotin, 2011; Merten, Gény-Fiamma e Douar, 2005; Robert *et al.*,

2017). De forma a otimizar os baculovírus e torná-los genomicamente mais estáveis, procedeu-se à deleção dos genes do baculovírus não essenciais para a produção de rAAVs. Uma outra abordagem teórica implica minimizar a produção de baculovírus durante a produção de rAAVs para evitar o consumo desnecessário de recursos celulares que poderiam ser utilizados para a produção de rAAVs. É de realçar o facto dos baculovírus serem também uma impureza da produção de rAAVs, sendo necessário eliminá-los ou inativá-los durante a purificação (Galibert e Merten, 2011).

Adicionalmente, os rAAVs produzidos através do BEVS são menos infecciosos do que os rAAVs produzidos através de transfeção transiente de células HEK293, uma vez que os rácios de inserção das subunidades da cápside são diferentes entre estes dois sistemas. Sendo que as VPI e VP2 são incorporadas de forma menos eficiente no BEVS e, visto que a VPI desempenha um papel fundamental na infeção dos AAV (presença do domínio fosfolipase A2 na região N-terminal, importante para a libertação do AAV do endossoma), baixas proporções desta proteína traduzem-se numa diminuição da infecciosidade do AAV (Balakrishnan e Jayandharan, 2014; Clément e Grieger, 2016; Galibert e Merten, 2011; Grieger e Samulski, 2012; Kondratov *et al.*, 2017; Li e Samulski, 2020). Esta diminuição na incorporação da VPI pode ser justificada pelas potenciais diferenças pós-translacionais que ocorrem nas células Sf9 quando comparadas com células de mamífero (Felberbaum, 2015; Grieger e Samulski, 2012; Naso *et al.*, 2017). O produto final da produção de rAAVs pelo BEVS apresenta também uma elevada quantidade de cápsides de AAVs vazias, que pode ser devida à expressão excessiva das proteínas da cápside ou à baixa eficácia de incorporação do genoma do rAAV na cápside (Kondratov *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2012). No entanto, a compreensão da instabilidade dos baculovírus e das diferenças pós-translacionais das células Sf9 permitiu a otimização dos codões dos genes *rep* e *cap*, contribuindo assim para a resolução do problema do rácio de expressão das VPI/VP2/VP3 (Ayuso, Mingozzi e Bosch, 2010; Felberbaum, 2015; Galibert e Merten, 2011; Kondratov *et al.*, 2017; Li e Samulski, 2020; Merten, Gény-Fiamma e Douar, 2005; Naso *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2012; Zolotukhin, 2005). Acresce ainda referir que um aumento da temperatura de 27 °C para 30 °C resulta numa cápside com melhor incorporação das subunidades VPI e VP2 (Galibert e Merten, 2011).

Os rAAVs são recuperados geralmente três dias após a transfeção das células Sf9, sendo que são colhidas as células e o sobrenadante seguindo depois para a purificação (Galibert e Merten, 2011).

Estas preocupações são compensadas pelo facto dos baculovírus não conseguirem infetar efetivamente células de mamíferos, o que os faz inerentemente mais seguros que outros

sistemas de produção de base viral (Galibert e Merten, 2011; Naso *et al.*, 2017; Penaud-Budloo *et al.*, 2018). Contudo, estas impurezas (baculovírus presentes no produto final) foram identificadas pela EMA no *European Public Assessment Report (EPAR)* do *Glybera* como sendo um assunto que deveria ser mais bem entendido, sendo pedida uma avaliação do risco relativo às consequências clínicas da administração de quantidade significativas de baculovírus e subsequente expressão de proteínas virais (mesmo que teórica) (European Medicines Agency, 2012; Penaud-Budloo *et al.*, 2018).

3.3. Linhas celulares produtoras de mamífero

As células de mamífero produtoras/*packaging*, são células geneticamente modificadas de forma a integrar no seu genoma um ou mais dos elementos genéticos necessários à produção de rAAVs. As células produtoras podem ser um sistema incompleto, isto é, apenas é fornecida uma parte dos genes necessários para a produção de rAAVs, geralmente os genes *rep* e *cap*. Por outro lado, as células produtoras podem conter todos os elementos necessários para a produção de rAAVs, isto é, os genes *rep* e *cap*, bem como, o transgene a ser incluído nos rAAVs (Ayuso, Mingozzi e Bosch, 2010; Clément e Grieger, 2016; Merten, Gény-Fiamma e Douar, 2005; Robert *et al.*, 2017; Sharon e Kamen, 2018). No entanto, existem elementos genéticos que não são expressos de forma estável em células de mamífero, nomeadamente as funções auxiliares, domínios importantes para a produção dos rAAVs. Excecionalmente, foi possível recombinar células HEK293 com os genes E1a e E1b de Ad, todavia, a sua expressão em células contendo os genes *rep* conduz a toxicidade celular provocada pela expressão das proteínas Rep. Consequentemente, foram utilizadas duas abordagens diferentes para o desenvolvimento de linhas celulares de produtoras (Ayuso, Mingozzi e Bosch, 2010; Naso *et al.*, 2017; Robert *et al.*, 2017; Sharon e Kamen, 2018).

A primeira abordagem, é baseada na coinfeção de células de rim de hamster recém-nascido (BHK) com dois Vírus recombinantes derivados do Herpes Simplex (rHSV), cujos genomas foram modificados (deleção de uma proteína essencial para a replicação) de forma a não possuírem capacidade replicativa. Os elementos necessários à produção de rAAVs são inseridos nos rHSV, e a produção inicia-se após um único passo de infeção com os dois rHSV. Um dos rHSV contém os genes *rep* e *cap*, enquanto que o outro rHSV codifica para a *cassette* de expressão flanqueada pelas sequências ITRs (GOI). Contudo, recentemente foi possível a inclusão de todos os elementos no mesmo rHSV, transportando este a *cassette* de expressão, bem como, os genes *rep* e *cap*. No entanto, o uso de rHSV com os elementos em separado permite otimizar o rácio de cada um dos elementos (Grieger e Samulski, 2012; Naso *et al.*, 2017; Penaud-Budloo *et al.*, 2018; Robert *et al.*, 2017). A título de exemplo, num trabalho

desenvolvido por Conway *et al.* (1999), o rácio ótimo entre HSV-Rep/Cap para HSV-GOI foi de 12 para 2, todavia, este rácio deve ser otimizado individualmente (Robert *et al.*, 2017). Neste sistema, não é necessário fornecer funções auxiliares adicionais, uma vez que o próprio HSV é capaz de induzir a replicação dos AAVs (Grieger e Samulski, 2012; Warnock, Daigre e Al-Rubeai, 2011). Inicialmente utilizaram-se nesta estratégia de produção células HEK293 aderentes, mas com o intuito de aumentar o potencial de transponibilidade de escala desta tecnologia passaram-se a utilizar células BHK em suspensão. Esta alteração possibilitou a redução da quantidade de rHSV, o aumento da densidade celular no tempo de infeção, bem como, a diminuição do tempo até à colheita dos rAAVs. No entanto, à semelhança da desvantagem do sistema BEVS o processo de gerar e caracterizar totalmente os rHSV é moroso. Acresce ainda o facto dos rHSV não possuírem capacidade de multiplicação (de forma a torná-los seguros para a administração *in vivo*), o que reduz os títulos finais da produção de rHSV, tornando-os mais sensíveis às condições de produção e de processamento. Ainda que os rHSV não tenham a capacidade de se replicarem, estes ainda permanecem no produto final como um contaminante, pelo que se torna importante que a purificação seja eficaz para a remoção destes (Grieger e Samulski, 2012; Robert *et al.*, 2017).

A segunda abordagem é baseada na produção estável de linhas celulares HeLa em suspensão e na utilização de meios de cultura isentos de soro. As células HeLa foram modificadas para conter integradas no seu genoma o transgene flanqueado pelas sequências ITRs e os genes *rep* e *cap*. As proteínas Rep não são expressas uma vez que as células HeLa não têm os genes auxiliares, necessários à sua expressão. Deste modo, para que se inicie a produção de rAAVs é necessária a infeção com um Adenovírus (Ad) do tipo selvagem. A inclusão de vírus com capacidade de replicação no processo de produção levanta uma questão que deve estar presente durante a purificação, a fim de os inativar e eliminar. É possível mitigar em parte a presença de Ad no fim da produção através do uso de Ad adaptados ao frio. Estes são atenuados durante o processo de produção, no entanto, expressam quantidades suficientes dos genes auxiliares para produção dos rAAVs. A capacidade natural dos AAVs para reprimir a replicação dos Ad presumivelmente também limita a contaminação por Ad. Adicionalmente, para que este método esteja em conformidade com as GMPs, o processo de remoção dos Ad necessita de estar completamente validado (Ayuso, Mingozzi e Bosch, 2010; Naso *et al.*, 2017; Robert *et al.*, 2017; Sharon e Kamen, 2018). A infeção com Adenovírus no processo de produção de rAAVs apresenta algumas vantagens em relação à transfeção por plasmídeos contendo as funções auxiliares, uma vez que, a infeção é um processo mais reprodutível fazendo com que a transposição para larga escala seja menos complexa que as estratégias que

utilizam a transfeção. Adicionalmente, as linhas celulares HeLa apresentam rendimentos volumétricos similares à transfeção transiente e foram bem sucedidas na transposição de escala, sendo possível utilizar um biorreator de tanque com agitação de 250 L (Clément e Grieger, 2016; Penaud-Budloo *et al.*, 2018; Robert *et al.*, 2017; Sharon e Kamen, 2018).

Contudo, estas abordagens apresentam algumas desvantagens que limitam o uso de linhas celulares estáveis para a produção de rAAVs para uso clínico. Por um lado, a criação de linhas celulares estáveis é um processo moroso e complexo, existindo ainda a necessidade de estabelecer uma linha celular para cada rAAV diferente, isto é, caso se queira modificar o serotipo ou o transgene é necessário gerar uma nova linha celular, tornando o sistema muito pouco flexível (Ayuso, Mingozzi e Bosch, 2010; Clément e Grieger, 2016; Robert *et al.*, 2017). Por outro lado, a caracterização e estabilização das linhas celulares é um processo complicado, sendo necessário incluir os riscos relacionados com o impacto negativo do historial das passagens na cinética de crescimento das células e na produção de rAAVs, de forma a limitar o número de passagens e otimizar a produção (Clément e Grieger, 2016).

3.4. Ideias a reter sobre a Produção

As diferentes estratégias para a produção de rAAVs assentam na utilização de células, quer de mamífero quer de inseto, às quais são fornecidas os três elementos básicos para a produção, o gene de interesse, os genes *rep* e *cap* e as funções auxiliares. A forma como os elementos são inseridos no sistema depende das células utilizadas, podendo estes ser inseridos sob a forma de plasmídeos, de baculovírus, de rHSV ou de Ad. A conjugação destes fatores dita a transponibilidade de escala da produção que mesmo assim não é linear, destacando-se igualmente a importância de todas as outras variáveis do processo de produção que necessitam de ser otimizadas, nomeadamente, a composição do meio, a concentração de O₂/CO₂, a velocidade de agitação, o reagente utilizado na transdução, a estabilização e caracterização dos baculovírus, entre outras variáveis, de forma a potenciar as atuais plataforma de produção de rAAVs.

4. Introdução à Purificação de rAAVs

A Purificação corresponde ao processo que sucede à produção de rAAVs, revestindo-se de uma extrema importância e criticidade no processo de obtenção de rAAVs com as características de pureza adequadas à prática clínica, uma vez que esta é a fase antes da formulação do medicamento e que tem como objetivo primordial a remoção das impurezas introduzidas na produção, indo ao encontro das exigências das Agências Regulamentares relativamente aos medicamentos de uso Humano. À semelhança do que acontece com a produção, a necessidade da transposição de escala da purificação é também justificada pelo aumento de número dos ensaios clínicos e primeiros medicamentos aprovados contendo rAAVs. A procura crescente requer um aumento na quantidade de rAAVs produzidos, como visto anteriormente, de forma a satisfazer as necessidades emergentes e, por conseguinte, existe um aumento na exigência da capacidade dos métodos de purificação. Por outro lado, os métodos de purificação devem garantir que o produto final tem um título elevado, mantendo sempre a potência do vetor *in vivo* intacta e um elevado grau de pureza. Com o objetivo de Produção em larga escala, é também necessário que a purificação seja um processo reprodutível entre lotes, permita uma elevada recuperação do vetor e seja flexível a posteriores transposições de escala expectáveis com o aumento da procura (Clément e Grieger, 2016; Robert *et al.*, 2017).

A purificação e a produção são processos que se encontram intimamente ligados, uma vez que a purificação se inicia após o final da produção e é durante este processo que ocorre a separação e a eliminação de impurezas, bem como, a concentração dos rAAVs a partir da produção. Como descrito no capítulo anterior, para a multiplicação dos rAAVs existem diversas estratégias e plataformas que recorrem a diferentes matérias primas e, como tal, no final da produção iremos ter as impurezas resultantes dos materiais utilizados, (por exemplo, baculovírus, plasmídeos, rHSV, Ad, PEI) e impurezas comuns às diferentes estratégias (por exemplo, organelos celulares, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, metabolitos celulares). Adicionalmente, iremos ter duas populações de partículas virais, os rAAVs (contendo o transgene de interesse) e cápsides de AAVs vazias/cápsides com genoma incompleto (Naso *et al.*, 2017; Nass *et al.*, 2018; Schnödt e Büning, 2017). As partículas virais vazias partilham a mesma estrutura proteica (cápside) que os rAAVs, mas estas não contêm no seu interior o transgene, ao passo que as cápsides com genoma incompleto resultam de cópias truncadas do transgene (Schnödt e Büning, 2017). A eficiência do processo de produção é afetada por um conjunto de fatores, incluindo o tamanho e a sequência do genoma do vetor, a integridade das sequências ITR, o sistema de cultura de células, o promotor utilizado para a expressão dos

genes virais e a eficiência do processo de transfeção/infeção utilizado para providenciar os vários elementos. Estes fatores, em combinação com outros, afetam negativamente a produção do vetor resultando num excesso de cápsides vazias e de variabilidade entre lotes (Schnödt e Büning, 2017). O nível de cápsides vazias pode variar entre 10% e 90% (Wang et al., 2019). Embora não exista consenso sobre a importância das cápsides vazias para a terapia génica, a sua presença é considerada danosa, apresentando-se como uma fonte desnecessária de material antigénico que possivelmente pode induzir ou elevar a resposta imune inata e adaptativa contra os AAVs. Este facto pode também levar à perda total da transdução do rAAV. Adicionalmente, as cápsides vazias podem inibir a transdução dos rAAVs competitivamente, bem como levar à sua agregação (Naso et al., 2017; Nass et al., 2018; Qu et al., 2015; Schnödt e Büning, 2017; Wang et al., 2019). Deste modo, e atendendo às composição e abundância das impurezas obtidas pelos vários métodos de produção, as técnicas de purificação a utilizar poderão também ser diferentes, de forma a assegurar a pureza desejada. A quantidade e qualidade das impurezas é também influenciada em parte pela composição dos meios de cultura, como por exemplo, a utilização de meios isento de soro e de antibióticos o que facilitam a purificação (Burova e Ioffe, 2005; Segura, Kamen e Garnier, 2011).

Todavia, existem passos que são comuns a todos os esquemas de purificação de vetores virais. O primeiro passo em qualquer esquema de purificação é a colheita dos vetores virais a partir da cultura de células (Ayuso, Mingozzi e Bosch, 2010; Clément e Grieger, 2016). Neste passo, pode-se colher a fração celular, o sobrenadante, ou ambas as frações. A escolha da fração a colher é dependente da estratégia utilizada para a multiplicação dos rAAVs, do serotipo utilizado para a sua construção, bem como, do tempo decorrido após a infeção/transfeção. (Adams, Bak e Tustian, 2020; Burova e Ioffe, 2005; Clément e Grieger, 2016; Qu et al., 2015; Robert et al., 2017). Nos casos em que os vetores se encontram na fração intracelular é necessário proceder à lise das células, de forma a libertar os vetores do seu interior. A lise pode ser alcançada através de ciclos de congelação/descongelação (Burova e Ioffe, 2005; Kotin, 2011; Matsushita et al., 1998), no entanto, quando se pretende efetuar a lise em larga escala este método não é aplicável, devido aos elevados volumes a serem processados (Ayuso, Mingozzi e Bosch, 2010; Segura, Kamen e Garnier, 2011). Desta forma, à escala industrial opta-se por outras estratégias como a lise química, através da diminuição da força iónica do meio (choque hipotónico) ou através da adição de detergentes (Triton X-100 e Tween® 20), ou de estratégias de lise física (*Microfluidizer*) (Adams, Bak e Tustian, 2020; Ayuso, Mingozzi e Bosch, 2010; Burova e Ioffe, 2005; Kotin, 2011). Após a lise celular, os rAAVs são libertados para o

meio, bem como, DNA, RNA, proteínas e lípidos das células produtoras. A libertação do material celular é acompanhada por um aumento da viscosidade do meio, dificultando assim os processamentos subsequentes. Para contornar este aumento da viscosidade adicionam-se nucleases (por exemplo, Benzonase[®]) que fazem a digestão enzimática do DNA e RNA, permitindo assim uma diminuição da viscosidade do meio (Burova e Ioffe, 2005; Clément e Grieger, 2016; Kotin, 2011; Robert *et al.*, 2017; Schnödt e Büning, 2017; Snyder e Flotte, 2002). Nesta fase pode ainda ser vantajoso adicionar sais ao lisado de forma a prevenir a agregação dos rAAVs ou a ligação dos mesmos a outras proteínas celulares e/ou detritos celulares (Robert *et al.*, 2017).

Quando utilizados na produção de rAAVs, os vírus auxiliares necessitam de ser eliminados ou inativados. Os AAVs são resistentes a elevadas temperaturas (Kotin, 2011; Robert *et al.*, 2017), e portanto, pode utilizar-se a temperatura para inativar os vírus auxiliares. Nos casos dos Ad e dos rHSV, estes podem ser inativados a temperaturas de 52 °C e 56 °C, respetivamente (Penaud-Budloo *et al.*, 2018; Robert *et al.*, 2017). No entanto, em larga escala opta-se pela utilização de detergentes no momento da colheita, como o Triton X-100 a uma concentração de 1%, ou floculação das proteínas do rHSV induzida por pH baixo (Adams, Bak e Tustian, 2020; Penaud-Budloo *et al.*, 2018). Adicionalmente, os Baculovírus necessitam também de ser inativados no caso da utilização do método BEVS para a produção. A adição de Triton X-100 numa concentração de 0,5% v/v no momento da colheita permite a disrupção do envelope dos baculovírus. Este passo inativa-os, mas não altera a integridade das nucleocápsides. Estas apresentam aproximadamente 50 nm em diâmetro e 300 nm em comprimento, sendo facilmente removida durante os processos de filtração (Penaud-Budloo *et al.*, 2018).

Posteriormente segue-se o processo de clarificação da produção (sobrenadante e/ou lisado) de forma a eliminar os detritos celulares (Segura, Kamen e Garnier, 2011). A clarificação é alcançada através de técnicas de centrifugação contínua, geralmente utilizadas em pequenos laboratórios, ou através de técnicas de microfiltração terminal/microfiltração de fluxo cruzado (Ayuso, Mingozzi e Bosch, 2010; Kotin, 2011). As técnicas de microfiltração são mais adequadas à produção à larga escala, com a ressalva de que a microfiltração de fluxo cruzado apresenta como vantagem em relação à microfiltração terminal o facto da colmatação da membrana filtrante estar significativamente diminuída (Robert *et al.*, 2017; Segura, Kamen e Garnier, 2011), (**Figura 2**). Adicionalmente, durante a clarificação da preparação pode recorrer-se à utilização de um sistema com múltiplos filtros, apresentando um tamanho de

poro sucessivamente menor e minimizado assim a colmatção (Kotin, 2011; Segura, Kamen e Garnier, 2011).

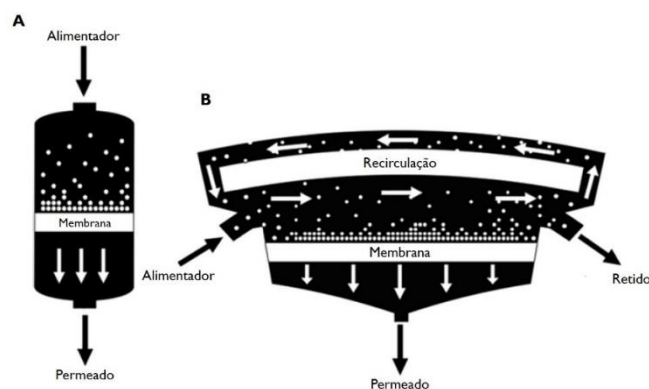


Figura 2 – Métodos de filtração membranar – (A) Filtração terminal. (B) Filtração de fluxo cruzado. (Adaptado de Segura, Kamen e Garnier, 2011)

Geralmente, após a clarificação, procede-se a uma concentração do vetor que permite reduzir o volume de trabalho total e conseqüentemente o tamanho dos equipamentos necessários para as operações subsequentes. Esta concentração inicial do vetor é especialmente vantajosa quando os rAAVs se encontram no sobrenadante, uma vez que estes se encontram diluídos no meio (Robert *et al.*, 2017; Segura, Kamen e Garnier, 2011). Estes passos comuns são não específicos, servindo essencialmente para remover células, detritos celulares e água, obtendo assim um grau grosseiro de purificação. No entanto, na produção de rAAVs para uso clínico, é obrigatório que o grau de pureza seja superior, sendo necessários processos de purificação adicionais, com maior especificidade e que permitam atingir o grau de pureza desejado (Segura, Kamen e Garnier, 2011).

A escolha das técnicas de purificação é um processo multifatorial e dependente não só da estratégia de produção utilizada (que influencia na quantidade e qualidade das impurezas), mas também do grau de pureza e título do vetor no produto final, das características físicas, químicas e de estabilidade dos rAAVs e, por fim, da adequação dos métodos de purificação para a transposição de escala (Robert *et al.*, 2017; Segura, Kamen e Garnier, 2011). Há portanto necessidade de identificar e sistematizar estas variáveis através de ferramentas de avaliação de risco da qualidade, como por exemplo, através de uma abordagem de *Quality by Design* (QbD), que se inicia através da predefinição de objetivos e enfatiza o entendimento do produto e do processo, bem como do controlo do processo (Adams, Bak e Tustian, 2020; ICH, 2009).

Deste modo e segundo uma abordagem QbD, antes da escolha das técnicas de purificação é necessária a escolha do Perfil de Qualidade Alvo do Produto final (QTPP), que é um resumo prospetivo das características de qualidade do medicamento que idealmente deverão ser

alcançadas de forma a assegurar a qualidade desejada, tendo em consideração a segurança e a eficácia do medicamento. Consequentemente, estes ideais de qualidade não têm apenas em vista o grau de pureza e o título de vetor no produto final, mas também a finalidade (utilização *in vitro*, *ex vivo*, ou *in vivo*) e a via de administração no caso de aplicações *in vivo*. Assim após a definição do QTPP é indispensável proceder à determinação dos Atributos Críticos de Qualidade (CQAs), que poderão ser atributos físicos, químicos, biológicos ou microbiológicos (Adams, Bak e Tustian, 2020; ICH, 2009). Um desses CQAs poderá ser a presença de impurezas e agentes potencialmente patogénicos provenientes dos processos de produção e de purificação que poderão ser tóxicos para as células, ou para o organismo, desencadeando reações imunológicas e inflamatórias nocivas. Torna-se então imprescindível que durante uma avaliação teórica da qualidade se tenham em consideração estas possíveis impurezas (Adams, Bak e Tustian, 2020; ICH, 2009; Qu *et al.*, 2015). Adicionalmente, o QTPP e as CQAs de produtos contendo vetores virais destinados a ensaios clínicos ou ao uso clínico necessitam de ir ao encontro das exigências das autoridades regulamentares. No **ANEXO 4** encontram-se elencadas as impurezas mais comumente associadas aos rAAVs, bem como, as especificações impostas tanto pela EMA, como pela FDA (European Commission, 2017; European Medicines Agency, 2010, 2018, 2019; Robert *et al.*, 2017; Segura, Kamen e Garnier, 2011). Posteriormente à identificação do CQAs, deve proceder-se a uma avaliação do risco relacionando o impacto das características críticas das matérias primas (CMAs) (resultado da produção e reagentes utilizados durante a purificação) e o impacto das características/parâmetros críticos do processo (CPPs) com as CQAs. O produto desta avaliação do risco poderá ser a definição de *Design Space*, que é a combinação e interação multidimensional das variáveis (CMAs e CPPs) que demonstraram ter impacto nas CQAs. O *Design Space* permite através do entendimento do processo como um todo facilitar a transposição de escala da purificação (Adams, Bak e Tustian, 2020; Okada *et al.*, 2009).

Um outro aspeto a ter em consideração aquando da seleção das técnicas de purificação é a caracterização completa dos rAAVs, uma vez que as técnicas mais avançadas e específicas de purificação se encontram intrinsecamente ligadas às propriedades físicas e químicas dos rAAVs, auxiliando assim no desenho de um esquema de purificação adequado. Estas características incluem, mas não estão limitadas ao tamanho da partícula viral, a densidade do vetor, a carga iónica de superfície do rAAV e a sua variação com o pH (Qu *et al.*, 2015; Segura, Kamen e Garnier, 2011). Por outro lado, as técnicas de purificação têm de garantir a estabilidade do vetor evitando a sua inativação, uma vez que, na terapia génica, é extremamente importante que os rAAVs mantenham a sua atividade biológica intacta, sob

prejuízo da diminuição da sua potência *in vivo*. Em geral, é relevante a escolha de um esquema de purificação que contenha o mínimo de alterações significativas na composição e no pH do tampão (Segura, Kamen e Garnier, 2011).

Por fim, durante a seleção das técnicas de purificação é necessário ter em consideração que nem todos os métodos são suscetíveis de transposição de escala. A título de exemplo, os esquemas de purificação à escala laboratorial utilizam recorrentemente métodos baseados em ultracentrifugação e gradientes de densidade, recorrendo ao uso de cloreto de cério (CsCl) ou de iodixanol. Embora sejam métodos universais, isto é, não dependem do serotipo do vetor, e permita a remoção de cápsides vazias, são inadequados para produção à larga escala, uma vez que são demorados e laboriosos (Ayuso, Mingozzi e Bosch, 2010; Blessing *et al.*, 2019; Naso *et al.*, 2017; O’Riordan *et al.*, 2000; Qu *et al.*, 2015; Robert *et al.*, 2017; Segura, Kamen e Garnier, 2011; Zolotukhin, 2005). Frequentemente, resultante da purificação por ultracentrifugação por gradientes de densidade surgem impurezas que são conhecidas por causar inflamação no local de administração (Blouin *et al.*, 2004). Assim, na produção em larga escala, os métodos de purificação utilizam preferencialmente tecnologias como a microfiltração membranar e cromatografia (Segura, Kamen e Garnier, 2011). O **ANEXO 5** resume alguns esquemas frequentemente utilizados na purificação de rAAVs, encontrando-se exposto o grau de pureza obtido, bem como, a sua transponibilidade de escala (Qu *et al.*, 2015).

4.1. Cromatografia

A cromatografia é uma técnica separativa que permite o fracionamento seletivo de produtos biológicos tendo em conta as interações e/ou propriedades dos diferentes constituintes da mistura com o suporte cromatográfico (fase estacionária) e com o eluente (fase móvel). As diferentes técnicas cromatográficas assentam todas neste princípio comum, contudo, exploram interações e/ou propriedades diferentes. O primeiro constituinte a eluir (sair da coluna cromatográfica) é o que sofre menos interações com o suporte cromatográfico e os restantes saem por ordem crescente de interações até ao constituinte que sofre mais interações, que será o último a ser eluído. As condições usadas durante a eluição dos vetores da coluna cromatográfica permitem manter a atividade biológica do vetor, excetuando os casos em que as interações estabelecidas são irreversíveis, ligações antigénio-anticorpo, sendo por isso necessárias condições mais drásticas de eluição (por exemplo baixo pH, elevadas concentrações de sais ou uso de agentes desnaturantes (Segura, Kamen e Garnier, 2011).

A cromatografia é o método de eleição para o fracionamento seletivo de biomoléculas no contexto industrial, uma vez que apresenta especificidade, reprodutibilidade, garante a

estabilidade do vetor, é facilmente transponível de escala, apresenta capacidade para o automatismo e ainda capacidade de processamento asséptico, indo ao encontro dos requisitos das agências regulamentares e das GMPs (Ayuso, Mingozi e Bosch, 2010; European Commission, 2017; Qu *et al.*, 2015; Robert *et al.*, 2017; Segura, Kamen e Garnier, 2011; Zolotukhin, 2005).

De forma a atingir os níveis de pureza requeridos para a aplicações *in vivo*, são geralmente necessárias duas cromatografias, sendo que os melhores resultados são obtidos quando são utilizadas cromatografias que têm por base interações e/ou propriedades diferentes (por exemplo, uma cromatografia com base na carga iónica de superfície e outra com base na hidrofobicidade). Visto que alguns dos eluentes usados na cromatografia não são compatíveis com a administração *in vivo*, pode ser necessário um passo adicional de purificação, tal como a dialise ou ultra/diafiltração (Segura, Kamen e Garnier, 2011).

4.1.1. Cromatografia de Exclusão Molecular

Os Vírus Adeno-Associados apresentam um tamanho que varia entre 22 e 26 nm (Wang, Tai e Gao, 2019; Warnock, Daigre e Al-Rubeai, 2011), sendo o tamanho dos AAV significativamente superior a impurezas proteicas (< 5nm), inferior ao dos Adenovírus (cerca de 80 nm) (Qu *et al.*, 2015; Segura, Kamen e Garnier, 2011) e inferior às nucleocápsides de Baculovírus (50 nm x 300 nm) (Penaud-Budloo *et al.*, 2018). Adicionalmente, e tomando como exemplo o AAV do serotipo 2, de acordo com estimativas preliminares, a massa total da cápside proteica do AAV2 é mais de 600 kDa. O rAAV é aproximadamente 170 kDa mais pesado do que a cápside de AAV2 vazia, uma vez que o rAAV contém cerca de 4,7 kb de DNA de cadeia simples no seu interior. Assim sendo, os rAAVs podem ser separados adequadamente das cápsides vazias, das proteínas, dos Ad e das nucleocápsides de Baculovírus utilizando a Cromatografia de Exclusão de Molecular (SEC) (Qu *et al.*, 2015; Smith, Ding e Kotin, 2003; Zolotukhin, 2005).

A SEC também conhecida como a cromatografia de gel-filtração é um método universal para separar biomoléculas com base no seu tamanho/peso, sendo possível separar os rAAVs de outras impurezas de tamanho inferior/superior (Burova e Ioffe, 2005; Qu *et al.*, 2015). Por exemplo, a coluna Superdex[®] 200 tem um limite de exclusão de aproximadamente $1,3 \times 10^6$ Da para proteínas globulares, que é um peso significativamente inferior ao dos rAAVs, sendo excluídos do Superdex[®]. A maior parte das proteínas celulares são retidas pela coluna e sendo apenas eluídas com volumes elevados (Burova e Ioffe, 2005; Qu *et al.*, 2015). A atividade biológica dos rAAVs é preservada e não existem perdas significativas dos rAAVs, uma vez que estes não interagem com a fase estacionária (Qu *et al.*, 2015). A SEC pode ser utilizada ainda

no processo de troca de tampão (Robert *et al.*, 2017), contudo, esta cromatografia é considerada como tendo baixa resolução uma vez que é necessário que exista uma diferença de pelo menos 10% no tamanho/peso para que haja separação efetiva. Portanto, esta tecnologia é reservada frequentemente para um processo de “polimento” na produção em grande escala (Burova e Ioffe, 2005; Kotin, 2011; Robert *et al.*, 2017; Segura, Kamen e Garnier, 2011).

4.1.2. Ponto Isoelétrico (*pI*) dos AAVs e Cromatografia de Troca Iônica (IEX)

O Ponto Isoelétrico (*pI*) corresponde ao valor de pH no qual a carga total de uma proteína ou vírus é igual a zero. Quando o pH da solução é igual ao *pI* da biomolécula dissolvida, esta apresenta o seu mínimo de solubilidade o que leva à sua precipitação. Para valores de pH inferiores ao *pI*, as proteínas apresentam uma carga total positiva e para valores de pH superiores ao *pI*, o balanço de cargas total é negativo (Qu *et al.*, 2015). A cápside proteica dos vetores AAVs apresenta um ponto isoelétrico, no qual o balanço das cargas de todas as proteínas é igual a zero. Adicionalmente, como os serotipos apresentam estruturas da cápside dissemelhantes, os vários serotipos apresentam um ponto isoelétrico distinto, sendo por isso necessária a otimização por serotipo (Clément e Grieger, 2016; Robert *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2012). Distintamente da maioria das impurezas, os rAAVs apresentam múltiplos locais de ligação a cátions fazendo da Cromatografia de Troca Aniônica (AEX) uma técnica amplamente utilizada na purificação de rAAVs (Qu *et al.*, 2015).

Existem atualmente quatro métodos cromatográficos que fazem uso do Ponto Isoelétrico dos rAAVs, sendo eles a Cromatografia de Troca Aniônica (AEX) e a Cromatografia de Troca Catiônica (CEX) que utilizam como suporte cromatográfico resinas. Por outro lado, existem as membranas adsorptivas de troca iônica (*Dual Ion-exchange Adsorptive Membranes – DIAM*), que utiliza membranas adsorventes, apresentando uma menor distância de difusão, e permitindo assim uma diminuição do tempo até ao equilíbrio, da aplicação de amostra e da eluição (Okada *et al.*, 2009; Qu *et al.*, 2015). Por fim, no meio de interação convectiva (*Convective Interaction Media – CIM*), em que o suporte cromatográfico são monólitos, estes apresentam poros de diferentes tamanhos, permitindo assim uma redução da pressão necessária quando comparada com colunas cromatográficas *packed-bed*. Os monólitos poderão ainda apresentar grupos funcionais, como por exemplo metacrilatos, aumentando a capacidade separativa (Adams, Bak e Tustian, 2020; Qu *et al.*, 2015).

4.1.2.1. Cromatografia de Troca Aniônica (AEX) e Cromatografia de Troca Catiônica (CEX)

O principal desafio das técnicas de purificação é a separação de impurezas com uma estrutura relacionada com a biomolécula de interesse, neste caso, são as cápsides de AAV vazias (sem o transgene), quando comparadas com outras impurezas não relacionadas estruturalmente, como é o caso de proteínas e ácidos nucleicos, as cápsides de AAV vazias são mais difíceis de separar dos rAAVs. No entanto, recorrendo a AEX e a CEX é possível separar as cápsides vazias dos rAAVs através das diferenças nos pI que ambas apresentam (Burova e Ioffe, 2005; Nass *et al.*, 2018; Qu *et al.*, 2015; Robert *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019). O valor médio calculado do pI das cápsides de AAV de vazias (pI_E) é cerca de 6,3. O valor médio calculado do pI de cápsides de rAAV que contêm genoma (pI_F) é aproximadamente 5,9 (**Figura 3B**) (Adams, Bak e Tustian, 2020; Qu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019). Quando o pH da solução é superior ao pI_E , a AEX deve ser escolhida, uma vez que ambas as populações de AAVs vão apresentar cargas negativas e a coluna cromatográfica apresenta cargas positivas, neste caso as cápsides vazias vão eluir em primeiro lugar, sendo seguidas pelos rAAVs, após um aumento da força iónica do meio (**Figura 3C**). No caso contrário, quando o pH apresenta um valor inferior ao pI_F , ambas as populações de AAVs estão positivamente carregadas, sendo a CEX favorecida, neste caso, os rAAVs vão ser eluídos primeiramente, seguidos das cápsides vazias (**Figura 3A**) (Qu *et al.*, 2015).

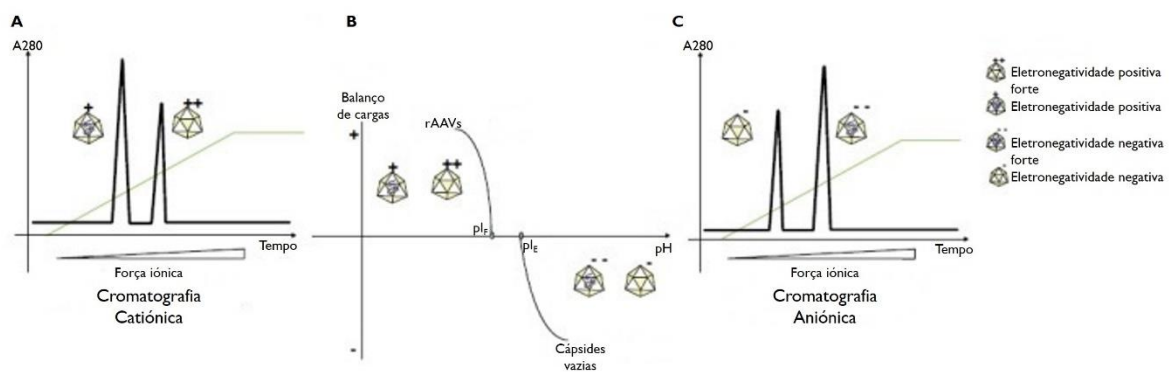


Figura 3 – Separação de rAAVs através de cromatografia de troca iónica. (A) Separação dos rAAVs e das cápsides vazias por Cromatografia de Troca Catiônica (CEX). O rAAV encontra-se positivamente carregado para valores de pH inferiores ao pI_F . A eletronegatividade das cápsides vazias é mais forte do que a dos rAAVs. O rAAV irá ser eluído primeiramente, seguido pelas cápsides vazias com o aumento da força iónica. **(B)** Os pontos isoelétricos (pI) dos rAAVs e das cápsides vazias. A média calculada do pI da cápside do AAV com genoma (pI_F) é inferior que o valor das cápsides vazias (pI_E). **(C)** Separação dos rAAVs e das cápsides vazias por Cromatografia de Troca Aniônica (AEX). As cápsides vazias encontram-se negativamente carregadas quando o pH é superior a pI_E . A eletronegatividade das cápsides vazias é inferior que a dos rAAVs. As cápsides vazias irão ser eluídas primeiramente, sendo seguidas pelo rAAV com o aumento da força iónica (Adaptado de Qu *et al.*, 2015).

A Cromatografia de Troca Iônica permite a obtenção de purezas superiores a 98% quando utilizados dois a três suportes cromatográficos diferentes, apresentando reprodutibilidade entre os lotes. Uma vez que o processo de separação é dinâmico, as interações são reversíveis, é possível manter a atividade do rAAV. Adicionalmente os suportes cromatográficos podem ser regenerados permitindo múltiplas utilizações. Contudo, os suportes não são universais, isto é, podem não ser adequados aos vários serotipos, sendo por isso necessário a seleção do suporte em linha com as propriedades dos diferentes serotipos. Os suportes cromatográficos após vários ciclos de utilização/regeneração perdem resolução, levando ao surgimento de picos de interferência. Importa ainda referir que o processo de regeneração utiliza condições drásticas e caso o suporte seja inadequadamente acondicionado pode contribuir para o surgimento de contaminações bacterianas (Qu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2012).

4.1.3. Estrutura da cápside e Cromatografia de Afinidade (AC)

A Cromatografia de Afinidade separa as biomoléculas com base em interações específicas entre a molécula alvo e um ligando que se encontra acoplado ao suporte cromatográfico. Estas interações podem ser por ligações de hidrogénio, forças de van der Waals, interações electrostáticas e hidrofóbicas. A eluição das partículas virais a partir da coluna pode ser alcançada simplesmente por reversão da interação, esta pode ser específica quando usado um ligando competitivo ou não específica quando alterado o pH ou a força iónica do tampão de eluição. Devido à elevada seletividade e eficiência, a cromatografia de afinidade tem o potencial de separar os rAAVs com o uso de um passo único de cromatografia, permitindo assim a minimização das perdas quando comparada as esquemas com múltiplos passos (Burova e Ioffe, 2005; Segura, Kamen e Garnier, 2011).

A estrutura da cápside proteica dos AAVs é responsável pela ligação dos AAVs à célula alvo (Balakrishnan e Jayandharan, 2014; Naso *et al.*, 2017). Os AAVs apresentam vários serotipos, que por sua vez apresentam diferentes tropismos tecidulares (Balakrishnan e Jayandharan, 2014; Grieger e Samulski, 2012; Li e Samulski, 2020; Naso *et al.*, 2017; Wang, Tai e Gao, 2019; Warnock, Daigre e Al-Rubeai, 2011), sendo esta diferença de tropismo causada pelas diferenças na estrutura da cápside que os serotipos de AAV apresentam. Portanto, a AC tira proveito dessas interações específicas com a cápside de forma a separar os rAAVs das restantes impurezas (Clément e Grieger, 2016; Naso *et al.*, 2017).

Surgiu assim, a Cromatografia de Afinidade à Heparina (HEAC) que faz uso da interação que alguns serotipos apresentam com a Heparina (Naso *et al.*, 2017; Robert *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2012; Zolotukhin, 2005; Zolotukhin *et al.*, 1999). A Cromatografia de Imunoafinidade (IAC) utiliza uma interação altamente específica e forte de antígeno-anticorpo, sendo necessários

anticorpos monoclonais para cada rAAV. Adicionalmente, de forma a quebrar a ligação forte são necessárias condições drásticas e desnaturantes (Kotin, 2011; Qu *et al.*, 2015; Robert *et al.*, 2017). A Cromatografia de Afinidade a Metais Imobilizados (IMAC), que através de tecnologias de DNA recombinante conseguem associar elementos metálicos em proteínas, contudo, esta associação a proteínas da cápside pode levar à perda do tropismo dos rAAVs (Burova e Ioffe, 2005; Qu *et al.*, 2015). Por fim, na Cromatografia de Interação Hidrofóbica (HIC), que tira proveito dos hidrofobicidade das partículas virais, estas irão interagir com o suporte cromatográfico. Uma vez que são necessárias elevadas quantidades de sal na HIC, esta pode ser utilizada após a IEX, visto que esta última utiliza elevadas concentrações de sal durante a eluição dos vetores (Burova e Ioffe, 2005; Qu *et al.*, 2015; Robert *et al.*, 2017). No entanto, este método cromatográfico apresenta baixa resolução (Qu *et al.*, 2015).

4.1.3.1. Cromatografia de afinidade à Heparina (HEAC)

Os AAV2 usam com recetor primário o proteoglicano sulfato de heparina (HSPG). (Burova e Ioffe, 2005; Qu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2012; Zolotukhin, 2005). Consequentemente, a Cromatografia de Afinidade à Heparina é usada com sucesso para a purificação em grande escala de rAAV2, uma vez que estes conseguem estabelecer uma interação com a Heparina presente no suporte cromatográfico (Burova e Ioffe, 2005; Qu *et al.*, 2015; Robert *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2012). No entanto, como presente no **ANEXO I**, nem todos os serotipos usam a proteoglicano sulfato de heparina como recetor, logo esta cromatografia não é aplicável a todos serotipos, sendo bem sucedida para a purificação de AAV2, AAV3 e AAV6 (Robert *et al.*, 2017).

Similarmente à Cromatografia de Afinidade à Heparina, surgiram outras cromatografias que assentam no mesmo princípio, mas fazem uso de recetores diferentes reconhecidos pelos outros serotipos de rAAVs, no **ANEXO I** é possível observar que recetores cada serotipo usa, permitindo fazer uma escolha racional. Assim surgiu a cromatografia que utiliza resíduos de Ácido Siálico da mucina, que consegue separar os AAV1, AAV4, AAV5 e AAV6 (Auricchio *et al.*, 2001; Burova e Ioffe, 2005; Robert *et al.*, 2017; Walters *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2012; Zolotukhin, 2005).

4.2. Filtração Tangencial

A Filtração Tangencial (TFF) é um processo essencial na purificação de rAAVs, uma vez que permite a concentração do produto, permitindo a redução de 2 a 50 vezes do volume inicial (Qu *et al.*, 2015; Robert *et al.*, 2017). Na concentração de rAAVs, a escolha do tamanho de poro da membrana de filtração é essencial de forma a poder-se separar os rAAVs de outros compostos com tamanho molecular inferior. Por exemplo, de forma a enriquecer a fração

retida com rAAVs (massa superior a 600 kDa), a utilização de uma membrana com um *Cut-Off* de peso molecular (MWCO) de 100 kDa, permite que os sais, água e proteínas de baixo peso molecular passem pela membrana, ficando os rAAVs retidos, aumento assim a concentração dos rAAVs no retido (**Figura 4**) (Qu et al., 2015). Por outro lado, a TFF pode ser utilizada para separar células ou detritos celulares dos rAAVs, utilizado para este efeito uma membrana com um MWCT de 500-1000 kDa, ficando as células retidas e permitindo a recuperação dos rAAVs no permeado. A TFF pode então ser adaptada a qualquer fase do processo de purificação, após a seleção da membrana com o MWCO adequando para a finalidade. Adicionalmente a TFF pode ser utilizada para alterar o tampão, revelando-se importante para a remoção de solventes incompatíveis com a administração *in vivo* (Burova e Ioffe, 2005; Kotin, 2011; Qu et al., 2015; Robert et al., 2017).

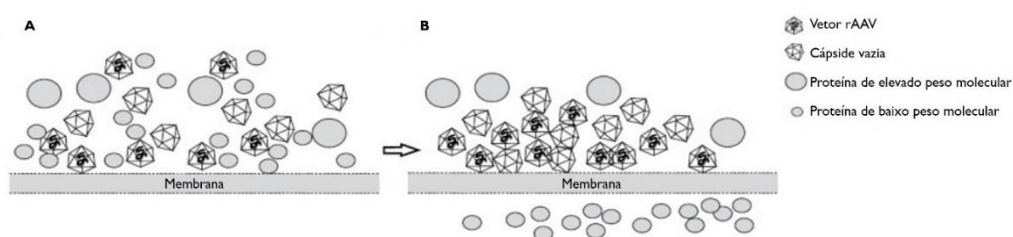


Figura 4 – Concentração de rAAVs através de Filtração Tangencial. (A) O lisado celular contém rAAVs, cápsides vazias, proteínas de elevado peso molecular e proteínas de baixo peso molecular. (B) Após a TFF, as proteínas de baixo peso molecular passam pela membrana, enquanto que o vetor e outras proteínas de elevado peso molecular são concentradas (Adaptado de Qu et al., 2015).

4.3. Ideias a reter da Purificação

A seleção do esquema de purificação de rAAVs para a transposição de escala é um processo altamente dependente não só das características do vetor, bem como da estratégia utilizada durante a multiplicação do vetor, do Perfil de Qualidade Alvo do Produto final em linha com as exigências regulamentares e GMPs e a ainda da adequação dos métodos à larga escala. No entanto, é necessário encontrar o equilíbrio entre a pureza e o título, visto que cada passo da purificação acarreta potenciais perdas do vetor. Normalmente, e de forma a alcançar o grau de pureza desejado, é necessário recorrer à combinação de vários passos de purificação. Os métodos de purificação que utilizam interações mais específicas permitem geralmente a obtenção de graus de pureza superiores comparativamente às técnicas mais universais que assentam em princípios como o tamanho.

Conclusão

Os Vírus Adeno-Associados como vetores para a terapia gênica têm demonstrado, consecutivamente, serem uma abordagem promissora e com elevada potencialidade tanto no tratamento de doenças genéticas hereditárias como no tratamento de doenças genéticas adquiridas, possibilitando uma cura ou melhoria significativa da qualidade de vida dos doentes, como comprovado pelos medicamentos atualmente aprovados.

Os vários marcos e avanços na história dos AAVs como vetores foram somente exequíveis devido ao entendimento da sua biologia, desde a sua identificação como um contaminante de preparações de adenovírus, passando pela descoberta dos vários serotipos e tropismos, até à completa caracterização tanto do genoma como das proteínas da cápside. Todo este conhecimento revelou-se indispensável para o desenvolvimento e produção dos rAAVs.

Atualmente, e dentro das plataformas de produção disponíveis, sobressaem três, a transfeção transiente de células HEK293 em suspensão, o sistema de expressão de vetores através da utilização de baculovírus e as linhas celulares estáveis de mamífero, no entanto, nenhuma destas plataformas se apresenta isenta de desvantagens nem se pode considerar como “a plataforma de eleição” para a produção à larga escala.

Por um lado, na produção através da transfeção transiente de células HEK293, a principal desvantagem é a eficácia da transfeção dos plasmídeos, um processo altamente dependente do número e do rácio de plasmídeos utilizados, da quantidade de reagente utilizado para a transfeção, bem como da composição do meio de cultura, tornando assim indispensável a otimização destas variáveis de forma a obter títulos elevados.

Por outro lado, no que diz respeito à produção pelo sistema de expressão de vetores através da utilização de baculovírus, salienta-se que, não obstante a transponibilidade volumétrica, o processo de gerar e caracterizar totalmente os baculovírus é moroso e estes apresentam ainda uma elevada instabilidade genética que pode levar a variações no produto final. Para além disso, destaca-se que os rAAVs produzidos por este sistema apresentam uma menor infecciosidade que os rAAVs produzidos por transfeção.

Por fim, na produção com linhas celulares produtoras estáveis de mamífero, a maior parte dos elementos genéticos necessários encontram-se integrados no genoma das células, o que torna esta plataforma altamente específica e pouco flexível, sendo necessário a geração de uma nova linha celular para cada rAAV diferente. Adicionalmente, importa salientar a utilização de rHSV ou Ad que terão de ser eliminados, posteriormente, durante a purificação.

Na produção de rAAVs para o uso clínico, um passo de extrema importância é a purificação, uma vez que é durante esta etapa que vamos concentrar o rAAV e eliminar as impurezas provenientes do processo de produção. Por conseguinte, destaca-se a íntima relação entre os processos de produção e purificação. Para além disso, os processos de purificação baseiam-se nas diferenças de propriedades que os rAAVs e as impurezas demonstram, sendo a cromatografia a técnica geralmente selecionada para tirar proveito dessas diferenças, uma vez que apresenta elevada especificidade e permite a obtenção de resultados reprodutíveis.

Em suma, por muito conveniente e vantajoso que fosse, nem todos os métodos de produção e purificação apresentam uma transponibilidade linear e, como tal, muitas vezes um ligeiro aumento na produção resulta num aumento imensurável de custos ou de carga de trabalho. Deste modo, o processo de transposição de escala da produção de AAVs tem de ser considerado desde o desenvolvimento precoce do produto, de forma a delinear uma estratégia capaz de comportar as crescentes exigências na quantidade. O *Quality by Design* é uma abordagem que poderá beneficiar positivamente a transposição de escala da Produção de rAAVs, uma vez que está na sua génese a sistematização e o conhecimento do processo como um todo, sendo aplicável não só à purificação, mas também à produção dos vetores. Acresce ainda referir que, com o objetivo de produção de rAAVs para o uso clínico, é imprescindível que no processo de transposição de escala se tenha em consideração não só todas as exigências regulamentares, mas também o cumprimento das GMPs.

Bibliografia

ADAMS, Benjamin; BAK, Hanne; TUSTIAN, Andrew D. - Moving from the bench towards a large scale, industrial platform process for adeno-associated viral vector purification. **Biotechnology and Bioengineering**. ISSN 0006-3592. (2020). doi: 10.1002/bit.27472.

APONTE-UBILLUS, Juan Jose *et al.* - Molecular design for recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector production. **Applied Microbiology and Biotechnology**. ISSN 0175-7598. 102:3 (2018) 1045–1054. doi: 10.1007/s00253-017-8670-1.

ATCHISON, Robert W.; CASTO, Bruce C.; HAMMON, William McD. - Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. **American Association for the Advancement of Science**. (1965).

AURICCHIO, Alberto *et al.* - A Single-Step Affinity Column for Purification of Serotype-5 Based Adeno-associated Viral Vectors. **Molecular Therapy**. ISSN 15250016. 4:4 (2001) 372–374. doi: 10.1006/mthe.2001.0462.

AYUSO, Eduard; MINGOZZI, Federico; BOSCH, Fatima - Production, Purification and Characterization of Adeno-Associated Vectors. **Current Gene Therapy**. ISSN 15665232. 10:6 (2010) 423–436. doi: 10.2174/156652310793797685.

BALAKRISHNAN, Balaji; JAYANDHARAN, Giridhara - Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Used in Gene Therapy. **Current Gene Therapy**. ISSN 15665232. 14:2 (2014) 86–100. doi: 10.2174/1566523214666140302193709.

BLESSING, Daniel *et al.* - Scalable Production of AAV Vectors in Orbitally Shaken HEK293 Cells. **Molecular Therapy - Methods & Clinical Development**. ISSN 23290501. 13: (2019) 14–26. doi: 10.1016/j.omtm.2018.11.004.

BLOUIN, Véronique *et al.* - Improving rAAV production and purification: towards the definition of a scaleable process. **The Journal of Gene Medicine**. ISSN 1099-498X. 6:S1 (2004) S223–S228. doi: 10.1002/jgm.505.

BURGER, Corinna *et al.* - Recombinant AAV Viral Vectors Pseudotyped with Viral Capsids from Serotypes 1, 2, and 5 Display Differential Efficiency and Cell Tropism after Delivery to Different Regions of the Central Nervous System. **Molecular Therapy**. ISSN 15250016. 10:2 (2004) 302–317. doi: 10.1016/j.ymthe.2004.05.024.

BUROVA, E.; IOFFE, E. - Chromatographic purification of recombinant adenoviral and adeno-associated viral vectors: methods and implications. **Gene Therapy**. ISSN 0969-7128. 12:S1

(2005) S5–S17. doi: 10.1038/sj.gt.3302611.

CECCHINI, S.; NEGRETE, A.; KOTIN, R. M. - Toward exascale production of recombinant adeno-associated virus for gene transfer applications. **Gene Therapy**. ISSN 0969-7128. 15:11 (2008) 823–830. doi: 10.1038/gt.2008.61.

CHEN, Yong Hong; KEISER, Megan S.; DAVIDSON, Beverly L. - Viral Vectors for Gene Transfer. **Current Protocols in Mouse Biology**. ISSN 21612617. 8:4 (2018) e58. doi: 10.1002/cpmo.58.

CHEN, Yong Hong; KEISER, Megan S.; DAVIDSON, Beverly L. - Adeno-Associated Virus Production, Purification, and Titering. **Current Protocols in Mouse Biology**. ISSN 21612617. 8:4 (2018) e56. doi: 10.1002/cpmo.56.

CLÉMENT, Nathalie; GRIEGER, Joshua C. - Manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors for clinical trials. **Molecular Therapy - Methods & Clinical Development**. ISSN 23290501. 3: (2016) 16002. doi: 10.1038/mtm.2016.2.

COLLINS, Mary; THRASHER, Adrian - Gene therapy: progress and predictions. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**. ISSN 0962-8452. 282:1821 (2015) 20143003. doi: 10.1098/rspb.2014.3003.

CONWAY, J. E. *et al.* - High-titer recombinant adeno-associated virus production utilizing a recombinant herpes simplex virus type I vector expressing AAV-2 Rep and Cap. **Gene Therapy**. ISSN 0969-7128. 6:6 (1999) 986–993. doi: 10.1038/sj.gt.3300937.

DELAFOSSÉ, Laurence; XU, Ping; DUROCHER, Yves - Comparative study of polyethylenimines for transient gene expression in mammalian HEK293 and CHO cells. **Journal of Biotechnology**. ISSN 01681656. 227: (2016) 103–111. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.04.028.

Directiva 2009/120/CE da Comissão - Medicamentos De Terapia Avançada - **Jornal Oficial da União Europeia**. (2009).

DUAN, Dongsheng; YUE, Yongping; ENGELHARDT, John F. - Expanding AAV Packaging Capacity with Trans-splicing or Overlapping Vectors: A Quantitative Comparison. **Molecular Therapy**. ISSN 15250016. 4:4 (2001) 383–391. doi: 10.1006/mthe.2001.0456.

EARLEY, Lauriel F. *et al.* - Adeno-associated Virus (AAV) Assembly-Activating Protein Is Not an Essential Requirement for Capsid Assembly of AAV Serotypes 4, 5, and 11. **Journal of Virology**. ISSN 0022-538X. 91:3 (2017) 1–21. doi: 10.1128/JVI.01980-16.

EUROPEAN COMMISSION - Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products. **European Commission Journal**. 4:November (2017).

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - Reflection paper on quality, non-clinical and clinical issues related to the development of recombinant adeno-associated viral vectors. **EMA/CHMP/GTWP/587488/2007 Rev. 1**. 44:June (2010).

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Public Assessment Report (EPAR): Glybera** (2012) [Consult. 2 mai. 2020]. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/002145/WC500135476.pdf

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **RCM:Glybera** (2017). [Consult. 2 mai. 2020]. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/glybera-epar-product-information_pt.pdf

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Public Assessment Report (EPAR): Luxturna** (2018). [Consult. 2 mai. 2020]. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/luxturna-epar-public-assessment-report_en.pdf

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. **EMA/CAT/80183/2014**. 44:March (2018).

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - Guideline on quality, non-clinical and clinical requirements for investigational advanced therapy medicinal products in clinical trials. **EMA/CAT/852602/2018**. 44:January (2019) 1–53.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **RCM: Luxturna** (2020). [Consult. 2 mai. 2020]. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/luxturna-epar-product-information_pt.pdf

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Public Assessment Report (EPAR): Zolgensma** (2020). [Consult. 6 jun. 2020]. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zolgensma-epar-public-assessment-report_en.pdf

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **RCM: Zolgensma** (2020). [Consult. 6 jun. 2020]. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zolgensma-epar-product-information_pt.pdf

FELBERBAUM, Rachael S. - The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. **Biotechnology Journal**.

ISSN 18606768. 10:5 (2015) 702–714. doi: 10.1002/biot.201400438.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - **Luxturna** (2018). [Consult. 2 mai. 2020]. Disponível em: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/luxturna>

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - **Zolgensma** (2020). [Consult. 2 mai. 2020]. Disponível em: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/zolgensma>

FOUST, Kevin D. *et al.* - Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. **Nature Biotechnology**. ISSN 1087-0156. 28:3 (2010) 271–274. doi: 10.1038/nbt.1610.

GALIBERT, Lionel; MERTEN, Otto-Wilhelm - Latest developments in the large-scale production of adeno-associated virus vectors in insect cells toward the treatment of neuromuscular diseases. **Journal of Invertebrate Pathology**. ISSN 00222011. 107:SUPPL. (2011) S80–S93. doi: 10.1016/j.jip.2011.05.008.

GONÇALVES, Giulliana Augusta Rangel; PAIVA, Raquel De Melo Alves - Gene therapy: advances, challenges and perspectives. **Einstein (São Paulo)**. ISSN 1679-4508. 15:3 (2017) 369–375. doi: 10.1590/s1679-45082017rb4024.

GOSWAMI, Reena *et al.* - Gene Therapy Leaves a Vicious Cycle. **Frontiers in Oncology**. ISSN 2234-943X. 9:APR (2019). doi: 10.3389/fonc.2019.00297.

GRIEGER, Joshua C.; SAMULSKI, R. Jude - Adeno-Associated Virus Vectorology, Manufacturing, and Clinical Applications. Em **Methods in Enzymology**v. 507. (2012) p. 229–254.

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**. ISSN 15250016. 24:2 (2016) 287–297. doi: 10.1038/mt.2015.187.

HIGH, Katherine A.; RONCAROLO, Maria G. - Gene Therapy. **New England Journal of Medicine**. ISSN 0028-4793. 381:5 (2019) 455–464. doi: 10.1056/NEJMr1706910.

HUANG, Xiping *et al.* - AAV2 production with optimized N/P ratio and PEI-mediated transfection results in low toxicity and high titer for in vitro and in vivo applications. **Journal of Virological Methods**. ISSN 01660934. 193:2 (2013) 270–277. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.06.008.

ICH - ICH Harmonised Tripartite Guideline: Pharmaceutical Development: Q8 (R2)

JOSHI, Pranav R. H. *et al.* - Achieving High-Yield Production of Functional AAV5 Gene Delivery Vectors via Fedbatch in an Insect Cell-One Baculovirus System. **Molecular Therapy - Methods & Clinical Development**. ISSN 23290501. 13:2019) 279–289. doi: 10.1016/j.omtm.2019.02.003.

KAY, Mark A.; LIU, Dexi; HOOGERBRUGGE, Peter M. - Gene Therapy. **New England Journal of Medicine**. 94:1997) 12744–12746.

KOLB, Stephen J.; KISSEL, John T. - Spinal Muscular Atrophy. **Neurologic Clinics**. ISSN 07338619. 33:4 (2015) 831–846. doi: 10.1016/j.ncl.2015.07.004.

KONDRATOV, Oleksandr *et al.* - Direct Head-to-Head Evaluation of Recombinant Adeno-associated Viral Vectors Manufactured in Human versus Insect Cells. **Molecular Therapy**. ISSN 15250016. 25:12 (2017) 2661–2675. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.08.003.

KOTIN, R. M. - Large-scale recombinant adeno-associated virus production. **Human Molecular Genetics**. ISSN 0964-6906. 20:R1 (2011) R2–R6. doi: 10.1093/hmg/ddr141.

LI, Chengwen; SAMULSKI, R. Jude - Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. **Nature Reviews Genetics**. ISSN 1471-0056. 21:4 (2020) 255–272. doi: 10.1038/s41576-019-0205-4.

LONGO, Patti M. *et al.* - Transient mammalian cell transfection with PEI. **Methods in Enzymology**. ISSN 15378276. 29:6 (2012) 997–1003. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.

LOO, Johannes C. M. VAN DER; WRIGHT, J. Fraser - Progress and challenges in viral vector manufacturing. **Human Molecular Genetics**. ISSN 0964-6906. 25:R1 (2016) R42–R52. doi: 10.1093/hmg/ddv451.

MADDALENA, Andrea *et al.* - Triple Vectors Expand AAV Transfer Capacity in the Retina. **Molecular Therapy**. ISSN 15250016. 26:2 (2018) 524–541. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.11.019.

MARCÓ, Sara; HAURIGOT, Virginia; BOSCH, Fatima - In Vivo Gene Therapy for Mucopolysaccharidosis Type III (Sanfilippo Syndrome): A New Treatment Horizon. **Human Gene Therapy**. ISSN 1043-0342. 30:10 (2019) 1211–1221. doi: 10.1089/hum.2019.217.

MATSUSHITA, T. *et al.* - Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. **Gene Therapy**. ISSN 0969-7128. 5:7 (1998) 938–945. doi: 10.1038/sj.gt.3300680.

MENDELL, Jerry R. *et al.* - Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. **New England Journal of Medicine**. ISSN 0028-4793. 377:18 (2017) 1713–1722. doi: 10.1056/NEJMoa1706198.

MERTEN, O. W.; GÉNY-FIAMMA, C.; DOUAR, A. M. - Current issues in adeno-associated viral vector production. **Gene Therapy**. ISSN 0969-7128. 12:S1 (2005) S51–S61. doi: 10.1038/sj.gt.3302615.

MIYAKE, Koichi *et al.* - Serotype-independent Method of Recombinant Adeno-associated Virus (AAV) Vector Production and Purification. **Journal of Nippon Medical School**. ISSN 1345-4676. 79:6 (2012) 394–402. doi: 10.1272/jnms.79.394.

NASO, Michael F. *et al.* - Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. **BioDrugs**. ISSN 1173-8804. 31:4 (2017) 317–334. doi: 10.1007/s40259-017-0234-5.

NASS, Shelley A. *et al.* - Universal Method for the Purification of Recombinant AAV Vectors of Differing Serotypes. **Molecular Therapy - Methods & Clinical Development**. ISSN 23290501. 9:2018) 33–46. doi: 10.1016/j.omtm.2017.12.004.

NIH - U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE - **Clinical Trials** (2020). [Consult. 1 jul. 2020]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/>

O'RIORDAN, Catherine R. *et al.* - Scalable chromatographic purification process for recombinant adeno-associated virus (rAAV). **The Journal of Gene Medicine**. ISSN 1099-498X. 2:6 (2000) 444–454. doi: 10.1002/1521-2254(200011/12)2:6<444::AID-JGM132>3.0.CO;2-I.

OHMORI, Tsukasa - Advances in gene therapy for hemophilia: basis, current status, and future perspectives. **International Journal of Hematology**. ISSN 0925-5710. 111:1 (2020) 31–41. doi: 10.1007/s12185-018-2513-4.

OKADA, Takashi *et al.* - Scalable Purification of Adeno-associated Virus Serotype 1 (AAV1) and AAV8 Vectors, Using Dual Ion-Exchange Adsorptive Membranes. **Human Gene Therapy**. ISSN 1043-0342. 20:9 (2009) 1013–1021. doi: 10.1089/hum.2009.006.

PENAUD-BUDLOO, Magalie *et al.* - Pharmacology of Recombinant Adeno-associated Virus Production. **Molecular Therapy - Methods & Clinical Development**. ISSN 23290501.

8:2018) 166–180. doi: 10.1016/j.omtm.2018.01.002.

PILLAY, Sirika *et al.* - Adeno-associated Virus (AAV) Serotypes Have Distinctive Interactions with Domains of the Cellular AAV Receptor. **Journal of Virology**. ISSN 0022-538X. 91:18 (2017). doi: 10.1128/JVI.00391-17.

PRADO, Dominic A.; ACOSTA-ACERO, Marcy; MALDONADO, Ramiro S. - Gene therapy beyond luxturna: a new horizon of the treatment for inherited retinal disease. **Current Opinion in Ophthalmology**. ISSN 1040-8738. 31:3 (2020) 147–154. doi: 10.1097/ICU.0000000000000660.

QU, Weihong *et al.* - Scalable Downstream Strategies for Purification of Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors in Light of the Properties. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. ISSN 13892010. 16:8 (2015) 684–695. doi: 10.2174/1389201016666150505122228.

REED, Sharon E. *et al.* - Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vectors. **Journal of Virological Methods**. ISSN 01660934. 138:1–2 (2006) 85–98. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.07.024.

ROBERT, Marc-André *et al.* - Manufacturing of recombinant adeno-associated viruses using mammalian expression platforms. **Biotechnology Journal**. ISSN 18606768. 12:3 (2017) 1600193. doi: 10.1002/biot.201600193.

SAMULSKI, R. J. *et al.* - Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. **The EMBO Journal**. ISSN 02614189. 10:12 (1991) 3941–3950. doi: 10.1002/j.1460-2075.1991.tb04964.x.

SANDRO, Quentin; RELIZANI, Karima; BENCHAOUIR, Rachid - AAV Production Using Baculovirus Expression Vector System. Em **Methods in Molecular Biology**. 1937.

SCHNÖDT, Maria; BÜNING, Hildegard - Improving the Quality of Adeno-Associated Viral Vector Preparations: The Challenge of Product-Related Impurities. **Human Gene Therapy Methods**. ISSN 1946-6536. 28:3 (2017) 101–108. doi: 10.1089/hgtb.2016.188.

SEGURA, María Mercedes; KAMEN, Amine A.; GARNIER, Alain - Overview of Current Scalable Methods for Purification of Viral Vectors. Em **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**v. 737. (2011) p. 89–116.

- SHARON, David; KAMEN, Amine - Advancements in the design and scalable production of viral gene transfer vectors. **Biotechnology and Bioengineering**. ISSN 00063592. 115:1 (2018) 25–40. doi: 10.1002/bit.26461.
- SMITH, Richard H.; DING, Chuantian; KOTIN, Robert M. - Serum-free production and column purification of adeno-associated virus type 5. **Journal of Virological Methods**. ISSN 01660934. 114:2 (2003) 115–124. doi: 10.1016/j.jviromet.2003.09.002.
- SNYDER, Richard O.; FLOTTE, Terence R. - Production of clinical-grade recombinant adeno-associated virus vectors. **Current Opinion in Biotechnology**. ISSN 09581669. 13:5 (2002) 418–423. doi: 10.1016/S0958-1669(02)00369-5.
- THOMAS, Clare E. *et al.* - Rapid Uncoating of Vector Genomes Is the Key to Efficient Liver Transduction with Pseudotyped Adeno-Associated Virus Vectors. **Journal of Virology**. ISSN 0022-538X. 78:6 (2004) 3110–3122. doi: 10.1128/JVI.78.6.3110-3122.2004.
- TORNABENE, Patrizia *et al.* - Intein-mediated protein trans-splicing expands adeno-associated virus transfer capacity in the retina. **Science Translational Medicine**. ISSN 1946-6234. 11:492 (2019) eaav4523. doi: 10.1126/scitranslmed.aav4523.
- TRAPANI, Ivana *et al.* - Effective delivery of large genes to the retina by dual AAV vectors. **EMBO Molecular Medicine**. ISSN 1757-4676. 6:2 (2014) 194–211. doi: 10.1002/emmm.201302948.
- TRUONG, Dong-Jiunn Jeffery *et al.* - Development of an intein-mediated split-Cas9 system for gene therapy. **Nucleic Acids Research**. ISSN 0305-1048. 43:13 (2015) 6450–6458. doi: 10.1093/nar/gkv601.
- WALTERS, Robert W. *et al.* - Binding of Adeno-associated Virus Type 5 to 2,3-Linked Sialic Acid Is Required for Gene Transfer. **Journal of Biological Chemistry**. ISSN 0021-9258. 276:23 (2001) 20610–20616. doi: 10.1074/jbc.M101559200.
- WANG, Chunlei *et al.* - Developing an Anion Exchange Chromatography Assay for Determining Empty and Full Capsid Contents in AAV6.2. **Molecular Therapy - Methods & Clinical Development**. ISSN 23290501. 15: (2019) 257–263. doi: 10.1016/j.omtm.2019.09.006.
- WANG, Dan; TAI, Phillip W. L.; GAO, Guangping - Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**. ISSN 1474-1776. 18:5 (2019) 358–378. doi: 10.1038/s41573-019-0012-9.

WANG, Lijun *et al.* - Production and Purification of Recombinant Adeno-Associated Vectors. Em **Methods in Molecular Biology**v. 2068. p. 361–404.

WARNOCK, James N.; DAIGRE, Claire; AL-RUBEAI, Mohamed - Introduction to Viral Vectors. Em **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**v. 737. p. 1–25.

WU, Zhijian; YANG, Hongyan; COLOSI, Peter - Effect of Genome Size on AAV Vector Packaging **Molecular Therapy**. ISSN15250016. 18:1 (2010) 80–86. doi: 10.1038/mt.2009.255

YAN, Ziyang *et al.* - Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. ISSN 0027-8424. 97:12 (2000) 6716–6721. doi: 10.1073/pnas.97.12.6716.

ZOLOTUKHIN, S. *et al.* - Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. **Gene Therapy**. ISSN 0969-7128. 6:6 (1999) 973–985. doi: 10.1038/sj.gt.3300938.

ZOLOTUKHIN, S. - Production of Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors. **Human Gene Therapy**. ISSN 1043-0342. 16:5 (2005) 551–557. doi: 10.1089/hum.2005.16.551.

ANEXOS

ANEXO I – Propriedades e aplicações clínicas dos diferentes serotipos de AAVs

Serotipo do AAV	Origem do isolado	Recetor primário	Correcetores	Tropismo tecidual	Doença (identificador <i>clinicaltrials.gov</i>)	Medicamentos aprovados
AAV1	Macaco	Ácido siálico	AAVR	Músculo, SNC, coração	Doenças musculares (NCT01519349) Insuficiência cardíaca (NCT01643330) Deficiência em AAT (NCT01054339, NCT00430768)	Nenhum
AAV2	Homem	Heparina	Integrina, FGFR, HGFR, LamR, AAVR	Fígado, SNC, músculo	Doenças oculares (NCT00643747) Hemofilia(NCT00515710) Doenças do SNC (NCT00400634) Deficiência em AAT (NCT00377416)	<i>Luxturna</i> para a perda de visão por mutações no gene <i>RPE65</i>
AAV3	Humano	Heparina	FGFR, HGFR, LamR, AAVR	Músculo, Células estaminais	Nenhum ensaio a decorrer	Nenhum
AAV4	Macaco	Ácido Siálico	Desconhecido	Olhos, SNC	Doenças oculares (NCT01496040)	Nenhum
AAV5	Humano	Ácido Siálico	PDGFR, AAVR	SNC, Pulmão, olhos	Hemofilia (NCT03520712) Doenças oculares (NCT02781480) AIP (NCT02082860)	Nenhum
AAV6	Humano	Heparina, Ácido Siálico	EGFR, AAVR	Músculo, SNC, Coração, pulmão	Hemofilia (NCT03061201) Doenças do SNC (NCT02702115)	Nenhum
AAV7	Macaco	Desconhecido	Desconhecido	Músculo, SNC	Nenhum ensaio a decorrer	Nenhum
AAV8	Humano	Desconhecido	LamR, AAVR	Fígado, músculo, Pâncreas, SNC	Doenças oculares (NCT03066258) Hemofilia (NCT00979238) Doenças musculares (NCT03199469)	Nenhum
AAV9	Humano	Galactose	LamR, AAVR	Todos os tecidos	Doenças do SNC (NCT02122952) Doenças musculares (NCT03362502)	<i>Zolgensma</i> para a atrofia muscular espinhal
AAV10	Macaco	Desconhecido	Desconhecido	Músculo	Nenhum ensaio a decorrer	Nenhum
AAV11	Macaco	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido	Nenhum ensaio a decorrer	Nenhum
AAV12	Humano	Desconhecido	Desconhecido	Nasal	Nenhum ensaio a decorrer	Nenhum

AAT, α 1-antitripsina; **AAV**, vírus adeno-associados; **AAVR**, recetor AAV; **AIP**, porfíria aguda intermitente; **EGFR**, recetor do fator de crescimento epidérmico; **FGFR**, recetor do fator de crescimento de fibroblastos; **HGFR**, recetor do fator de crescimento de hepatócitos; **LamR**, recetor laminina I; **PDGFR**, recetor do fator de crescimento derivado de plaquetas; **SNC**, sistema nervoso central

(Adaptado de Li e Samulski, 2020)

ANEXO 2 – Área de superfície vs. Volume na produção rAAVs

As abordagens que utilizam para a produção de rAAVs células aderentes estão limitadas pela área de superfície disponível. Tomando por exemplo, células HEK293 transfetadas com um densidade celular de 10^5 células por cm^2 produzem 104 cópias de rAAVs, utilizando uma área de superfície de 10 cm^2 o título será aproximadamente 1×10^{10} partículas, se posteriormente aumentarmos a área de superfície para 100 cm^2 o título será 1×10^{11} , e assim sucessivamente. A relação entre a área de superfície (células aderentes) e o volume (células em suspensão) é aproximadamente $10 \text{ cm}^2 \approx 0,5 \text{ cm}^3$. Como ilustrado na tabela abaixo, à medida que o são necessárias mais cópias do genoma do vetor (vg), torna-se inoportável providenciar suporte sólido para as células aderirem, ao passo que, em termos volumétricos, para obter o mesmo número de vg o volume necessário é mais tolerável para a produção em larga escala.

Tabela 1 – Comparação entre área de superfície e o volume para a produção de rAAVs

Vg	Células	Volume (L)	Área de superfície (cm^2)
1×10^{10}	1×10^6	0,0005	10
1×10^{11}	1×10^7	0,005	100
1×10^{12}	1×10^8	0,05	1 000
1×10^{13}	1×10^9	0,5	10 000
1×10^{14}	1×10^{10}	5	100 000
1×10^{15}	1×10^{11}	50	1 000 000
1×10^{16}	1×10^{12}	500	10 000 000
1×10^{17}	1×10^{13}	5 000	100 000 000
1×10^{18}	1×10^{14}	50 000	1 000 000 000
1×10^{19}	1×10^{15}	500 000	10 000 000 000

A primeira coluna, vg, representa o objetivo de número de cópias do vetor. A segunda coluna representa o número de células necessário para produzir os vetores elencados na primeira coluna, assumindo que cada célula produz 104 vg. A terceira e quarta coluna elencam o volume relativo (em litros) e área de superfície (cm^2) requeridos para comportar o número de células. Assim, para produzir 10^{15} partículas são necessários ou 50 L ou 1 000 000 cm^2 , que corresponde a biorreator de pequenas dimensões ou cerca de 5 700 placas de cultura com 15 cm de diâmetro. Aumentar a produção 10 vezes requeria ou um biorreator com 500 L ou 57 000 placas, e assim sucessivamente.

(Adaptado de Cecchini, Negrete e Kotin, 2008)

ANEXO 3 – As plataformas para a produção de rAAVs para o uso clínico

	<i>Transfecção tripla (aderentes)</i>	<i>Transfecção tripla (suspensão)</i>	<i>Sistema de Expressão de Vetores através Baculovírus</i>	<i>Coinfecção com vírus Herpes</i>	<i>Células produtoras infectadas por adenovírus</i>
REPI/CAP	Plasmídeo	Plasmídeo	Integrados na linha celular	1° rHSV	Integrados no genoma celular
ITR-Transgene-ITR	Plasmídeo	Plasmídeo	Baculovírus	2° rHSV	Integrados no genoma celular
Genes auxiliar	Plasmídeo	Plasmídeo	Baculovírus (mesmo que anterior)	rHSV (mesmo que o anterior)	Ad
Linha celular	HEK293 (aderentes)	HEK293 (suspensão)	Células de inseto Sf9	BHK (suspensão)	HeLa S3 (suspensão)
Sistema de produção	CellFactory, roller, CellCube	Biorreator Wave (dezenas de litros)	Biorreator de tanque com agitação de 200 L	Biorreator Wave de 10 L	Biorreator de tanque com agitação de 250 L
Eficácia de transdução do DNA	++	+	+++	+++	+++
Transponibilidade de escala	-	++	+++	+++	+++
Título (genoma de vetor/célula)	5x10 ⁴ (AAV6) 3,5x10 ⁵ (AAV9)	9x10 ⁴ (AAV4) 2,1x10 ⁵ (AAV2, AAV9)	8x10 ² (AAV12) 5x10 ⁵ (AAV3)	7x10 ⁴ – 1x10 ⁵	5x10 ⁴
Constrangimentos de segurança	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Contaminação com vírus auxiliar	Contaminação com vírus auxiliar do tipo selvagem
Vantagens	Produção rápida de rAAVs em pequena escala	Produção rápida de rAAVs em pequena escala	Maior segurança das células de inseto e dos baculovírus	Não é necessária a estabilização da linha celular	O mesmo vírus para a produção de vários serotipos
	AAVs isentos de vírus auxiliar	AAVs isentos de vírus auxiliar	Produção em larga escala eficiente	Produção em larga escala eficiente	Produção em larga escala eficiente
Desvantagens	Baixa transponibilidade da transfecção tripla	Baixa transponibilidade da transfecção tripla	Potencial baixa estabilidade dos BEV	Produção de dois rHSV auxiliar	Uma linha celular produtora estável para cada projeto
				rHSV sensíveis às condições de produção	

(Adaptado de Naso et al., 2017)

ANEXO 4 – Ensaios e Especificações de Pureza e Segurança – rAAVs

Teste	Método	Especificação
Segurança		
Endotoxinas	Ensaio LAL (EP 2.6.14, USP85)	< 2 EU/dose injetada ^a
	Ensaio em coelho de pirogênios (EP 2.6.8)	Negativo
Esterilidade/atividade bacteriostática e fungistática	Ensaio de esterilidade (EP 2.6.1, USP71)	Negativo ^a
AAV competentes de replicação	Infeções em serie em células permissivas/qPCR dos genes rep ou cap	< rcAAV em 1x10 ⁸ vg
Pureza		
Pureza geral	SDS-PAGE/silver staining	Identidade de proteínas excetuando a VP (ou produtos da sua degradação)
Proteínas	SDS-PAGE/Coomassie blue	≥ 80%
	HPLC	
BSA residual ^b	ELISA	≤ 50 ng/mL ^a
Reagentes da produção residuais ^c	HPLC, MS, ELISA.	Segundo relatório de resultados
Proteínas da célula hospedeira	ELISA, MS	Segundo relatório de resultados
DNA celular residual	qPCR, HTS	≤ 10 ng/dose injetada ^a
DNA residual proveniente de matérias primas ^d	qPCR, HTS	Segundo relatório de resultados
Partículas vazias/incompletas	Ratio vg (qPCR)/vp (ELISA)	Segundo relatório de resultados
	Microscopia Eletrônica, AUC	
Qualidade		
Proteínas total	Ensaio proteínas de Bradford, BCA, NanoOrange	Segundo relatório de resultados
Aparência	Inspeção visual	Transparente a ligeiramente opalescente, isento de partículas em suspensão
pH	Potenciometria	pH 6,5 – 8
Osmolalidade	Osmometria	Específico do produto, Segundo relatório de resultados (250 – 350 mOsm/kg)
Agregação	DLS	Segundo relatório de resultados

AUC, ultracentrifugação analítica; **BCA**, *bicinchoninic acid protein assay*; **BSA**, soro bovino fetal; **DLS**, *dynamic light scattering*; **EP**, unidade de endotoxinas; **HPLC**, *high-performance liquid chromatography*; **HTS**, *high-throughput sequencing*; **LAL**, *limulus ameobocyte lysate*; **MS**, espectroscopia de massa; **USP**, Farmacopeia Norte Americana;

a – Especificações da farmacopeia USP ou da Farmacopeia Europeia; especificações adicionais são recomendadas.

b – Apenas processo que usem soro bovino fetal.

c – Dependendo do processo de purificação (Benzonase, detergente, BSA, Césio, PEG, ligandos de afinidade).

d – DNA de Plasmídeos, baculovírus, adenovírus ou HSV.

(Adaptado de Penaud-Budloo et al., 2018)

ANEXO 5 – Purificação de rAAVs utilizando diferentes estratégias

Serotipos dos rAAVs	Passos e Tipo de Purificação				Pureza	Transponibilidade de escala
	1°	2°	3°	Tipo		
Todos os Serotipos	CsCl	CsCl	CsCl	UC/UC/UC	< 90%	Não
	CsCl	CsCl	-	UC/UC	> 98%	Não
rAAV1	Poros 50 HQ	Poros 10 HQ	Sephacryl S-300 HR	AEX/AEX/SEC	> 95%	Sim
	Iodixanol	HiTrap Q	-	UC /AEX	> 95%	Não
	AVB sepharose HP	-	-	IAC	> 90%	Sim
	CsCl	Mustang S	Mustang Q	UC/ DIAM	> 99%	Não
	CHT	AEX	HIC/SEC	Apatite/AEX/HIC/SEC	> 95%	Sim
BAP rAAV1	Monomeric avidin agarose	-	-	IAC	> 90%	Não
rAAV2	Poros 20PI	-	-	AEX	> 90%	Sim
	Poros 50HQ	Poros 50HQ	-	AEX/AEX	> 90%	Sim
	Poros 50HS	Poros 50HS	-	CEX/CEX	> 90%	Sim
	Poros 50HS	Q-Sepharose xl	-	CEX /AEX	> 90%	Sim
	SP Sepharose HP	HiTrap Q	-	CEX/AEX	> 98.5%	Sim
	SP Sepharose HP	Source 15Q	-	CEX/AEX	> 98.5%	Sim
	Poros 20 HE	-	-	HEAC	> 99%	Sim
	Iodixanol	HiTrap Q	-	UC/AEX	> 99%	Não
	Iodixanol	Heparina	-	UC/HEAC	> 99%	Não
	Sulfonated cellulose	-	-	AC	-	Não
	Iodixanol	UNO-SI	-	UC/CEX	> 90%	Não
	Iodixanol	Poros HE	-	UC/HEAC	> 90%	Não
	HPLC heparin	-	-	HEAC	> 90%	Sim
	Poros HE	-	-	HEAC	> 98%	Sim
	Poros 20 HE	Poros 50 PI	-	HEAC /AEX	> 95%	Sim
	CHT	DEAE Macrorep	Cellufine sulfate	Apatite /AEX/AC	> 90%	Sim
	Heparin	-	-	HEAC	> 90%	Sim
	Heparin	Phenyl-Sepharose	Heparin	HEAC/HIC/HEAC	> 99%	Sim
	AVB sepharose HP	-	-	IAC	> 90%	Sim
	Mono Q HR	Superdex 200	-	AEX/SEC	> 97%	Sim
His6rAAV 2	Ni-NTA agarose	-	-	IMAC	> 90%	Não

rAAV4	Poros PI	Poros HQ	-	AEX/AEX	> 90%	Sim
	Poros HQ	-	-	AEX	> 90%	Sim
rAAV5	Mustang S	Mustang Q	-	DIAM	> 90%	Sim
	Mono Q HR	Superdex 200	-	AEX/SEC	> 97%	Sim
	Iodixanol	HiTrap Q	-	UC/AEX	> 99%	Não
	SP Sepharose HP	Source 15 Q	-	CEX/AEX	> 98.5%	Sim
	Poros PI	-	-	AEX	> 99%	Sim
	Mucina acoplada a Sepharose	-	-	AC	> 90%	Não
rAAV6	Poros 50HQ	Poros 50HQ	-	AEX/AEX	> 90%	Sim
rAAV8	SP Sepharose HP	Source 15Q	-	CEX/AEX	> 98.5%	Sim
	CsCl	Mustang S	Mustang Q	UC/DIAM	> 99%	Não
	Sephacryl S-300 HR	Poros 50HQ	-	SEC/AEX	98%	Sim
	Pep8-agarose	HiTrap Q	-	IAC/AEX	> 90%	Não
His6rAAV8	Ni-NTA agarose	-	-	IMAC	> 90%	Não
rAAV9	CHT	Poros 50HS	CsCl	apatite /CEX/UC	> 99%	Sim

(Adaptado de Qu *et al.*, 2015)