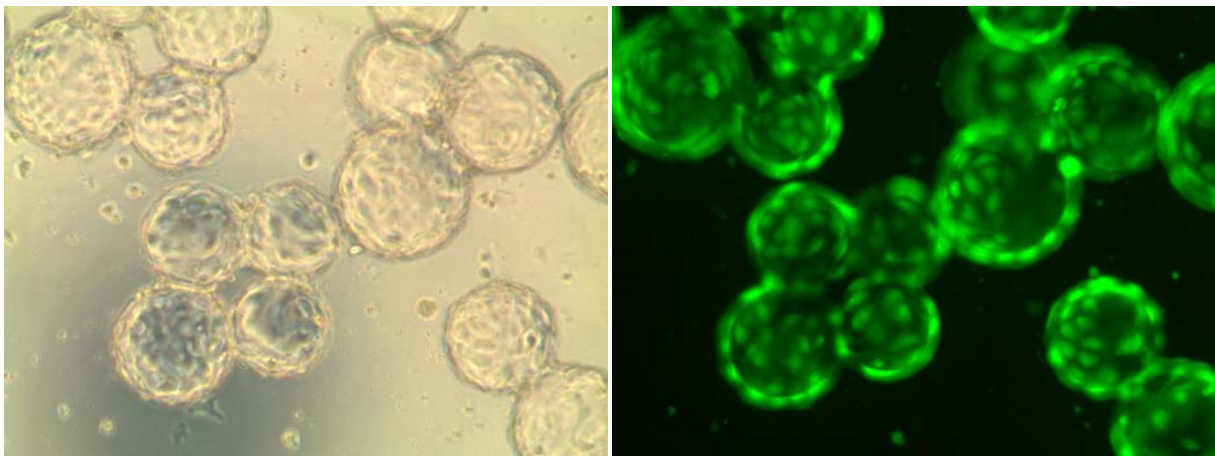


UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Produção de Vectores de Adenovírus Caninos:
Optimização do Processo na Perspectiva de Aumento de Escala**



Paulo David Machado dos Santos Fernandes

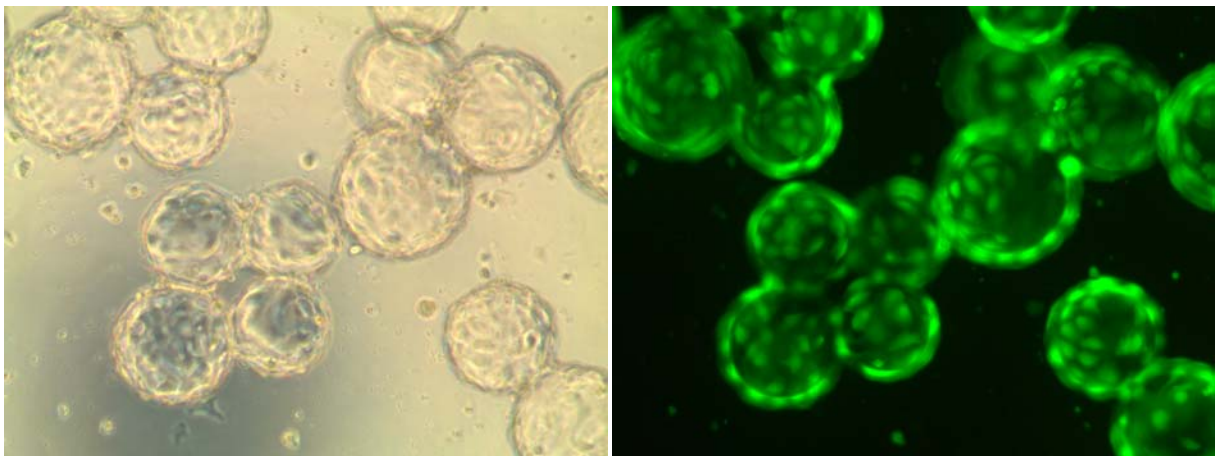
MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Produção de Vectores de Adenovírus Caninos:
Optimização do Processo na Perspectiva de Aumento de Escala**



Dissertação de mestrado sob a orientação de:

Professora Doutora Filomena Caeiro, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Doutora Paula Alves, Instituto de Tecnologia Biologia Experimental e Tecnológica/Instituto
de Tecnologia Química e Biológica, Laboratório de Tecnologia de Células Animais

Paulo David Machado dos Santos Fernandes

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2009

i. AGRADECIMENTOS

À Doutora Paula Alves pela oportunidade, orientação, preocupação e por todas as ajudas;

À Doutora Ana Sofia Coroadinha pela disponibilidade e ajuda constantes;

À Professora Filomena Caeiro pela orientação e disposição a ajudar prontamente;

Ao corpo docente da Faculdade de Ciências por todos os ensinamentos;

Ao Doutor Eric Kremer (IGMM) pelo fornecimento de vírus e da linha celular DK E1;

Ao Doutor Miguel Chillon (UAB) pelo fornecimento de vírus e do plasmídeo-padrão para o PCR quantitativo;

À Carina Silva pela formação, conselhos e apoio;

À Doutora Cristina, à Doutora Ana Teixeira, ao Tiago, à Guida e à Candida pelo apoio profissional em algumas circunstâncias e pessoal em muitas mais;

À Virginia pela boa disposição, pela simplicidade e por ouvir fosse o que fosse;

A todas as pessoas do TCA, em especial à Cláudia, à Sofia e à Ivette pelas conversas sobre o nada que ajudam em tudo;

À Francisca, pela amizade, companhia e apoio nas alturas mais difíceis;

Aos amigos de microbiologia pelos momentos hilariantes nesta jornada que já vai em 5 anos, em especial à Marta R., ao André Grilo e à Mafalda C. pela amizade resistente a ausências e distâncias;

À Sofia pela inspiração, por ver em mim o que vejo nela, e por ser uma amiga para a vida;

À Célia e à Raquel pelas risadas “non-stop” e pela melhor companhia que alguma vez se podia ter na descoberta da vida académica;

Ao Nelson por acreditar que um “mad-scientist” também sabe atender clientes e deixar a banca da fruta num brilho;

Aos amigos da velha-guarda e em especial aos que ainda se mantêm como se fosse ontem: Rita, Célia e Joana.

À família Eddy Murphy, por me mostrarem de várias maneiras que é possível;

Aos meus pais, pela procura de uma melhor vida por mim e pelo altruísmo em benefício do meu crescimento e da minha educação;

À minha irmã, por me mostrar o bom que é fazer aquilo que se gosta, por mais fácil que fosse fazer outra coisa qualquer;

A todos,

Obrigado!

ii. PREFÁCIO

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projecto europeu BrainCAV que visa o estudo e desenvolvimento de adenovírus caninos tipo 2 (CAV-2) como potenciais vectores para terapia génica em doenças neurodegenerativas.

Neste projecto o grupo de Tecnologia de Células Animais do ITQB/IBET contribui i) para o desenvolvimento de um modelo 3D da cultura de neurónios e células da glia para a avaliação da eficácia da transferência génica do vector, ii) no desenvolvimento das linhas celulares produtoras a partir de células Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) e iii) no desenvolvimento do bioprocesso para a produção e purificação de vectores em larga escala e de acordo com as boas práticas de produção (GMP) que possa no futuro ser incorporado no dossier para licenciamento destes vectores para terapias em humanos.

O trabalho descrito nesta tese de mestrado abordou e contribuiu para esta última parte (iii), pretendendo-se:

- Optimizar e harmonizar com os outros parceiros as técnicas de quantificação de CAV-2 e produzir stocks-padrão de CAV-2 (capítulo 2);
- Caracterizar os vectores produzidos em células MDCK e comparar com vectores produzidos em células Dog Kidney (DK), regularmente utilizadas para a sua produção em laboratório mas que não poderão ser utilizadas em produção para vectores para terapia em humanos (capítulo 3);
- Fazer desenvolvimento do bioprocesso para produção em sistema de fácil escalamento (bioreactor de tanque agitado) avaliando estratégias de cultura de células MDCK em suspensão, recorrendo a suportes e estratégias de produção de vírus, em meios com e sem soro (capítulo 4 e 5).

iii. RESUMO

Introdução: Os vectores derivados de adenovírus caninos tipo 2 (CAV-2) possuem um grande potencial em terapia génica uma vez que circunscvem os problemas encontrados na utilização dos vectores virais mais comuns – adenovírus humanos – nomeadamente a memória imunitária o que implica o aumento de doses a administrar por pessoa.

Até à data os vectores de CAV-2 são produzidos em frascos de cultura utilizando células DK como produtoras. Por isso é necessário desenvolver um sistema de cultura que permita o aumento de escala de produção e a utilização de linhas celulares previamente aprovadas para produção de fármacos para humanos. Os aspectos mais importantes na optimização de bioprocessos são: crescimento e manutenção das células em sistema agitado e estratégias de infecção. Deve também existir um esforço no sentido da utilização de meios de cultura definidos e sem soro.

Objectivo: Este trabalho pretende optimizar a produção de vectores CAV-2 de primeira geração em células MDCK, aprovadas pela FDA, em sistema de tanque agitado utilizando meio de cultura sem soro.

Resultados: Foi possível obter vectores virais em células MDCK E1 sendo a produtividade semelhante à obtida em células DK E1. Foi ainda demonstrado ser possível obter produtividades semelhantes em meio de cultura sem soro. Na adaptação do crescimento celular em sistema agitado a produtividade volumétrica das células MDCK E1 manteve-se em meio com soro. No entanto em meio sem soro não foi possível manter a produtividade viral devido ao efeito dos produtos do metabolismo celular.

Conclusão: Este trabalho permitiu identificar e definir factores importantes para a produção de CAV-2 utilizando células MDCK E1 em sistema agitado em meio sem soro ou com redução significativa de soro. De futuro pretende-se optimizar o processo de modo a possibilitar e maximizar a produção viral utilizando estratégias de redução da quantidade de lactato produzido pelas células.

Palavras-chave: produção de vírus, Adenovírus caninos tipo 2 (CAV-2), MDCK, cultura de células animais, sistema agitado.

iv. ABSTRACT

Introduction: Vectors derived from Canine Adenovirus type 2 possess a great potential for gene therapy because they can overcome the problems found in the utilization of the most common virus-derived vectors – human adenovirus – namely the immunitary memory which implies the increase of dosage to administrate to people.

Until now, CAV-2 vectors are produced in lab-scale Tissue flasks using DK cells being necessary to develop a culture system that allows the scale-up of production. By that, the most important aspects in optimization are: growth and maintenance of cells in suspension system and infection strategies. There should be also an effort to use serum-free media culture.

Goal: This work intends to optimize the production of first generation CAV-2 vectors in MDCK cells, approved by FDA, in stirred tank system using serum-free media.

Results: The results show that it is possible achieve viral vectors using MDCK E1 cells as producers, where the productivity is equal to that obtained by DK E1 cells. It was also demonstrated that it is possible obtain similar productivities in serum-free media. In cell growth adaptation in suspension system the volumetric productivity of MDCK E1 cells was maintained in serum supplemented medium. However, for the serum-free media cultures, it was not possible to maintain viral productivity because of the cell metabolism products.

Conclusion: This work allowed the definition of important factors for the CAV-2 production using MDCK E1 cells in suspension using serum-free media and with significant reduction of serum used. Future work aims to complete the optimization of the process to enable and maximize the viral production using strategies for reducing the amount of lactate produced by cells.

Keywords: Adenovirus production, Canine Adenovirus type 2 (CAV-2), MDCK, animal cell culture, suspension system.

v. LISTA DE ABREVIATURAS E GLOSSÁRIO

AdV – Adenovírus;

BSA – **B**ovine **S**erum **A**lbumin: Albumina de soro bovino;

CAV – **C**anine **A**deno**V**irus: Adenovírus caninos;

DK – **D**og **K**idney: células DK;

DMEM – **D**ulbecco's **M**odified **E**agle's **M**edium: meio de Eagle modificado por Dulbecco;

DMSO – **D**imetilsulfóxido;

DPBS – **D**ulbecco's **P**hosphate-**B**uffered **S**aline: tampão fosfato de Dulbecco;

EDTA – **E**thylenediamine **t**etra-**a**cetic **a**cid: ácido etilendiamino tetra-acético;

EMA – **E**uropean **M**edicines **A**gency;

FBS – **F**etal **B**ovine **S**erum: soro fetal bovino;

FDA – **F**ood and **D**rug **A**dministration;

GFP – **G**reen **F**luorescent **P**rotein: proteína verde fluorescente;

HAd – **H**uman **a**denovirus: adenovírus humanos;

hpi – **h**oras **p**ós **i**nfecção;

pi – **P**artículas **i**nfecciosas;

MDCK – **M**adin-**D**arby **C**anine **K**idney: células MDCK;

MEM – **M**inimum **E**ssential **M**edium: meio mínimo essencial;

MOI – **M**ultiplicity **o**f **i**nfection: Multiplicidade de infecção;

PBS – **P**hosphate-**B**uffered **S**aline: tampão PBS;

POI – **P**oint **o**f **i**nfection – concentração de células na altura de infecção;

pt – **P**artículas **t**otais ou **p**artículas **f**ísicas;

rAdV – **R**ecombinant **A**denovirus: Adenovírus recombinantes;

SDS-PAGE - **S**odium **d**odecyl **s**ulfate **p**oly**a**crylamide **g**el **e**lectrophoresis: electroforese em gel de poliacrilamida, com SDS;

SFM – **S**erum-**F**ree **M**edia: meio sem soro;

Spinner – Frasco de borosilicato, com três entradas rolhadas e um sistema de agitação consistindo numa pá ligada a um magnete;

T-Flasks – **T**issue **F**lasks: Frascos de cultura.

vi. ÍNDICE

i.	AGRADECIMENTOS.....	i
ii.	PREFÁCIO.....	ii
iii.	RESUMO	iii
iv.	ABSTRACT	iv
v.	LISTA DE ABREVIATURAS E GLOSSÁRIO	v
vi.	ÍNDICE	vi
1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Os Adenovírus.....	1
1.1.1	Estrutura genómica.....	2
1.1.2	Ciclo de Replicação.....	3
1.1.3	Vectores Adenovirais	3
1.2	Desenvolvimento do processo de produção de adenovírus.....	5
1.2.1	Meios de cultura para a produção de adenovírus	5
1.2.2	Crescimento e expansão celular	6
1.2.3	O processo de infecção.....	7
1.2.4	Recolha dos vírus	8
2.	OPTIMIZAÇÃO E HARMONIZAÇÃO DE MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE CAV-2.....	9
2.1	Materiais e Métodos	10
2.1.1	Linha celular e vírus	10
2.1.2	Contagem de Células.....	10
2.1.3	Produção de Adenovírus	11
2.1.4	Purificação por ultracentrifugação em gradiente de CsCl ₂	11
2.1.5	Titulação de Adenovírus	12
2.2	Resultados e Discussão	13
2.2.1	Titulação de partículas infecciosas.....	13
2.2.2	Títulação de partículas totais.....	14
3.	CARACTERIZAÇÃO DOS VECTORES VIRAIS PRODUZIDOS EM CÉLULAS DK E MDCK.....	16
3.1	Materiais e Métodos	16
3.1.1	Linhas celulares e vírus	16
3.1.2	Morfologia dos vectores CAV-2	16
3.1.3	Perfil Proteico por SDS-PAGE	17

3.1.4	Dimensões e medidas electrodinâmicas.....	17
3.2	Resultados e Discussão	17
3.2.1	Morfologia e Perfil de proteínas das partículas.....	17
3.2.2	Dimensões dos vírus e potencial Zeta	18
4.	ESTRATÉGIAS DE CULTURA DE CÉLULAS MDCK EM SUSPENSÃO UTILIZANDO MEIOS DE CULTURA COM E SEM SORO	20
4.1	Materiais e Métodos	20
4.1.1	Linhas celulares e condições de cultura	20
4.1.2	Estudos de crescimento celular em T-flasks	20
4.1.3	Estudos de crescimento celular em spinners	20
4.1.4	Contagem de Células.....	21
4.2	Resultados e Discussão	22
4.2.1	Efeito da expressão de E1 no crescimento celular	22
4.2.2	Efeito da composição do meio de cultura no crescimento celular	23
4.2.3	Efeito da concentração do inóculo na concentração máxima de células obtidas em sistema agitado.....	24
4.2.4	Estratégias de inoculação baseadas em migração entre suportes.....	26
5.	EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA E DO SISTEMA DE CULTURA CELULAR NA PRODUTIVIDADE DE CAV-2.....	27
5.1	Materiais e Métodos	27
5.1.1	Linhas celulares e vírus	27
5.1.2	Estudos de produtividade em placas	27
5.1.3	Estudos de produtividade em spinner.....	27
5.1.4	Contagem de Células.....	27
5.1.5	Determinação de glucose, lactato, glutamina e amónia	28
5.2	Resultados e Discussão	28
5.2.1	Efeito da MOI.....	28
5.2.2	Efeito do meio de cultura	31
5.2.3	Efeito do sistema de cultura	33
5.2.4	Efeito do meio sem soro em sistema agitado	34
5.2.5	Produtividade obtida nos diferentes ensaios	36
6.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	38
7.	REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

A terapia génica é genericamente definida como a inserção de um gene funcional numa célula para corrigir uma deficiência genética ou permitir uma nova função celular. Esta é uma definição muito ampla que contempla o potencial de tratamento dos vários distúrbios genéticos, bem como cancro, doenças infecciosas e distúrbios auto-imunes (Culver, 1994).

O transgene é usualmente “entregue” utilizando um sistema biológico sendo o veículo de entrega denominado *vector*. Vários tipos de “sistemas de entrega” biológicos têm sido desenvolvidos e podem ser definidos como vectores não virais (lipossomas, conjugados DNA-proteína, e conjugados DNA-proteína-vírus defectivo, entre outros) e vectores virais.

De entre os vários tipos de vectores, os vectores virais são aqueles que apresentam maior especificidade e eficiência na entrega dos genes, recaindo por isso sob estes a preferência de utilização em terapia génica (tabela 1) (Horwood *et al.*, 2002; Mountain, 2000).

Os adenovírus e outros vectores virais utilizam processos virais existentes para a adsorção, a endocitose, a integração, e a expressão génica para facilitar a entrega do transgene e a expressão *in vivo*.

Tabela 1: Principais vantagens e desvantagens dos sistemas de entrega de genes (adaptado de Wang *et al.*, 2000).

Sistema	Vantagens	Desvantagens
Retrovírus	Expressão a longo prazo Baixa imunogenicidade	Requer células em divisão celular Dificuldades de produção Risco de mutagénese insercional
Adenovírus	Produtividades altas Transdução eficiente	Resposta Imune do hospedeiro Expressão génica transiente
Vírus adeno-associados	Baixa imunogenicidade Transferência génica eficiente Expressão estável	Patogénicos por coinfeção Dificuldades de produção
Vectores não virais	Sem reconhecimento imune (em princípio) Seguros	Transferência génica ineficiente Expressão transitória Instabilidade

1.1 Os Adenovírus

Os adenovírus são vírus icosaédricos sem invólucro com diâmetro entre 60 a 90 nm com 252 capsómeros, dos quais 240 são hexões (hexameros) e 12 nos vértices são pentões (pentameros). De cada pentamero projecta-se uma fibra de 20 a 50 nm de comprimento que termina com uma estrutura globular denominada por domínio protuberante (fig. 1).

Adenovírus de vários serotipos têm sido isolados de muitas espécies incluindo humana bovina, ovina, suína, equina, murina e canina.

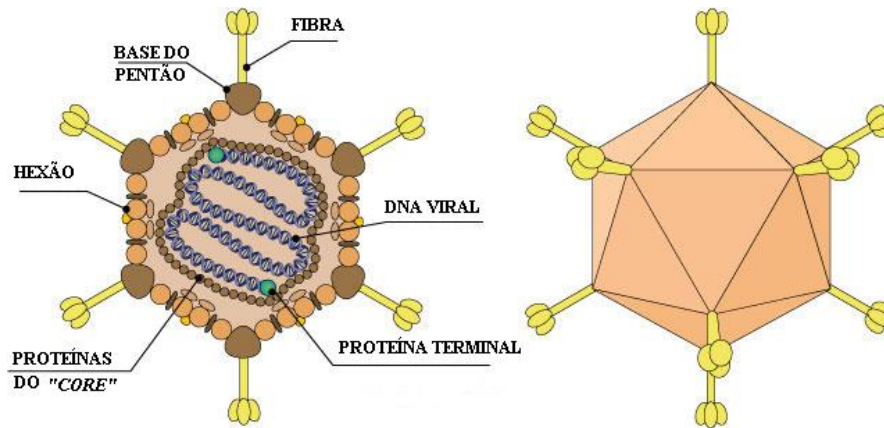


Fig. 1: Representação esquemática de um adenovírus

(adaptado de http://www.expasy.org/viralzone/all_by_species184.html).

1.1.1 Estrutura genômica

Os adenovírus contêm um genoma linear de DNA de cadeia dupla. O tamanho do genoma varia entre 30 e 40 kbp. Todos os AdV partilham aspectos semelhantes: o genoma é flanqueado em cada extremidade por *Inverted Terminal Repeats* (ITR) que actuam como regiões de reconhecimento para a iniciação da replicação. Cada ITR é referida especificamente como ITR direita e ITR esquerda. Localizada perto da ITR esquerda encontra-se o sinal de encapsidação, requerido para o empacotamento do genoma viral no interior da cápside viral. Os genes virais podem ser divididos tendo em conta duas fases da expressão genética: genes precoces (*early genes*, E), expressos antes da replicação do DNA viral, e os genes tardios (*late genes*, L), expressos após a replicação. As regiões transcritas precocemente são E1 (E1A, E1B), E2 (E2a, E2b), E3 e E4. A primeira região a ser transcrita durante as infecções virais é a E1A. Esse transcrito sofre *splicing* alternativo para dar origem a duas proteínas necessárias para a replicação viral e para a regulação da transcrição. Tal como para a região E1A, os transcritos da região E1B sofrem *splicing* alternativo resultando na produção de duas proteínas principais necessária ao bloqueamento do transporte do mRNA do hospedeiro e promoção do transporte do mRNA viral. A região E2 é dividida em duas regiões, E2a e E2b. A região E2a codifica a proteína de ligação ao DNA (DBP) enquanto que a região E2b codifica a polimerase de DNA e a proteína terminal (pTp). A região E3 não é essencial para a replicação dos adenovírus em cultura. A maioria das proteínas codificadas por E3 estão envolvidas na modulação da resposta imunitária das células infectadas. A região E4 codifica as últimas seis proteínas que estão envolvidas na regulação da transcrição, no transporte do mRNA e na replicação do DNA (Fields *et al.*, 1996a; Stone *et al.*, 2000).

Após a replicação do DNA viral, o padrão da transcrição muda rapidamente dos genes precoces para os genes tardios. Os genes tardios são transcritos a partir do principal promotor

tardio (MLP) e codificam a maioria das proteínas estruturais do virião. Isto inclui a base pentagonal proteica codificada pelo transcrito L2, a proteína hexagonal codificada pelo transcrito L3 e a fibra proteica codificada pelo transcrito L5 (Fields *et al.*, 1996a).

1.1.2 Ciclo de Replicação

O processo de entrada do vírus na célula é iniciado pela ligação do domínio protuberante, localizado na extremidade da fibra proteica da cápside, a um receptor da superfície celular de alta afinidade denominado CAR (*Coxsackie and Adenovirus receptor*). A entrada do vírus na célula é posteriormente mediada pela interação entre as integrinas da superfície celular $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ com a base pentagonal da cápside. Após estas interações extracelulares iniciais, o virião adenovírico é internalizado por endocitose para um endossoma. Um subsequente decréscimo de pH no endossoma provoca uma variação conformativa nas proteínas da cápside do virião, dando origem à libertação da cápside viral para o citoplasma. A partir daqui, a cápside é transportada para o núcleo da célula, onde o genoma viral é libertado e sofre replicação e transcrição a partir de uma localização epissómica (Stone *et al.*, 2000).

1.1.3 Vectores Adenovirais

Os adenovírus recombinantes (rAdVs) apresentam um grande potencial tanto em investigação como em terapia (terapia génica e vacinação) onde são usados como ferramenta para a transferência de material genético. Os rAdVs infectam eficientemente e expressam os seus genes numa grande variedade de tipos celulares. Os rAdVs têm uma baixa patogenicidade em humanos e apresentam a máxima eficiência de replicação entre os vectores virais. De facto, a elevada eficiência de replicação e o título elevado de produção de um vector viral são características chave para o sucesso de um projecto cujo objectivo seja o desenvolvimento de sistemas de entrega de genes. Os rAdVs podem ser usados como meios para a transfecção de células para a expressão de proteínas, ferramentas nos estudos de caracterização e sistemas de terapia génica (Benihoud *et al.*, 1999; Imler, 1995).

A primeira geração de rAdVs é principalmente baseada na inibição da sua replicação (*replication-defective*) através da deleção da região de gene E1. Porque um vector adenoviral sem a região do gene E1 não se pode replicar, os rAdVs têm que ser propagados numa linha celular estável que expresse uma cópia da região E1. A primeira geração de vectores adenovirais pode provocar uma resposta imunitária significativa *in vivo*, devido à síntese das

proteínas virais, o que limita a duração e o nível de expressão do gene alvo. No entanto a sua capacidade de acomodar o transgene é compatível com a maioria das aplicações e são fáceis de produzir com elevados títulos.

Têm sido desenvolvidos novos vectores rAd, que são menos imunogénicos que os da primeira geração. Nestes vectores as regiões E2, E3, ou E4 estão eliminadas do genoma. Vectores adenovirais que não apresentam nenhum dos genes virais codificantes foram mais recentemente desenvolvidos, e são denominados de *helper-dependent* pois a sua produção é dependente de um vírus ajudante (helper virus). Estes vectores - "*gutless*" - em que o genoma contém apenas o sinal de empacotamento e as ITRs do vírus selvagem, permitem aumentar a capacidade de acomodação de DNA. Para além disso, têm a vantagem de ter sido removido todos os genes adenovirais que poderiam apresentar efeitos nocivos na sua aplicação como vector recombinante. Uma vez que é necessário o uso de um vírus ajudante para a propagação do vector "*gutless*", um dos principais problemas associados com a produção é a separação final destes dois vírus durante a purificação. Sendo assim, e apesar de promissoras as novas gerações de adenovírus, o seu desenvolvimento ainda precisa de alguns aperfeiçoamentos para se passar à sua aplicação (Volpers & Kochanek, 2004).

Os serotipos de adenovírus humanos (HAd) 2 e 5 são a base dos vectores mais utilizados. Uma das maiores desvantagens clínicas do uso de HAd está relacionada com a memória imunitária (humoral e celular) que limita a eficiência e duração da expressão do transgene (Klonjowski *et al.*, 1997). Os estudos epidemiológicos reportam que a maioria das pessoas já esteve exposta a múltiplos serotipos de HAd que geram uma forte reacção imunitária cruzada (Perreau & Kremer, 2006).

Para circunscrever este problema vectores derivados de adenovírus não humanos como os adenovírus bovinos, ovinos e de aves têm vindo a ser desenvolvido. Em meados dos anos 90 EJ Kremer e colegas começaram a estabelecer vectores adenovirais caninos (tabela 2) tipo 2 (CAV-2) E1 'deletados' ($\Delta E1$) (Klonjowski *et al.*, 1997; Kremer, 1997; Kremer *et al.*, 2000;). Estudos anteriores mostraram que a utilização de vectores de CAV-2 permite obter títulos iguais ou melhores aos obtidos com vectores adenovirais humanos, livres de níveis detectáveis de CAV capazes de replicar autonomamente e uma razão partícula total : partícula infecciosa baixa. Mais importante, 49 em 50 amostras de soro testadas de indivíduos saudáveis não continham níveis detectáveis de anticorpos neutralizantes de CAV (Kremer *et al.*, 2000), e estes vectores, quando injectados em determinados tecidos, infectam preferencialmente neurónios (Kremer, 2004).

Tabela 2: Taxonomia dos Adenovírus Caninos e doenças características (adaptado de Jones *et al.*, 1997).

Família	Género	Tipo Espécie	Serótipo	Doenças características
<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadenovirus</i>	Canina	1	Doença de Rubarth/Hepatite canina
			2	Infecções no trato respiratório superior

Tal particularidade, tornam os vectores de CAV-2 potenciais ferramentas para o estudo e tratamento de doenças neurodegenerativas tais como distúrbios de armazenamento lisossómico, Parkinson, Alzheimer, Huntington, esclerose amiotrófica lateral e outras (Kremer, 2004).

Para corresponder ao aumento da procura de vectores adenovirais para programas de terapia génica, é necessário um desenvolvimento de processos de produção robustos, economicamente viáveis e passíveis de aumento de escala.

1.2 Desenvolvimento do processo de produção de adenovírus

Os métodos de preparação de vírus em laboratório incluem geralmente procedimentos que são morosos e difíceis de reproduzir quando se pretende uma produção em larga escala (Reece-Ford *et al.*, 2008).

A optimização de um bioprocesso para a produção de adenovírus para terapia génica ou vacinação têm como principais objectivos i) maximizar a produtividade viral por volume de cultura por unidade de tempo e simultaneamente minimizar o volume total de meio de cultura usado, e ii) obter uma suspensão viral uniforme e consistente para o processo de purificação.

A produtividade viral (por célula e volumétrica) depende da construção do vector adenoviral e da linha celular usada (célula hospedeira) para propagar o vírus. Em conjunto com o vector e a linha celular, a formulação do meio de cultura, a escala de produção e o sistema de cultura exigem a optimização e definição de parâmetros, dependentes de cada tipo de produto. Em geral todos os processos de produção de adenovírus iniciam-se na selecção da linha celular hospedeira, no seu crescimento até à concentração desejada para infecção seguidos da introdução de um stock adenoviral para iniciar a infecção e o ciclo de produção de vírus (Altaras *et al.*, 2005).

1.2.1 Meios de cultura para a produção de adenovírus

De um modo geral, o meio de cultura é primeiramente seleccionado e optimizado para o crescimento celular. Durante a infecção e a fase de produção, a taxa específica de consumo de

vários componentes do meio geralmente aumenta, e é necessário de ter isso em consideração na definição da formulação do meio de cultura.

O soro tem sido usado como suplemento dos meios de culturas para células animais há várias décadas, e têm na sua composição vários factores responsáveis pela adesão celular, aumento do crescimento e protecção celular. No entanto, o soro fetal é um potencial veículo de contaminantes e agentes patogénicos nomeadamente bactérias, fungos, vírus e príões.

Outra grande limitação para o uso de soro fetal bovino é a sua variabilidade entre lotes, que dificulta a padronização do meio de cultura e a reprodutibilidade. Adicionalmente, a suplementação com soro pode aumentar significativamente a complexidade e dificuldade em recuperar o produto-alvo e na purificação devido à presença de muitas proteínas e factores de crescimento, a maioria dos quais indefinidos (Castilho *et al.*, 2008).

Os meios de cultura definidos e especialmente formulados para dispensar a adição de soro eliminam todas estas limitações, e por isso cada vez mais se exigem processos de produção em meio de cultura sem soro nem aditivos de origem animal. Existem várias formulações comercialmente disponíveis e optimizadas para a produção de vírus de acordo com a linha celular produtora.

1.2.2 Crescimento e expansão celular

O objectivo da fase de expansão celular é maximizar o número de células viáveis disponíveis para infecção e conseqüente produção de vírus. Várias experiências de produções a alta densidade celular têm sido feitas, com o objectivo de obter a máxima produtividade possível (Ferreira *et al.*, 2005b)

Em cultura, as células animais podem crescer em suspensão ou aderentes a uma superfície, consoante a sua origem. A adesão é constituída por quatro fases: adsorção de factores de ligação à superfície de cultura, contacto entre as células e a superfície, adesão das células à superfície e crescimento das células aderentes, formando uma monocamada (GE Healthcare, 2005).

Assim dependendo do tipo de células e da escala necessária existem estratégias para o seu crescimento que utilizam sistemas estáticos ou agitados. Um sistema de cultura em suspensão (agitado) é o preferível porque o aumento de escala é facilitado e a área disponível de crescimento face ao volume de meio de cultura é maximizado.

Para culturas em suspensão em larga-escala, o sistema mais utilizado é o biorreactor de tanque agitado. Este sistema permite a optimização de parâmetros como o oxigénio dissolvido, CO₂,

pH e temperatura, que se traduzem em condições óptimas de crescimento celular e produtividade.

A estratégia capaz de propagar células tipicamente aderentes em “suspensão” utiliza a tecnologia de agregados celulares ou de microssuportes, os quais mantidos em suspensão oferecem a superfície necessária para o crescimento de células aderentes. Estes podem ser divididos em dois grupos: suportes não porosos, onde as células crescem em monocamada na superfície e suportes porosos que possuem canais onde as células crescem em multicamadas no interior.

Os suportes não-porosos são os mais utilizados para a produção de vírus, visto permitirem o máximo de contacto entre a célula e o vírus no momento da infecção. Estes suportes são esferas sólidas, geralmente de dextrano, dos quais os mais usados são o Cytodex 1[®] e Cytodex 3[®] (GE Healthcare). O Cytodex 3[®] possui uma camada adicional de colagénio desnaturado que permite uma melhor adesão de células mais exigentes (GE Healthcare, 2005).

1.2.3 O processo de infecção

Uma vez obtido o crescimento das células até à concentração celular pretendida, os parâmetros de processo são otimizados para maximizar a eficiência do ciclo de replicação do vírus. Nesta fase, o objectivo é definir os parâmetros de infecção de modo a assegurar que a multiplicidade de infecção (MOI) é reprodutível de ensaio para ensaio, assim como a cinética observada dessa infecção.

Além do anteriormente enunciado, a MOI óptima depende das propriedades do vírus, nomeadamente a razão partículas totais/partículas infecciosas e a estabilidade viral durante o armazenamento, manuseamento e processo de infecção.

A determinação da melhor MOI é feita no sentido de assegurar a infecção das células com um número adequado de partículas virais de modo a se obter valores máximos de produtividade volumétrica. Uma vez que as infecções adenovirais são relativamente rápidas e líticas, os processos são normalmente configurados a um ciclo de infecção com MOI igual ou maior a 1 para assegurar uma infecção sincronizada das células e um único ciclo de produção. Embora seja necessário o estabelecimento de MOI's superiores a 1, a infecção de células com mais vírus que o necessário exige um maior número de stock viral para a infecção não sendo garantido que este aumento seja proporcional à produtividade.

A produção de vírus líticos normalmente é feita em modo *batch* onde as células são infectadas num sistema fechado sem nova adição de meio novo durante a infecção. Recentemente têm

surgido estratégias de fed-batch e perfusão para aumentar a produtividade principalmente a altas densidades celulares (Ferreira *et al.*, 2005b).

1.2.4 Recolha dos vírus

O tempo de recolha óptimo dos vírus deve ser igualmente determinado para assegurar a máxima quantidade e qualidade de vírus obtida. O tempo ideal depende de vários factores: linha celular produtora, vírus, ciclo de replicação viral, estabilidade dos vírus, MOI e número de células infectadas. Neste ponto, é igualmente importante considerar a melhor estratégia de recolha: recolha dos vírus intracelulares; ou recolha dos vírus no sobrenadante, isto é, extracelulares se a perda para o sobrenadante for significativa. Para adenovírus, o título máximo de produção verifica-se normalmente às 40 hpi (horas pós infecção), optando-se normalmente pela recolha de vírus intracelulares entre as 36 h e 48 h. A recolha de vírus no sobrenadante normalmente é feita até às 72 hpi, aguardando-se pela lise completa das células (Ferreira *et al.*, 2005c).

A recolha apenas das fracções intracelulares pode ser preferível em algumas circunstâncias. As células de mamífero são cultivadas relativamente a baixa densidade, e a centrifugação pode ser facilmente usada para concentrar o produto aproximadamente 20 vezes (Altaras *et al.*, 2005). Esta concentração reduz os volumes a processar nas operações subsequentes. Além disso, se o meio de cultura contém hidrolisados de proteína ou soro, estes podem ser eliminados. No entanto, na maioria dos processos de produção em maiores escalas utilizam-se ambas as fracções na recolha dos vírus produzidos. Como métodos de lise celular em larga-escala são utilizados, por exemplo, choque osmótico e detergentes (Kamen & Henry, 2004).

Até aos dias de hoje, a produção de vectores de CAV-2 de primeira geração é feita à escala laboratorial em células DK em meio de cultura suplementado com soro utilizando sistema estático, isto é frascos de cultura de diferentes dimensões.

Este trabalho tem como objectivo otimizar a produção de CAV-2 em células MDCK, aprovadas pela FDA, em biorreactor de tanque agitado para facilitar os aumentos de escala. Dada as exigências cada vez maiores no estabelecimento de processos bem definidos e livres de produtos de origem animal, esta optimização passará também pela substituição para meio de cultura sem soro. A definição dos parâmetros optimizados à escala laboratorial neste trabalho permitirão a implementação de processos de produção de maior escala.

2. OPTIMIZAÇÃO E HARMONIZAÇÃO DE MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE CAV-2

Para prosseguir com ensaios clínicos de terapia génica recorrendo a vectores de CAV-2, será necessário estabelecer uma estratégia de produção e purificação que facilite a geração de stocks de vectores com títulos elevados. Para desenvolver e monitorizar estes processos, são necessários métodos rápidos e fiáveis para a quantificação de partículas de CAV-2. Normalmente os títulos virais são quantificados e expressos em partículas infecciosas (pi) e partículas totais (pt).

A determinação de partículas infecciosas é baseada na capacidade dos vírus infectarem uma linha celular permissiva, e tal é evidenciado pelo efeito citopático. Estes métodos tradicionais de titulação incluem ensaios em placas de 96 poços nomeadamente o *tissue culture infectious dose* (TCID₅₀) que determinam a quantidade de agente patogénico capaz de produzir mudanças patológicas em 50% das células inoculadas com base em diluições em série da amostra viral a determinar. A maior desvantagem deste método é a morosidade, isto é, o tempo necessário, para o efeito citopático se tornar evidente (aproximadamente duas semanas de cultura de vírus) (Segura *et al.*, 2009). Em alternativa podem ser utilizados ensaios baseados em transferência de genes, onde os vectores virais possuem um gene-repórter (ex.: GFP) e é feita a detecção das células que expressam o transgene. Este método possui duas vantagens em relação ao anterior: além de ter um menor erro de quantificação associado, permite efectivamente avaliar tanto a capacidade de entrada das partículas como a de expressão do transgene.

O número de partículas totais pode ser determinado por densidade óptica a 260 nm usando o método de Maizel. Este é um método rápido e capaz de determinar o número de partículas físicas em preparações de vírus purificadas. Infelizmente, não pode ser usado para determinar os títulos de preparações onde a concentração de partículas seja inferior a 3×10^{11} pt/mL devido ao limite de detecção do espectrofotómetro ou em amostras não purificadas devido à interferência na determinação na absorvância. Portanto este não é um método passível de ser utilizado no desenvolvimento ou monitorização de processos de produção sendo muito utilizado em amostras concentradas e já purificadas. O método alternativo corresponde à quantificação por PCR em tempo real ou quantitativo. Este método é considerado o método mais sensível e preciso para a determinação de DNA, e a determinação das partículas totais estabelece-se pela correlação entre DNA e partícula viral. Este método é independente da preparação onde se encontram os vírus, desde que se trabalhem com amostras de DNA purificadas.

A quantificação dos dois tipos de partículas é essencial. Se por um lado são as partículas infecciosas aquelas capazes de entregar o gene às células-alvo, a razão partículas totais:partículas infecciosas deve ser a mais baixa possível. Uma vez que as partículas totais são igualmente capazes de induzir resposta imunitária, a proporção irá ditar as doses administradas a pacientes e para efeitos legais de terapia génica o máximo permitido é de 30:1 (Dormond *et al.*, 2008).

Nesta sessão do trabalho pretende-se comparar e harmonizar as metodologias de protocolos utilizados entre os grupos parceiros do projecto BrainCAV e estabelecer standards de vírus bem caracterizados como referência entre os grupos. Para tal trocaram-se amostras de vírus produzidos, caracterizados e quantificados em diferentes laboratórios.

2.1 Materiais e Métodos

2.1.1 Linha celular e vírus

As células aderentes Dog Kidney (DK), já transfectadas estavelmente com o gene E1, e as alíquotas iniciais de vectores virais de CAV-2 (CAVGFP) foram fornecidas pelo Dr. Eric Kremer (Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, França). As células foram mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, Paisley, Reino Unido) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) (Gibco) a 37° C em atmosfera humidificada e 5% de CO₂.

2.1.2 Contagem de Células

2.1.2.1 Método do azul tripano

A determinação da concentração e viabilidade celular foi realizada por contagem directa ao microscópio óptico com objectivas de contraste de fase utilizando o método de exclusão do azul de tripano. Uma alíquota da suspensão celular, após coloração em azul tripano (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 0,1% (v/v) em PBS e numa diluição apropriada à contagem, foi colocada nas duas câmaras de contagem de um hemacitómetro Fuchs-Rosenthal (Brand, Wertheim, Alemanha) procedendo-se então à contagem. Neste método é possível distinguir as células viáveis (brilhantes e transparentes) das células não viáveis que, sendo permeáveis ao corante, ficam azuis.

2.1.3 Produção de Adenovírus

A produção dos adenovírus para a obtenção de stocks de trabalho foi realizada em placas de 148 cm² (Nunc, Roskilde, Dinamarca) utilizando a linha celular DK E1. As células com confluência de cerca de 80% foram infectadas com multiplicidades de infecção (MOI) 5, 10 ou 20 com vírus do stock existente. A infecção foi feita com substituição completa do meio de cultura por outro com a suspensão viral. A recolha dos vírus foi feita às 48 hpi para a MOI 5 e às 40 hpi para a MOI 20 e predominantemente intracelular, na qual as células foram raspadas num volume mínimo de sobrenadante. Inicialmente, a lise celular para obtenção dos vírus intracelulares foi feita por 3 ciclos de congelação/descongelação (gelo seco EtOH/banho a 37° C). Mais tarde, visto obter-se resultados iguais, o método foi substituído por solução de Triton X-100 a 0,1% (v/v) em Tris-HCl (Calbiochem, Califórnia, EUA) 10mM, pH 8. Por fim os vírus foram clarificados (para remoção dos fragmentos celulares) através de uma centrifugação (10 min, 3000 g) ficando então no sobrenadante.

2.1.4 Purificação por ultracentrifugação em gradiente de CsCl₂

A purificação dos adenovírus foi realizada por ultracentrifugação em gradientes de CsCl₂ (Calbiochem) em PBS, pH 7. O primeiro gradiente de CsCl₂ é descontínuo. Este foi realizado em duas soluções de CsCl₂ – 1,25 g/mL e 1,45 g/mL – de modo a obter duas fases distintas. Os vírus clarificados foram adicionados no topo do gradiente e centrifugados 90 min a 35000 rpm a 18° C em rotor SW 41 Ti (Beckman, Califórnia, EUA). Após a centrifugação procedeu-se à recolha da(s) banda(s) (fig. 2). No segundo gradiente, a(s) banda(s) recolhida(s) no gradiente anterior foram novamente centrifugadas numa solução de CsCl₂ 1,32 g/mL a 35000 rpm, durante 18 h, 18° C e recolhidas separadamente. A banda inferior com densidade 1,313 g/cm³, que corresponde aos vírus completos, foi a utilizada para prosseguir. A remoção do cloreto de céσιο foi realizada por diálise em coluna HiPrep 26/10 de-salting com equipamento AKTAexplorer (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), sendo os vírus recolhidos através da adição de PBS. À solução com

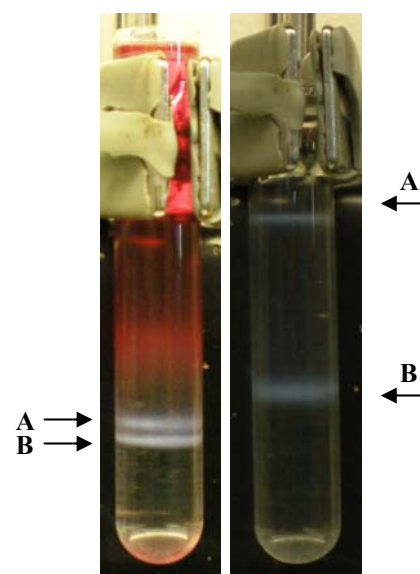


Fig. 2: Bandas após centrifugação. A banda A corresponde a cápsides vazias/vírus mal formados e B aos vírus completos. No gradiente descontínuo (esquerda) as bandas estão muito juntas, e para não perder vírus, recolheram-se as bandas em conjunto. No gradiente contínuo (direita) estas já aparecem mais separadas.

os vírus foi adicionado glicerol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) para concentração final de 10% (v/v) e o conjunto filtrado por filtros 0,2 µm (Pall Corporation, Michigan, EUA). Finalmente os vírus foram divididos em alíquotas e armazenados a -85° C.

2.1.5 Titulação de Adenovírus

O título infeccioso dos vectores foi determinado pela capacidade de infecção de células aderentes e expressão da proteína verde fluorescente. O título de partículas totais foi determinado pela quantificação do DNA viral quer por OD₂₆₀, quer por PCR quantitativo.

2.1.5.1 Titulação de partículas infecciosas

A determinação da concentração de partículas infecciosas foi realizada por infecção das células alvo. As células ficam fluorescentes quando infectadas devido à expressão da GFP.

Uma quantidade definida de células aderentes foi infectada com diluições sucessivas (de 10 em 10 e/ou de 2 em 2) e em duplicado dos vírus em questão. 24 horas pós infecção (hpi) as células foram tripsinizadas e suspensas em DPBS (Gibco) 5% (v/v) FBS e a quantidade de células fluorescentes determinada por citometria de fluxo (CyFlow Space, Partec, Alemanha). As diluições consideradas para cálculo do título foram aquelas que apresentaram menos de 30% de células fluorescentes, percentagem até onde é garantido que um vírus infecta *apenas* uma célula (Nadeau *et al.*, 2000). O título foi calculado tendo em conta a percentagem de células infectadas, o número total de células que foi submetido à infecção viral, a diluição e o volume de vírus utilizado para infectar as células.

2.1.5.2 Quantificação de partículas totais por espectrofotometria

A concentração de partículas de CAV-2 em preparações purificadas foi determinada por densidade óptica de acordo com o método de Maizel (Segura *et al.*, 2009), onde uma OD₂₆₀ de 1.0 corresponde a uma concentração de 1.1×10^{12} partículas físicas/mL. Resumidamente, amostras CAV-2 foram diluídas em tampão de lise (SDS (Sigma-Aldrich) 0,1% (p/v) e EDTA (Merck) 1mM em Tris-HCl (Sigma-Aldrich) 10 mM, pH 7,4), incubadas durante 10 min a 56° C e a densidade óptica medida a 260 nm.

2.1.5.3 Quantificação de partículas totais por PCR em tempo Real ou PCR Quantitativo

O DNA viral foi extraído utilizando o kit de extracção ‘Roche High Pure Viral DNA kit’ (Roche Diagnostics, Alemanha).

Os *primers forward* (5'-CAGAAGAACGGCATCAAGGT-3') e *reverse* (5'-CTGGGTGCTCAGGTAGTGG-3') foram desenhados contra o gene que codifica para a proteína GFP e sintetizados por TIB MOLBIOL (Alemanha).

Foi feita uma curva-padrão em todas as corridas a partir de diluições sucessivas de um plasmídeo contendo o gene da GFP (peGFP).

Para as quantificações por PCR utilizou-se o kit '*Ligth Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit*' (Roche Diagnostics). Para a reacção PCR foi feita uma *mastermix* com os seguintes componentes: 2 µl *Sybr Green hot start mix*; 1,6 µl MgCl₂ (25 mM) para concentração final de 2 mM; 0,5 µl de ambos os *primers* para concentração final de 0,5 µM e 13,4 µl de água. A cada capilar foi adicionado 2 µl de DNA e 18 µl de *mastermix*. A corrida foi feita no termociclador LightCycler (Roche Diagnostics) com o seguinte programa: desnaturação a 95° C durante 10 min, amplificação e quantificação repetido 45 vezes (95° C durante 10 s; 58° C durante 5 s; e 72° C durante 6 s), obtenção de curvas de melting (95° C durante 0 s; 65° C durante 15 s e 95° C durante 0 s) e arrefecimento (40° C durante 30 s). Os resultados foram adquiridos e tratados no software LightCycler (Roche Diagnostics).

2.2 Resultados e Discussão

2.2.1 Titulação de partículas infecciosas

Nas quantificações realizadas no nosso laboratório obtiveram-se títulos cerca de 10 vezes inferiores àqueles obtidos por parceiros do projecto para as mesmas amostras. Para harmonizar esta diferença foram analisadas as diferenças existentes entre os dois métodos de titulação.

A metodologia utilizada para a quantificação de partículas infecciosas a partir da expressão de GFP por parceiros do projecto distinguia-se da utilizada no nosso laboratório em dois pontos: na altura da determinação da quantidade de células infectadas, em que os parceiros a efectuam na altura da determinação da percentagem de células infectadas (24 hpi) e o nosso laboratório na altura da infecção, e na agitação do tipo orbital das placas a titular durante o período de infecção, isto é, 24 h.

Tendo em conta que a infecção cessa o crescimento celular, e que a agitação permitirá uma maior homogeneidade na infecção das células, espera-se que as diferenças dos títulos estejam relacionados com a agitação.

Uma vez que se pretende passar a utilizar como produtoras células MDCK em vez de DK no desenvolvimento do bioprocesso, é igualmente importante avaliar o efeito da linha celular na titulação de CAV-2.

De acordo com os resultados obtidos, a contagem de células foi equivalente tanto na altura da infecção como às 24 hpi. Por outro lado, a agitação aumentou 3 vezes ($\pm 0,4$) o título de partículas infecciosas. Os títulos obtidos foram equivalentes para as duas linhas celulares. A tabela 3 resume os resultados obtidos.

Tabela 3: Efeito da agitação e da linha celular hospedeira na quantificação do título de partículas infecciosas.

Stock	Células	Com agitação (pi/mL)	Sem agitação (pi/mL)	rela�o agitação/sem agitação
Stock A	DK	$5,15 \times 10^9$	$1,62 \times 10^9$	3,3
	MDCK	$2,99 \times 10^9$	$9,10 \times 10^8$	3,2
Stock B	DK	$1,48 \times 10^{10}$	$5,16 \times 10^9$	2,3
	MDCK	$1,43 \times 10^{10}$	$6,39 \times 10^9$	3,5

Embora em termos ideais a agitação deveria corresponder a um aumento de cerca de 10 vezes no título de partículas infecciosas obtido, a agitação contribuiu para a diferença observada entre laboratórios diminuir para aproximadamente 3 vezes. Concluiu-se assim que para harmonizar os métodos todos os laboratórios deveriam proceder a titulação com agitação.

2.2.2 T tulaç o de partículas totais

O protocolo de quantificação de partículas totais efectuada pelos diferentes parceiros   idêntico ao utilizado no nosso laboratório: OD₂₆₀ e PCR em tempo Real. O método da densidade óptica foi feito da mesma forma e os resultados são equivalentes entre parceiros. No que diz respeito ao PCR em tempo real existiam algumas diferenças no programa de PCR e no padrão utilizado para a quantificação: o nosso laboratório utilizava um plasmídeo com o gene da GFP os parceiros um plasmídeo com o genoma do vector CAVGFP (Segura *et al.*, 2009). Foi então testado e optimizado o programa utilizado por outros parceiros adaptando os parâmetros de acordo com as especifica es do nosso equipamento. As diferenças na *mastermix* foram as seguintes: 2,5 μ l MgCl₂ (25 mM) para concentração final de 2,5 mM; 3 μ l de ambos os *primers* para concentração final de 0,3 μ M e 7,5 μ l de  gua. O programa utilizado foi o seguinte: desnaturação a 95  C durante 10 min, amplificação e quantificação repetido 45 vezes (95  C durante 0 s; 65  C durante 10 s; e 72  C durante 15 s), obten o de

curvas de melting (95° C durante 0 s; 70° C durante 15 s e 95°C durante 0 s) e arrefecimento (40° C durante 60 s).

Como primers utilizam um conjunto correspondente à extremidade 3' do gene pVI e 5' da região que codifica para os hexões (*primer forward* 5'-CGTGAAGCGCCGTAGATGC.-3'; *primer reverse* 5'-GAACCAGGGCGGGAGACAAGTATT-3').

Os resultados mostraram que os títulos obtidos com os dois PCRs são semelhantes (tabela 4).

Tabela 4: Quantificação de partículas totais da mesma amostra pelos dois PCRs.

Stock	PCR 1	PCR 2
Stock C	8,01x10 ¹¹ pt/mL	5,08x10 ¹¹ pt/mL

PCR1 – PCR que tem como alvo o gene para a GFP; PCR 2 – PCR que tem como alvo a região 3' pIV-hexão 5'.

Tendo em conta a possibilidade da existência de partículas com enpacotamento incompleto do DNA viral, a possibilidade de quantificação destas partículas incompletas é maior com o nosso protocolo uma vez que este quantifica um gene existente na região inicial do genoma do vector. Por isso, foram implementadas estas alterações no protocolo de quantificação de partículas totais por PCR.

3. CARACTERIZAÇÃO DOS VECTORES VIRAIS PRODUZIDOS EM CÉLULAS DK E MDCK

Para garantir que as células produtoras não interferem nas características dos vírus, foi comparada a morfologia, o perfil de proteínas, as dimensões e o potencial zeta de vírus produzidos em DK E1 e em MDCK E1 e em preparações purificadas.

Um dos maiores desafios na purificação de adenovírus é a remoção de cápsides virais sem conteúdo genómico ou incompleto designadas de cápsides vazias do meio de produção, uma vez que estas, além de interferirem na expressão do transgene por competirem para os mesmos receptores da superfície das células utilizados pelos vectores completos, contribuem para o aumento de antigénio, o que pode levar a uma resposta imunitária mais forte (Urabe *et al.*, 2006). Tendo em conta que o tamanho e a constituição superficial entre estas partículas e os vírus completos não são significativamente diferentes, o desenvolvimento de metodologias para eliminar as cápsides vazias abaixo de um nível detectável torna-se um aspecto crítico na purificação (Altaras *et al.*, 2005). Durante a purificação por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο esta população de partículas origina uma banda de densidade 1,288 g/cm³ que é normalmente descartada. Com o objectivo de desenvolver um processo de purificação escalável que minimize a presença de cápsides vazias, caracterizou-se não só os vírus completos mas também as cápsides vazias.

3.1 Materiais e Métodos

3.1.1 Linhas celulares e vírus

As células DK E1 foram mantidas nas condições descritas em 2.1.1. As células MDCK E1, derivadas de MDCK (ECCAC, Nr 841211903), após transfectadas estavelmente foram adaptadas em meio optiPRO SFM (Gibco) suplementado com 4 mM de glutamina (Gibco). A produção e purificação dos vírus foram feitas como descrito em 2.1.3 e 2.1.4 com MOI 5 em que também foi recolhida a banda correspondente às cápsides vazias. Os vectores virais utilizados para a produção foram fornecidos pelo Dr Miguel Chillón (Universitat Autònoma de Barcelona, Espanha). Os ensaios seguintes foram feitos com os dois grupos de partículas obtidos nas duas linhas celulares.

3.1.2 Morfologia dos vectores CAV-2

A morfologia dos CAV-2 foi observada por microscopia electrónica. Foram colocados 3 µl de cada amostra numa grelha para microscopia electrónica (Electron Microscopy Sciences, Pensilvânia, EUA). A grelha foi mergulhada em acetato de uranilo (Sigma-Aldrich) a 1%

(v/v), deixou-se secar durante 1 min e retirou-se o excesso com papel de filtro. Este último procedimento foi repetido 3 vezes. A observação da grelha foi feita com um microscópio electrónico Morgani 268 (FEI Company, Brno, República Checa).

3.1.3 Perfil Proteico por SDS-PAGE

O conteúdo de proteína total das partículas virais em preparações purificadas foi quantificado utilizando um kit BCA 23225 de Pierce (protocolo de placas de 96 poços). Os vírus foram precipitados em etanol absoluto (Panreac, Barcelona, Espanha) a -20°C durante uma noite, centrifugados a $10\,000\text{g}$ durante 10 min e concentrados no tampão de carregamento do gel de SDS-PAGE para quantidades finais de 30 mg de proteína por volume total de tampão a colocar no gel. O SDS-PAGE foi feito de acordo com o protocolo NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini Gels usando o equipamento Xcell SureLock™ (Invitrogen, Califórnia, EUA).

3.1.4 Dimensões e medidas electrodinâmicas

O tamanho e o potencial zeta foram determinados por *dynamic light scattering* (DLS) usando Zetasizer Nano-ZS Series ZEN3600 equipado com um laser He-Ne de 633nm (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). O potencial zeta foi medido a 40 μl de amostra diluída em 660 μl de tampão fosfato 10 mM (Sigma-Aldrich) em valores de pH entre 3 e 10 em cuvettes 10x10 mm de poliestireno (Sarstedt, Newton, EUA) utilizando uma dip-cell (Malvern). A dimensão das partículas foi determinada em semelhante modo a pH 8.

3.2 Resultados e Discussão

3.2.1 Morfologia e Perfil de proteínas das partículas

A morfologia das diferentes partículas foi observada por microscopia electrónica. À semelhança do que acontece em adenovírus humanos, os vírus completos têm um aspecto diferente das cápsides vazias em que os vírus mantêm a forma icosaédrica e as cápsides vazias aparecem mais arredondadas (fig.3).

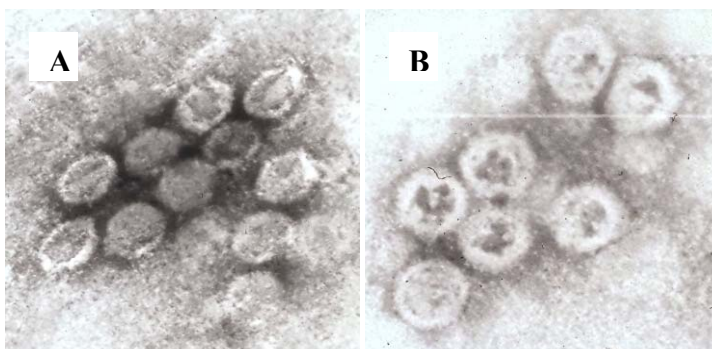


Fig. 3: Vírus completos (A) e cápsides vazias (B) recolhidos da banda de $1,313\text{ g/cm}^3$ e $1,288\text{ g/cm}^3$, respectivamente, e obtidos a partir de células DK E1. Repare-se na forma mais arredondada e no centro escuro característico das cápsides vazias. Ampliação: 125 000x.

A morfologia do mesmo tipo de partículas é idêntica em ambas as linhas celulares e ao longo das grelhas observadas não se verificaram cápsides vazias nas amostras correspondente aos vírus completos e vice-versa.

No que diz respeito ao SDS-Page, os resultados mostram que os vírus produzidos em ambas as células possuem o mesmo perfil de proteínas (fig. 4). Observa-se também que o perfil das cápsides vazias é diferente do observado nos vírus completos. Estas diferenças, nas quais as cápsides vazias possuem pelo menos mais 5 bandas que os vírus completos, à semelhança do observado em adenovírus humanos, podem corresponder a proteínas que não foram clivadas pela protease codificada pelo vírus e que por isso não se apresentam em vírus maduros completos (Takahashi *et al.*, 2006). Deve salientar-se que a menor intensidade observada nas bandas das amostras de partículas produzidas em MDCK deve-se a menor quantidade de proteína total carregada no gel.

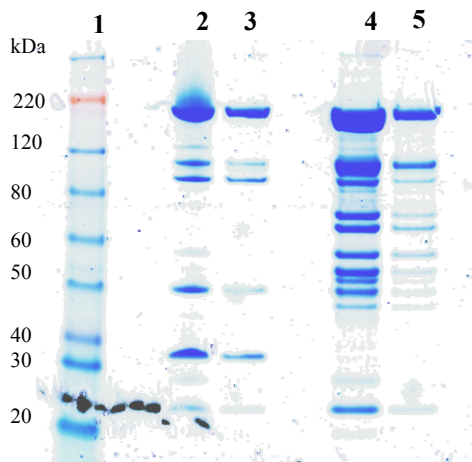


Fig. 4: Perfil proteico obtido por SDS-PAGE para vírus e cápsides vazias obtidos em DK E1 e MDCK E1. Legenda: **1**-Marcador de pesos moleculares; **2**-vírus produzidos por DK E1; **3**-vírus produzidos por MDCK E1; **4**-Cápsides vazias produzidas por DK E1; **5**-Cápsides vazias produzidas por MDCK E1.

3.2.2 Dimensões dos vírus e potencial Zeta

No que diz respeito às dimensões dos vírus, a diferença também não é significativa (tabela 5). Observa-se também que as cápsides vazias possuem tamanho semelhante ao dos vírus, particularidade que impossibilita a purificação baseada nesta característica.

Tabela 5: Tamanho das partículas virais e cápsides vazias.

amostra	CAV-2		Cápsides vazias	
	MDCK	DK	MDCK	DK
diâmetro (nm)	115,2	115,8	113,9	114,2

O potencial zeta permite observar as cargas à superfície das partículas a diferentes valores de pH, o que indica que partículas com potenciais zeta diferentes, isto é, com cargas superficiais

diferentes, em termos de constituição serão igualmente diferentes (Zetasizer manual, 2004). Tal como observado no tamanho os mesmos vírus completos possuem o mesmo ponto isoeléctrico (fig. 5). A não-homogeneidade do potencial zeta após o ponto isoeléctrico para partículas iguais (vírus-DK:vírus-MDCK e cápsides vazias-DK:cápsides vazias-MDCK) deve-se provavelmente ao erro inerente à técnica. Apesar disso observa-se que o potencial Zeta a partir do ponto isoeléctrico entre partículas iguais demonstra a mesma tendência. Os resultados apresentados mostraram não existir diferenças entre os vírus produzidos nas diferentes células. As diferenças existentes no potencial zeta entre as cápsides vazias e os vírus permitem avançar com algumas estratégias para o desenvolvimento de processos de purificação escalável, e que obedeça aos requerimentos da *Food and Drug Administration* (FDA) e *European Medicines Agency* (EMA), nomeadamente cromatografia por troca iónica. A purificação por ultracentrifugação em gradientes de CsCl_2 não é um processo passível de aumento de escala nem preenche esses requisitos.

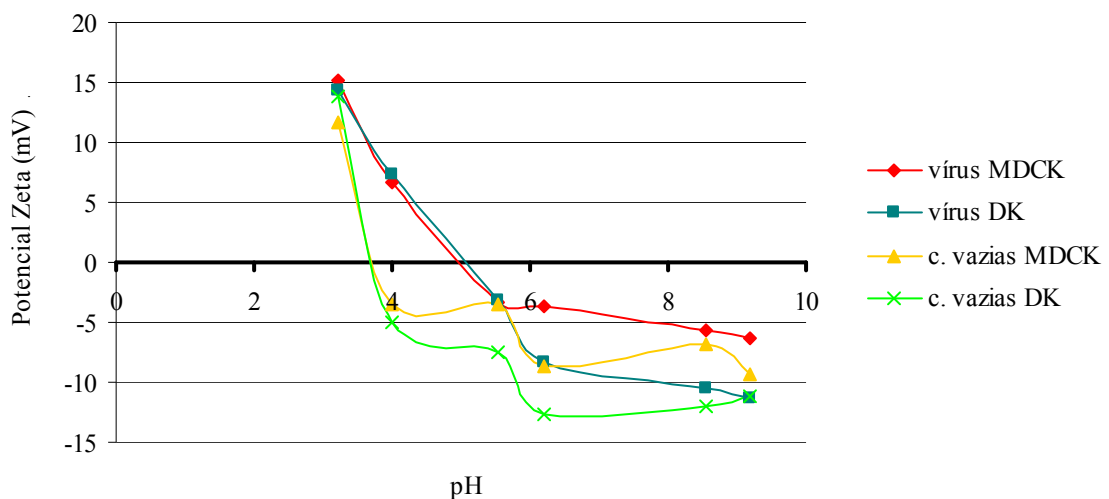


Fig. 5 Efeito do pH no potencial Zeta e ponto isoeléctrico dos vírus e cápsides vazias obtidos nas diferentes células estudadas.

4. ESTRATÉGIAS DE CULTURA DE CÉLULAS MDCK EM SUSPENSÃO UTILIZANDO MEIOS DE CULTURA COM E SEM SORO

Os sistemas agitados constituem o método de cultura e produção mais convenientes para a maioria dos sistemas biológicos devido à sua simplicidade, fácil controlo e aumento de escala, baixo custo, e redução da área de produção.

Neste estudo foram avaliados o efeito da expressão do gene E1 nas células produtoras e o efeito do meio de cultura sem soro na sua capacidade de crescimento das células e na sua passagem para sistemas agitados.

Uma vez que não foram bem sucedidas as várias tentativas adaptação do crescimento das células em suspensão como células isoladas, prosseguiu-se com uma estratégia em que células tipicamente aderentes podem ser cultivadas em sistemas agitados recorrendo à utilização de microsuportes que garantem à célula superfície de adesão.

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Linhas celulares e condições de cultura

Foram utilizadas células DK E1 nas condições descritas em 2.1.1. As células MDCK e os clones MDCK E1 106 e MDCK E1 139 foram mantidos em MEM (Sigma-Aldrich) com 10% (v/v) FBS (Gibco), 2 mM de glutamina (Gibco) e 1% (v/v) de aminoácidos não-essenciais (Sigma-Aldrich). Após adaptação estas células foram igualmente mantidas em meios sem soro ExCell MDCK SFM (Sigma-Aldrich) e optiPRO SFM (Gibco) suplementados com 6 mM e 4mM de glutamina, respectivamente.

4.1.2 Estudos de crescimento celular em T-flasks

Para os estudos em T-flask 25 cm² (Nunc) as células foram inoculadas com uma concentração inicial de 1x10⁴ células/cm² em 10 mL de meio de cultura em T-flasks suficientes para se observar a curva de crescimento. A concentração celular em suspensão (no sobrenadante da cultura) e aderente de um *T-flask* 25 cm² foi determinada diariamente. Para a obtenção de uma suspensão das células aderentes recorreu-se a uma solução de Tripsina-EDTA 0,05% (Gibco).

4.1.3 Estudos de crescimento celular em spinners

Para a cultura de células em sistema agitado utilizaram-se spinners de 125 mL com agitação (Wheaton Science Products, Millville, USA) e dois tipos de suportes do tipo não poroso, designados comercialmente como Cytodex 1[®] e Cytodex 3[®] (ambos GE Healthcare).

Para evitar a adesão de suportes ao vidro todos os *spinners* foram previamente siliconizados com dimetildiclorosilano e lavados de seguida com tolueno (ambos da Merck).

Após hidratação em DPBS (Gibco), os suportes foram esterilizados e novamente lavados com DPBS estéril. Adicionou-se meio de cultura aos suportes, que foram colocados na incubadora para estabilizar a temperatura e pH. Preparou-se então, o inóculo de células de acordo com o protocolo de subcultura e adicionou-se aos *spinners* de acordo com a concentração celular final desejada.

Após a inoculação com 80 mL, o *spinner* foi colocado na incubadora e agitado manualmente 1 minuto, em intervalos de 15 min, durante 2 h, para promover a distribuição homogénea das células pelos suportes. Após isso foi adicionado meio de cultura para perfazer o volume total de cultura, o *spinner* foi colocado na incubadora com agitação de 50 rotações por minuto (rpm). Os ensaios decorreram durante o tempo necessário para se observar a curva de crescimento e a diminuição da viabilidade celular.

4.1.4 Contagem de Células

4.1.4.1 Método do azul tripano

A concentração e viabilidade celular foram determinadas como descrito em 2.1.2.1.

4.1.4.2 Método de contagem de núcleos em violeta de cristal

Para determinar a concentração celular em suportes nos estudos realizados em *spinner* recorreu-se inicialmente ao método de contagem dos núcleos em violeta de cristal. Este método geralmente é utilizado para a determinação da concentração de células em suportes, em que a desagregação destas afecta a sua viabilidade.

Deixou-se sedimentar os suportes presentes na amostra recolhida do *spinner* e recolheu-se o sobrenadante. Adicionou-se igual volume retirado de solução de violeta de cristal a 0,1% (p/v) (Merck), em ácido cítrico (Merck) 0,1 M e detergente Triton X-100 (Sigma-Aldrich) a 1% (v/v). A mistura foi bem homogeneizada em vortex e incubada a 37°C durante alguns minutos, de modo a permitir a lise total das células e a acumulação do corante nos núcleos. Este método de contagem não possibilita a contagem de células não-viáveis, e foi mais tarde substituído recorrendo a uma tripsina-EDTA 0,25% (Gibco) em que se verificou que a viabilidade celular era mantida. O processo utilizado foi semelhante para a contagem de núcleos, no qual após sedimentação dos suportes com as células aderentes, foi retirado o sobrenadante, os suportes foram lavados com DPBS, e submetidos à tripsina. Após a tripsinização das células, procedeu-se à contagem de acordo com o descrito em 2.1.2.1.

4.2 Resultados e Discussão

4.2.1 Efeito da expressão de E1 no crescimento celular

Para avaliar o efeito da expressão de E1 nas células estavelmente transfectadas foram realizados estudos de crescimento destas células e comparando com a linha celular original em t-flasks. Este estudo foi feito para dois clones de células MDCK transfectadas com a E1: MDCK E1 106 e MDCK E1 139 em meio MEM 10% (v/v) FBS.

Os resultados mostram que as células produtoras possuem a mesma taxa específica de crescimento atingindo a mesma concentração máxima celular que a linha celular original (fig. 6 e tabela 6).

De acordo com este estudo, observa-se que a expressão de E1 por si só não alterou as funções *housekeeping* das células, uma vez que são em tudo semelhantes.

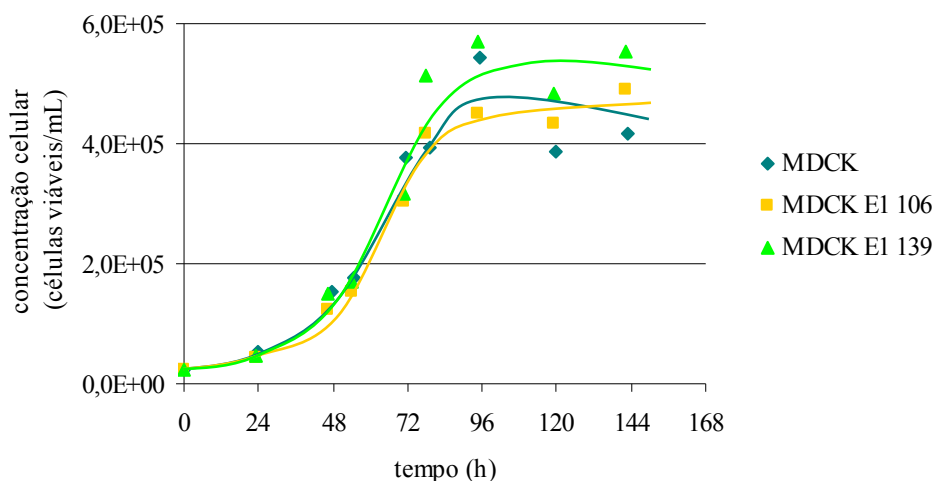


Fig. 6: Curva de crescimento de MDCK, MDCK E1 106 e MDCK E1 139.

Tabela 6: Taxa específica de crescimento e concentração máxima de células viáveis obtidas durante a curva de crescimento.

	Taxa específica de crescimento celular – $\mu(\text{h}^{-1})$	Conc. celular máxima (10^5 células/mL)
MDCK	$0,0398 \pm 0,0003$	$5,7 \pm 0,6$
MDCK E1 106	$0,0393 \pm 0,0006$	$5,4 \pm 0,5$
MDCK E1 139	$0,0412 \pm 0,0001$	$4,5 \pm 0,5$

μ : valor \pm o erro associado ao declive calculado pelo método dos mínimos quadrados;

densidade celular máxima: valor \pm 10% erro associado ao método de contagem.

4.2.2 Efeito da composição do meio de cultura no crescimento celular

De maneira a obter altas concentrações celulares para a produção de vírus, foi avaliado o crescimento celular de MDCK E1 em dois meios de cultura formulados para dispensar a adição de soro em sistema estático. Seleccionaram-se as células MDCK E1 106 para o ensaio. Os resultados mostraram que o meio optiPRO permitiu obter um número de células máximo de $1,9 \times 10^6$ células/mL, enquanto que no meio ExCell foi obtido aproximadamente $0,9 \times 10^6$ células/mL, valores superiores aos obtidos em meio MEM 10% (v/v) FBS (fig. 7). A taxa específica de crescimento celular em optiPRO foi ligeiramente inferior à obtida com meio MEM 10% (v/v) FBS e duas vezes maior que a obtida com o meio ExCell (tabela 7). A inexistência da fase exponencial característica observada na curva de crescimento celular obtida com meio ExCell pode ser explicada pela sensibilidade a baixos inóculos nas passagens e por uma fase de adaptação às novas condições do meio de cultura bastante longa. Além disso, observaram-se alterações morfológicas das células em crescimento que se caracterizam pela forma arredondada, acabando por aumentar apenas em tamanho.

Tabela 7: Taxa específica de crescimento e densidades máximas obtidas durante a curva de crescimento.

	Taxa específica de crescimento celular – $\mu_{\text{crescimento}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Conc. celular máxima (10^6 células/ml)
MDCK E1 em optiPRO	$0,0231 \pm 0,0006$	$1,9 \pm 0,2$
MDCK E1 em ExCell	$0,010 \pm 0,001^*$	$0,9 \pm 0,1^*$
MDCK E1 em MEM c/ soro	$0,0393 \pm 0,0006$	$5,4 \pm 0,5$

* Para as células adaptadas a ExCell não se verificou uma verdadeira fase exponencial. Os erros correspondem ao desvio-padrão associado ao declive calculado pelo método dos mínimos quadrados.

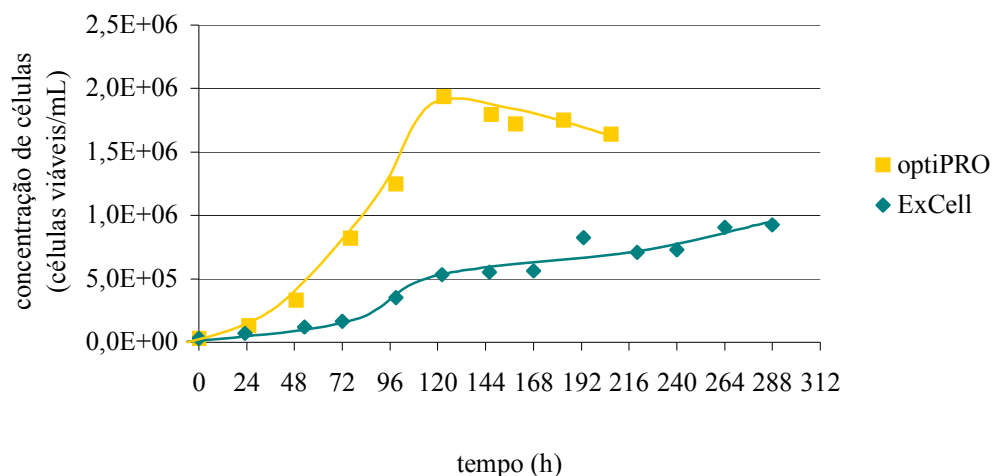


Fig. 7: Curva de crescimento de células MDCK E1 106 adaptadas a meio optiPRO e meio ExCell.

4.2.3 Efeito da concentração do inóculo na concentração máxima de células obtidas em sistema agitado

Esta parte do trabalho teve como objectivo avaliar a influência da concentração do inóculo inicial de células na concentração máxima de células obtida em meio MEM 10% (v/v) FBS e meio optiPRO.

Um conjunto de estudos efectuados anteriormente no laboratório indicam como condições óptimas a utilização de 2 mg/mL de Cytodex 1[®] e 1×10^5 células/mL para a cultura de células MDCK em microssuportes com meio MEM 10% (v/v) FBS onde se conseguiu obter uma concentração celular máxima de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células/mL. No caso do meio optiPRO foram testados o Cytodex 3[®], suportes recomendados para condições livres de soro, e o Cytodex 1[®], suportes mais acessíveis do ponto de vista económico. Uma vez que o crescimento em meio optiPRO foi superior a 1×10^6 células/mL e que a uma concentração de suportes de 2 mg/mL estes se apresentaram demasiado confluentes, a concentração de suportes foi aumentada para 3 mg/mL. As concentrações celulares de inóculo testadas foram 1×10^5 células/mL e 2×10^5 células/mL para ambos os meios.

Para o meio MEM 10% (v/v) FBS, os resultados mostraram que a concentração celular máxima obtida em *spinner* foi idêntica para ambos os inóculos estudados e comparável ao observado previamente no laboratório. Estes dados indicam que 1×10^5 células/mL é o melhor inóculo uma vez que permite uma maior expansão celular.

Para a inoculação em meio optiPRO adicionou-se 5% (v/v) FBS, uma vez que não se verificou a adesão aos suportes e consequentemente não houve crescimento das células adaptadas a este meio. Após 24 horas, e verificando-se adesão das células, o meio de cultura foi substituído com lavagem prévia das células aderentes aos suportes com DPBS. Para além de as células terem aderido com sucesso, estas foram igualmente capazes de se multiplicar em meio optiPRO sem soro o que indica que o soro é apenas necessário para a adesão das células e não para o crescimento destas (fig. 8).

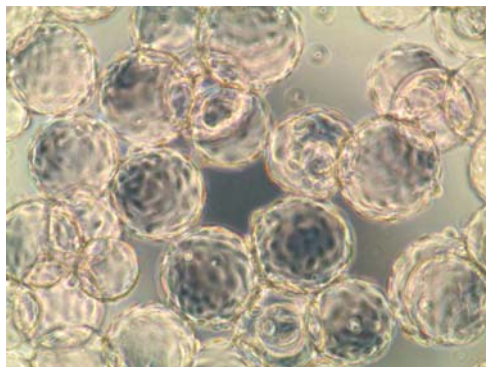


Fig. 8: Microssuportes Cytodex 1[®] confluentes por células MDCK E1 adaptadas a optiPRO. Ampliação: 100x.

Uma vez que o objectivo final é o desenvolvimento de um processo em condições livres de soro, neste sentido será necessário procurar outras soluções para a adesão das células aos suportes. Nos meios sem soro é comum o uso de aditivos como insulina e transferrina e técnicas de revestimento de suportes com compostos, como a fibronectina, para promover a adesão (GE Healthcare, 2005; Varani *et al.*, 1993). Embora muitos dos aditivos tenham origem animal e algumas técnicas de revestimento sejam do ponto de vista económico e de execução impraticável a larga-escala, uma alternativa ao uso de soro na adesão passará pelo desenvolvimento de uma estratégia baseada nestes métodos, nomeadamente em utilizar proteínas recombinantes (Varani *et al.*, 1993), que será abordada em trabalho futuro.

No que diz respeito ao crescimento das células em meio optiPRO, o melhor inóculo correspondeu a 2×10^5 células/mL onde se conseguiu obter a concentração de células de cerca de 1×10^6 células/mL. O crescimento foi independente do microsuporte utilizado (fig. 9).

Uma vez que o meio optiPRO foi substituído 24 horas após a inoculação para retirar o soro necessário à adesão das células aos suportes, fez-se um ensaio para o inóculo 1×10^5 células/mL no qual não se mudou o meio no dia a seguir para verificar se é esta mudança do meio que permite as células atingirem concentrações celulares superiores mas também como forma de facilitar o processo de produção no sentido de diminuir as manipulações e torná-lo economicamente mais viável.

Verificou-se que nos suportes onde se mudou o meio a adesão de novas células formadas não foi tão bem sucedida como aquela em que o soro foi mantido, e daí a diferença na concentração celular máxima obtida com o inóculo 1×10^5 células/mL.

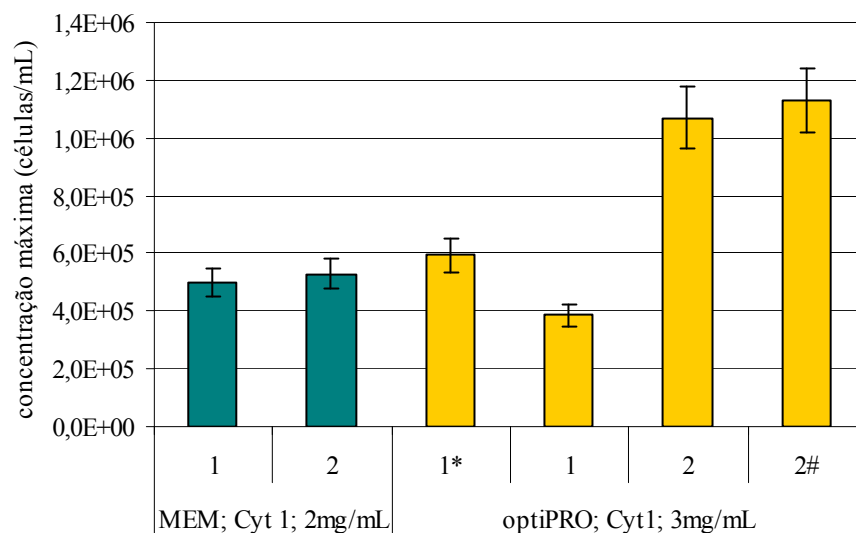


Fig. 9: Concentração máxima obtida nos inóculos 1 e 2 ($\times 10^5$ células/mL) de células MDCK E1 em meio de cultura MEM e optiPRO. #Cytodex 3; *Sem substituição de meio. Os erros correspondem a 10% associado ao método de contagem de células.

Estes resultados tanto demonstraram que a mudança de meio não é crítica para as concentrações máximas celulares obtidas, como o facto que deve existir um número mínimo de células por suporte para a expansão ser bem sucedida na ausência de soro, número esse que é conseguido com o inóculo 2×10^5 células/mL. De qualquer forma, e sem outra estratégia para retirar o soro do sistema de cultura até à data, esta substituição do meio torna-se indispensável para que o desenvolvimento de purificação esteja de acordo com as exigências para terapêuticos humanos (Peixoto *et al.*, 2006).

4.2.4 Estratégias de inoculação baseadas em migração entre suportes

Durante os estudos de crescimento, observavam-se “pontes” onde populações de células de suporte confluentes migravam começando a preencher suportes ainda vazios. A capacidade de migração das células aderentes para novos suportes, já descrito para outras células, é algo que facilita o aumento de escala e a inoculação de reactores contendo suportes vazios com suportes confluentes e evita os danos fisiológicos que resultam das técnicas utilizadas para passagens de células aderentes que requerem a utilização de enzimas proteolíticas, como a tripsina, seguidas de adição de inibidores enzimáticos (Wang & Ouyang, 1999; Pohlscheidt *et al.*, 2008). Nesta parte do trabalho pretendeu-se verificar a hipótese de transferência suporte-para-suporte em meio sem soro como forma de ultrapassar a limitação no uso deste e tornar possível o processo de produção livre de soro. Foram adicionadas 2×10^5 células/mL em meio optiPRO a dois spinners com 3 mg/mL dos dois tipos de suportes: Cytodex 1[®] e Cytodex 3[®], respectivamente. Ao spinner com Cytodex 1[®] o meio foi suplementado com 5% (v/v) FBS e o spinner com Cytodex 3[®] não se adicionou soro, uma vez que este não é tão crítico para a adesão celular a estes suportes.

A migração só ocorreu no meio suplementado com soro, o que mostra mais uma vez a importância do soro na adesão das células a novos suportes. No entanto, apesar de se observar migração, a homogeneidade no que diz respeito à distribuição das células por suporte foi bastante baixa, onde se observou uma preferência das células agregarem entre suportes já preenchidos (algo que se observava a olho nú) em vez de migrarem para suportes novos. De qualquer modo esta expansão directa poderá vir a ser melhorada, alternando a agitação de modo a minimizar a agregação entre células, mas ao mesmo tempo possibilitar migração de células para novos suportes (Wang & Ouyang, 1999).

5. EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA E DO SISTEMA DE CULTURA CELULAR NA PRODUTIVIDADE DE CAV-2

Esta parte do trabalho pretendeu a optimização da produção na definição da estratégia de infecção que permita melhores produtividades. Para isso foi avaliado o efeito da MOI, do meio sem soro e do sistema de cultura na produtividade destes vectores.

5.1 Materiais e Métodos

5.1.1 Linhas celulares e vírus

As células DK E1 e MDCK E1 foram mantidas como descrito em 2.1.1 e 4.1.1. Os vírus utilizados pertencem ao stock de trabalho produzido a partir de CAVGFP fornecidos pelo Dr. Eric Kremer (Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, França).

5.1.2 Estudos de produtividade em placas

Para os estudos das cinéticas de infecção, foram infectadas células com 80% de confluência a diferentes MOI's com mudança completa do meio de cultura na altura da infecção. Foram recolhidas amostras ao longo do tempo, nas quais foram contadas as células e determinada a percentagem de células infectadas por citometria de fluxo, recolhidos os vírus extracelulares no sobrenadante e os vírus intracelulares por raspagem das células aderentes em 3 mL de sobrenadante e lise celular. As suspensões virais foram centrifugadas a 3000 g durante 10 min, alíquotadas e armazenadas a -85° C.

5.1.3 Estudos de produtividade em spinner

As células foram infectadas no fim da fase exponencial da curva de crescimento, com mudança do meio de cultura, e foram recolhidos pontos ao longo do tempo. Em cada ponto foram retiradas 3 alíquotas para determinar a concentração das células, aspecto geral dos microsuportes e recolha de vírus. Os sobrenadantes resultantes foram reservados para análise posterior de metabolitos.

A recolha dos vírus intracelulares foi feita após sedimentação dos suportes, recolha do sobrenadante e lise celular. A recolha dos vírus extracelulares foi feita a partir do sobrenadante anterior. O tratamento das amostras foi igual ao descrito em 5.1.2.

5.1.4 Contagem de Células

A concentração e viabilidade celular foram determinadas como descrito em 4.1.4.

5.1.5 Determinação de glucose, lactato, glutamina e amónia

A determinação de glucose, lactato e glutamina foi feita pelo equipamento YSI modelo 7100 (YSI Life Sciences, Ohio, EUA). A amónia foi quantificada enzimaticamente com o kit “Ammonia assay kit” (Boehringer Mannheim, R-Biopharm AG, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante.

5.2 Resultados e Discussão

5.2.1 Efeito da MOI

O meio de cultura foi renovado na infecção como modo de maximizar a produtividade viral (Ferreira *et al.*, 2005b).

Nos processos de produção de vectores adenovirais é necessária a optimização da multiplicidade de infecção (MOI), de modo a permitir um processo mais rentável.

Esta parte do trabalho teve como objectivo avaliar a produção das células MDCK E1 em MEM 10% (v/v) FBS a diferentes MOI's e compará-la com as células DK E1 em DMEM 10% (v/v) FBS. Considerando as MOI's utilizadas para a produção de adenovírus humanos (Ferreira *et al.*, 2005c) e caninos (Kremer *et al.*, 2000), foram estudadas a MOI 10, 20 e 50, e foram recolhidas amostras às 24, 36 e 48 hpi.

De acordo com os resultados, para ambas as células estudadas foi às 24 hpi que se observou o mínimo de vírus extracelulares, algo observado também por outros autores (Ferreira *et al.*, 2005c) e que sugere que até este ponto os vírus estiveram a infectar células (fig. 10). Observou-se igualmente que a diminuição de vírus extracelulares até às 24 hpi foi maior para as células DK E1 que MDCK E1. Embora esta diferença não seja muito acentuada, este facto implica que para as células MDCK E1 estarão menos vírus a serem replicados, logo a produzir novos vírus.

Em ambas as células foi às 48 hpi o ponto onde a produtividade foi máxima e por isso aquele indicado para recolha dos vírus.

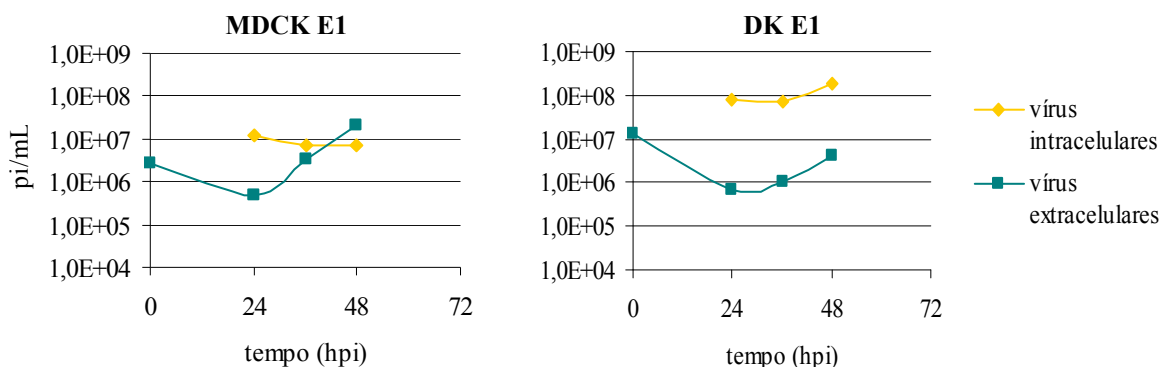


Fig. 10: Ensaio de infecção ao longo do tempo com MOI 20.

A partir das 24 hpi, devido à infecção viral, as células MDCK E1 começaram a libertar-se da superfície de adesão e a lisar o que justificou o aumento de vírus extracelulares. Por sua vez, as células DK E1, com características de adesão mais forte mesmo após infecção, o aumento de vírus extracelulares após as 24 hpi não foi significativo onde o título intracelular foi sempre mais de 10 vezes superior àquele obtido no extracelular. Portanto nestas condições a recolha de vírus nas células MDCK E1 deve seguir uma estratégia de recolha de todo o meio de cultura, ao contrário das células DK E1 onde a recolha dos vírus pode ser feita utilizando apenas o conteúdo intracelular.

A recolha dos vírus intracelularmente permite a redução do volume de trabalho, e com isso o aumento da concentração dos vírus. Este tipo de recolha é vantajoso à escala laboratorial devido aos métodos de purificação utilizados. Na ultracentrifugação por gradiente de cloreto de céσιο além de existir a limitação do volume de trabalho, é necessária uma boa quantidade de vírus de modo a que as bandas estejam visíveis e bem definidas. Uma vez reduzido o volume de trabalho e os vírus concentrados o protocolo de purificação pode ser feito numa única vez e a recolha da banda dos vírus facilitada. Em larga-escala, uma vez que são utilizados procedimentos em que o volume de trabalho pode ser significativamente maior, normalmente é utilizado todo o volume de trabalho. Como tal a redução do volume para a purificação não é prioritária no desenvolvimento do processo.

Embora os resultados indicassem que as células MDCK E1 foram infectadas por menos vírus que as DK E1, o que pode implicar uma diminuição na quantidade de vírus produzidos, os resultados mostraram que ambas as células possuíram um número semelhante de partículas intracelulares por célula (tabela 8). Este facto sugere que, em termos de produtividade, são semelhantes o que é confirmado com a amplificação de vírus obtida (fig. 11). Para as células MDCK E1, a MOI 20 parece ter sido a que permitiu maior produção, enquanto que para as células DK E1 tanto a MOI 10 como a MOI 20 permitiram iguais amplificações. Tendo em conta os erros de titulação, a amplificação de vírus obtida com células MDCK E1 e DK E1 foram equivalentes.

No que diz respeito à produtividade volumétrica, nas células DK observou-se mais vírus produzidos por volume de meio, mas isso deve-se a estas células serem mais pequenas que as MDCK E1 e por isso, para a mesma área de superfície de placa, existiram mais células a serem infectadas e a contribuírem para a produção.

Tabela 8: Partículas infecciosas intracelulares por célula obtidas às 48 hpi nas diferentes MOI's testadas.

	MDCK E1	DK E1
MOI 10	92 ± 17	359 ± 24
MOI 20	368 ± 93	376 ± 71
MOI 50	294 ± 100	62 ± 5

Os erros correspondem ao desvio-padrão associado às titulações das diferentes diluições da mesma amostra.

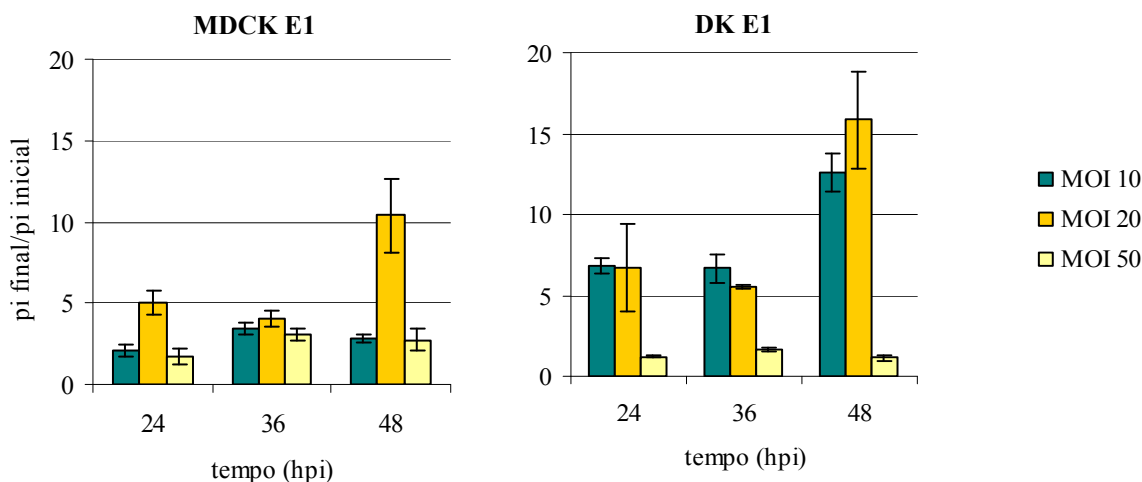


Fig. 11: Amplificação de partículas infecciosas para as diferentes células ao longo do tempo. Os erros correspondem ao desvio-padrão associado às titulações das diferentes diluições da mesma amostra.

Para avaliar a qualidade de produção viral foram quantificadas as partículas totais obtidas na MOI 20. Os resultados mostraram que, por célula, as partículas totais obtidas foram cerca de 1000 vezes mais que as partículas infecciosas (tabela 9). No que diz respeito à produtividade volumétrica as partículas totais obtidas foram semelhantes em ambas as células (tabela 10).

Uma vez que a quantificação foi feita a amostras não purificadas onde pode existir DNA viral livre ou associado à superfície das partículas virais e tendo em conta que as amostras não foram tratadas com DNase antes da extração, existe a possibilidade de quantificação de DNA que não corresponda a partículas virais. No entanto essa possibilidade foi descartada por parceiros do projecto, onde demonstraram que a utilização de DNase não é necessária uma vez que se obtém os mesmos títulos de vírus com ou sem tratamento com este enzima (Segura *et al.*, 2009).

Os resultados mostraram uma produtividade e qualidade (pt/pi) bastante baixa que estará associada à baixa qualidade do stock viral de trabalho que se utilizou para os ensaios e dos vírus iniciais fornecidos. Este problema foi contornado com o fornecimento de novos vectores virais mas infelizmente a recepção destes foi tardia e não foi possível repetir todos os estudos, pelo que os ensaios continuaram a serem feitos com o stock de trabalho inicial (ver secção 5.2.5).

Tabela 9: Partículas totais por célula obtidas ao longo da infecção na MOI 20

hpi	x10 ³ pt/célula	
	MDCK E1	DK E1
24	221 ± 50	67 ± 18
36	225 ± 154	217 ± 22
48	n.d.	322 ± 101

n.d.: Não determinada. Os erros correspondem ao desvio-padrão associado às titulações das diferentes diluições da mesma amostra.

Tabela 10: partículas infecciosas e totais obtidas por volume de meio às 48 hpi.

Partículas virais	MDCK E1	DK E1
10 ⁷ pi/mL	2,7 ± 0,2	20 ± 4
10 ¹¹ pt/mL	3,3 ± 0,7	1,9 ± 0,6

Os erros correspondem ao desvio-padrão associado às titulações das diferentes diluições da mesma amostra.

5.2.2 Efeito do meio de cultura

Com o objectivo de avaliar e seleccionar o meio de cultura sem soro que permita a melhor produtividade, foram realizados ensaios de infecção a células MDCK E1 a dois meios de cultura sem soro: ExCell e optiPRO. As quantidades de glucose e glutamina foram igualladas em todos os meios de cultura utilizados para as células MDCK E1 de forma a minimizar o efeito que estas variações possam ter na produtividade.

Os valores de partículas infecciosas por célula e a amplificação foram inferiores aos obtidos no estudo anterior para as células MDCK E1 e DK E1 nos mesmos meios de cultura e utilizando a mesma MOI. No entanto o perfil de infecção ao longo do tempo foi equivalente ao obtido anteriormente.

No que diz respeito aos meios sem soro, embora se possa considerar que o número de partículas infecciosas intracelulares por célula foi semelhante em ambos os meios (tabela 11), o meio optiPRO apresentou maior amplificação de partículas infecciosas que aquela obtida com meio ExCell (fig. 12).

Tabela 11: Partículas infecciosas por célula obtidas a MOI 20 nos diferentes meios de cultura.

hpi	ExCell	OptiPRO	MEM	DK E1
24	14 ± 3	73 ± 1	64 ± 10	120 ± 8
36	75 ± 1	64 ± 7	70 ± 7	128 ± 4
48	41 ± 5	41 ± 6	99 ± 6	82 ± 8
72	38 ± 4	284 ± 25	84 ± 48	184 ± 11

Os erros correspondem ao desvio-padrão associado às titulações das diferentes diluições da mesma amostra.

Mais importante, a amplificação em optiPRO foi equivalente à obtida com meio MEM 10% (v/v) FBS. Curiosamente, a evolução da infecção neste meio de cultura foi idêntica à obtida com as células DK E1, onde se observou que o aumento dos vírus no sobrenadante não foi significativo quando comparado com os vírus intracelulares (fig. 13). Esta particularidade permite a diminuição do volume de trabalho a purificar com as vantagens anteriormente enunciadas.

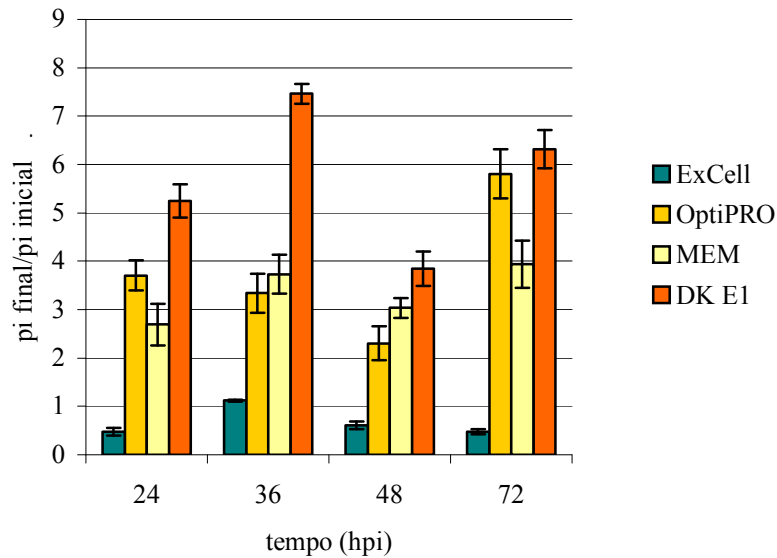


Fig. 12: Amplificação de partículas infecciosas nos diferentes meios de cultura. Os erros correspondem ao desvio-padrão associado às titulações das diferentes diluições da mesma amostra.

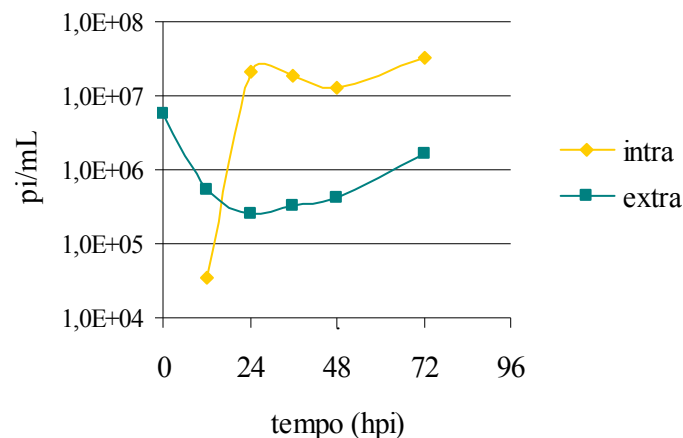


Fig. 13: Evolução da infecção obtida em meio optiPRO.

5.2.3 Efeito do sistema de cultura

Perante um novo sistema de cultura, a otimização dos parâmetros de infecção é imprescindível. Como ponto de partida foi testada a MOI 20 em células MDCK E1 em MEM com 10% (v/v) FBS. A MOI 20 foi a melhor em sistema estático e utilizada como ponto de partida para a otimização da produção em sistema agitado. Embora se tenha verificado infecção das células pela observação da proteína GFP não se verificou produção de vírus e houve uma perda de células viáveis muito acentuada quando comparado com o observado em sistema estático (fig. 14).

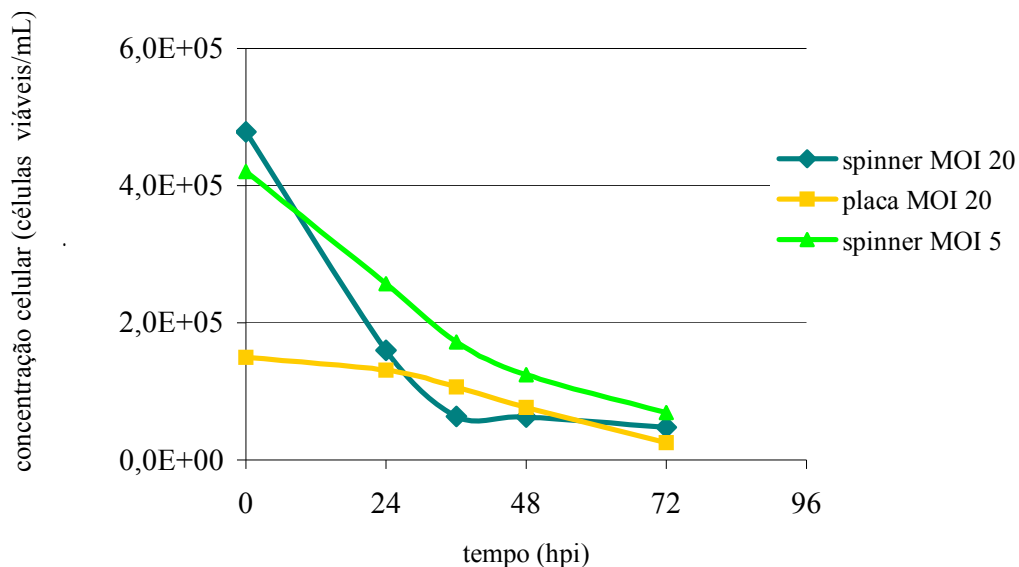


Fig. 14: Perfil das células aderentes ao longo da infecção.

Suspeitando-se de a causa da morte celular prematura estar relacionada com a elevada MOI, foi testada uma MOI mais baixa.

De acordo com estes resultados e tendo em conta as MOI's utilizadas para a produção de adenovírus, decidiu-se testar uma MOI de 5.

Embora também se tenha observado uma perda acentuada de células viáveis (fig. 14), as células foram capazes de produzir vírus. Estes resultados mostraram que em sistema agitado a sensibilidade das células à infecção é maior. A MOI 5, embora com poucas partículas infecciosas por célula (no máximo 50), mostrou ter uma produtividade volumétrica de $1,2 \times 10^7$ pi/ml ($\pm 0,4$) comparável à MOI 20 para sistema estático, e uma amplificação maior (fig. 15), dados suficientes para prosseguir o trabalho com esta MOI.

Em relação à recolha dos vírus a estratégia a adoptar é igual à obtida em sistema estático (recolha dos vírus no sobrenadante e no conteúdo intracelular). Comparando com o sistema estático, o tempo de recolha pode ser adiantado para as 36 hpi, uma vez que a essa altura o

número de partículas infecciosas formadas foi igual ao obtido às 48 hpi. Às 72 hpi verificou-se uma perda de partículas infecciosas que poderá estar relacionada com as condições no meio de cultura, nomeadamente a diminuição do pH causado pelos produtos do metabolismo e morte celular (Ferreira *et al.*, 2005b).

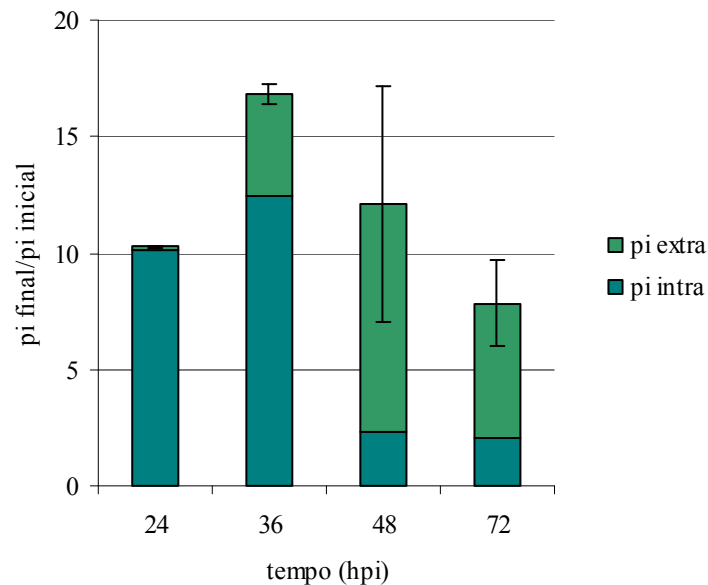


Fig. 15: Amplificação de partículas infecciosas e relação partículas intra/extracelulares ao longo da infecção. Os erros correspondem ao desvio-padrão associado às titulações das diferentes diluições da mesma amostra.

5.2.4 Efeito do meio sem soro em sistema agitado

Para observar a capacidade de produção das células MDCK E1 adaptadas a optiPRO em sistema agitado, foram infectadas células com MOI 5. Embora as células tivessem sido infectadas e se tivesse observado o ciclo de infecção característico (fig. 16) não houve produção de vírus.

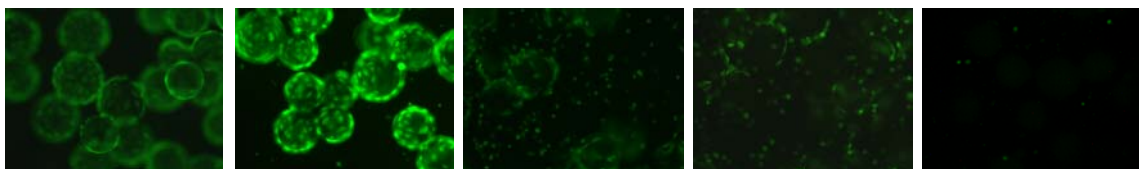


Fig. 16: Células MDCK E1 em optiPRO ao longo da infecção. Da esquerda para a direita: 12 hpi, 24 hpi, 36 hpi, 48 hpi, 72 hpi. Ampliação: 100x.

Suspeitou-se que a não amplificação estivesse relacionada com a diminuição de pH no meio de cultura ao longo do tempo, indicada pela mudança de cor do meio, e provavelmente devido à acumulação de lactato. A acumulação de lactato e amônia, principais produtos do

metabolismo da glucose e glutamina, são capazes de diminuir o crescimento e a produtividade celular (Ferreira *et al.*, 2007). Para verificar isto foram analisados os consumos de glucose e glutamina, produção de lactato e amónia e medido o pH nos diferentes pontos de recolha do meio de cultura e comparado com os valores obtidos na infecção anterior em MEM com 10% (v/v) FBS.

Em meio optiPRO, nem a glucose nem a glutamina foram completamente consumidas, o que indica que não foram limitantes para a produção de vírus. Durante as primeiras 12 horas de infecção o pH do meio de cultura diminuiu para valores abaixo de 7. Observou-se uma concentração de amónia à volta dos 2 mM durante a infecção, valores que por si só não inibem o crescimento celular de MDCK (Genzel *et al.*, 2005).

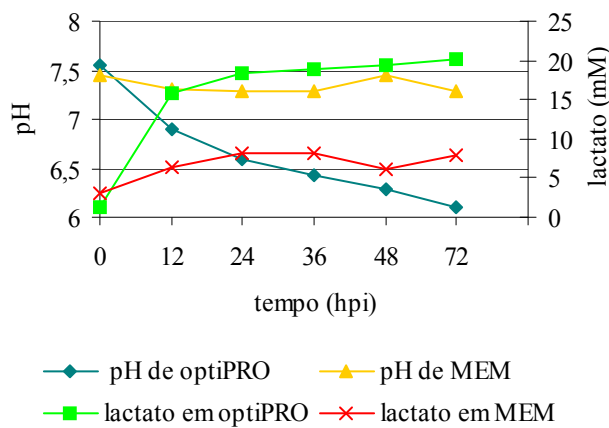


Fig. 17: Evolução do pH e lactato ao longo da infecção em MEM e optiPRO. Note-se a proporcionalidade entre a diminuição do pH e aumento do lactato.

Uma vez que o pH diminuiu drasticamente logo após infecção, é indicado como principal responsável pela falta de produção (fig. 17). Este decréscimo deveu-se à acumulação de lactato, que é directamente proporcional à diminuição do pH. Esta diminuição, além de interferir nas funções biológicas da célula, tem efeito na estabilidade das partículas virais, na estabilidade do DNA celular e mais importante no DNA viral, onde foi demonstrado que a actividade da DNase II a pH abaixo dos 6,6 tem um efeito significativo na degradação do DNA viral (Ferreira *et al.*, 2007). Se o controlo do pH do meio de cultura for suficiente para a obtenção de produtividades satisfatórias, este pode ser feito em biorreactores. No entanto, e uma vez que a falta de produtividade pode também estar relacionada com a acumulação de amónia e lactato é importante definir uma estratégia para a diminuição destes produtos durante a produção viral. Ainda na biorreacção, é possível diminuir a quantidade de lactato produzida pelas células aumentando a tensão de O₂ no biorreactor, que induzirá a célula a um metabolismo mais aeróbio e, por isso, com menos produção deste metabolito (GE Healthcare, 2005).

É conhecido na literatura que concentrações de lactato superiores a 12 mM juntamente com amónia entre 1-4 mM são suficientes para diminuir o crescimento celular de MDCK em mais de metade (Hassel *et al.*, 1991). Desconhecem-se as concentrações de lactato e amónia capazes de interferir na produção de adenovírus em MDCK, mas de acordo com o observado para outras células, estas concentrações devem ser semelhantes às aquelas capazes de interferir no crescimento celular.

As abordagens para controlar o metabolismo celular e reduzir a produção destes metabolitos podem ser delineadas em dois sentidos: i) manter concentrações baixas de glucose e glutamina no meio de cultura para encaminhar o metabolismo celular para estados mais eficientes (Cruz *et al.*, 1999); ou ii) adaptar as células a meio com outras fontes de carbono e azoto. Estudos demonstraram que a substituição da glutamina suplementada no meio de cultura por piruvato em células MDCK, além de não ter tido efeitos no crescimento celular, as células produziram menos lactato (por consumirem menos glucose) e não produziram amónia (Sidorenko *et al.*, 2008). Como consequência, os rendimentos de produção tornam-se melhores (Ferreira *et al.*, 2007).

5.2.5 Produtividade obtida nos diferentes ensaios

Os resultados obtidos ao longo deste trabalho relativos à produção são bastante diferentes daqueles obtidos em produções de CAV-2 e adenovírus humanos (tabela 12).

Se por um lado o número de partículas físicas por célula parecem estar de acordo com o obtido nestes dois grupos (tabela 9), a quantidade de partículas infecciosas por célula foi cerca de 10^3 vezes menor (tabela 8). No que diz respeito à proporção pt:pi em preparações purificadas, a proporção no stock utilizado para trabalho foi 500:1, valor proibitivo em ensaios clínicos onde a proporção exigida é de no máximo 30:1 (Dormond *et al.*, 2008).

Estudos não mostrados neste trabalho sugerem a associação desta baixa qualidade de com o stock de vírus original, uma vez que para além de ser antigo, estava armazenado sem crioprotetor e com várias passagens de produção, factores que contribuem para a diminuição da estabilidade das partículas virais e consequentemente a infecciosidade destas (Ugai *et al.*, 2002; Cruz *et al.*, 2006).

Em produções feitas a partir de um novo stock de vírus fornecido pelo Prof. Miguel Chillon (Universitat Autònoma de Barcelona, Espanha) foi possível a obtenção de 2000 pi/célula e uma amplificação de 400x, valores coerentes com o obtido para adenovírus. Além disso a proporção pt:pi obtida foi metade do máximo permitido. Espera-se que com novo stock de trabalho se consiga obter os valores descritos para adenovírus.

Tabela 12: Valores obtidos em produções de CAV-2 (Kremer *et al.*, 2000) e adenovírus Humanos (Kamen & Henry, 2004; Ferreira *et al.*, 2005a, Dormond *et al.*, 2008).

	CAV-2	Adenovírus humanos
pi/célula	3 000 – 15 000	$10^3 - 10^4$
pt/célula	10 000 – 50 000	$10^4 - 10^5$
Amplificação	50-500x	100-1000x
Relação pt:ip (preparações purificadas)	3:1 – 5:1	3:1 – 10:1

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho mostrou que é possível produzir CAVGFP em células MDCK transfectadas com E1 e que os títulos obtidos são comparáveis às células DK E1, assim como em meio sem soro. As partículas produzidas pelas duas linhas celulares foram idênticas e existem diferenças entre as cápsides vazias e os vírus completos suficientes para separar estes dois tipos de partículas no desenvolvimento do processo de purificação para aumento de escala.

No sistema agitado, as concentrações máximas celulares foram iguais às obtidas em sistema estático. Uma vez que neste sistema existiam menos células por área que no sistema estático, considera-se como factor limitante nos dois sistemas o meio de cultura (tabela 13).

Tabela 13: Relação estático (E) agitado (A) nos diferentes meios de cultura.

Meio		Crescimento		
		Células max/ V_{meio}	Células/cm ²	V_{meio} /cm ²
Relação E:A	MEM	1:1	3:1	4:1
	optiPRO	1:1	4:1	4:1

Meio		Infecção			
		Células/ V_{meio}	Células/cm ²	V_{meio} /cm ²	pi/ V_{meio}
Relação E:A	MEM	1:2	1:1	2:1	1:1*
	optiPRO	1:2	1:1	2:1	n.d.

*Cálculos feitos a partir da média de dois ensaios.

Área de Cytodex 1 considerada para cálculos: 4400 cm²/g (GE Healthcare, 2005). n.d.: não determinado.

Ainda em sistema agitado, a produtividade volumétrica manteve-se em meio com soro, e a MOI pode ser reduzida 4 vezes.

Para o meio sem soro, estabeleceu-se uma estratégia de inoculação recorrendo ao soro para ultrapassar a falta de adesão das células aos suportes. Neste meio de cultura é necessário um controlo mais rigoroso das condições do meio de cultura na infecção, nomeadamente o pH e o lactato produzido pelas células.

Este trabalho foi a primeira abordagem para a definição de parâmetros para uma óptima produção de vectores de CAV-2 de primeira geração em células MDCK E1 em meio sem soro e sistema agitado. No entanto será importante testar alternativas que permitam melhorar a adesão das células aos suportes em condições livres de soro e controlar os produtos do metabolismo celular e o pH do meio de cultura.

O trabalho futuro irá se desenvolvido em torno do sistema agitado e em cinco linhas de trabalho:

- Avaliar do controlo do pH feito em biorreactores de tanque agitado para verificar se é suficiente para permitir a produção das células em meio sem soro;
- Avaliar as condições que permitam diminuir a quantidade de lactato produzido pelas células durante a produção, utilizando por exemplo outras fontes de carbono;
- Teste de aditivos e suplementos de origem não-animal para a adesão celular em suportes;
- Após a produção em meio sem soro, definição da estratégia de recolha dos vírus;
- Estudos de estabilidade dos vírus durante o armazenamento e a diferentes condições de pH e temperatura;

Após as condições bem definidas, será importante uma produção em biorreactor de tanque agitado para confirmar os parâmetros otimizados e em volume suficiente para o desenvolvimento do processo de purificação,

7. REFERÊNCIAS

- Altaras, N. E., Aunins, J. G., Evans, R. K., Kamen, A., Konz, J. O., Wolf, J. J.** 2005. Production and formulation of adenovirus vectors. *Biochem Engin* **99**:193-260.
- Benihoud, K., Yeh, P., Perricaudet, M.** 1999. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin in Biotech* **10**: 440-447.
- Castilho, L., Moraes, A. M., Augusto, E. F. P. Butler, M.** 2008. *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*. Taylor & Francis:111-128.
- Cruz, H.J., Moreira, J.L., Carrondo, M.J.T.** 1999. Metabolic shifts by nutrient manipulation in continuous cultures of BHK cells. *Biotechnol Bioeng* **66(2)**:104-113.
- Cruz, P.E., Silva, A.C., Roldão, A., Carmo, M., Carrondo, M.J.T., Alves, P.M.** 2006. Screening of novel excipients for improving the stability of retroviral and adenoviral vectors. *Biotechnol Prog* **22**: 568-576.
- Culver, K.W., 1994.** Methods for gene transfer, In *Gene Therapy – A handbook for physicians*.
- Dormond, E., Perrier, M., Kamen, A.** 2008. From the First to the Third Generation Adenoviral Vector: What Parameters are Governing the Production Yield *Biotechnol Adv* **27(2)**:133-44.
- Ferreira, T.B., Ferreira, A.L., Carrondo, M.J.T., Alves, P.M.** 2005a. Two different serum-free media and osmolarity effect upon human 293 cell growth and adenovirus production. *Biotechnol Lett* **27**:1809-1813.
- Ferreira, T.B., Ferreira, A.L., Carrondo, M.J.T., Alves, P.M.** 2005b. Effect of refeed strategies and non-ammoniogenic medium on adenovirus at high cell densities. *J Biotechnol* **119**:272-280.
- Ferreira, T.B., Alves, P.M., Gonçalves, D., Carrondo, M.J.T.** 2005c. Effect of MOI and medium composition on adenovirus infection kinetics. In *Gòdia F. and Fussenegger M. (Ed), Animal Cell Technology Meets Genomics*, Springer, 392-332.
- Ferreira, T.B., Carrondo, M.J.T., Alves, P.M.** 2007. Effect of ammonia production on intracellular pH: consequent effect on adenovirus vector production. *J Biotechnol* **119**:272-280.
- Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., Chanok, R. M., Melnick, J. L., Monath, T. P., Roizman, B., Straus, S. E.** 1996a. *Virology*, third ed., 1. 2 vols. Lippincott-Raven, Philadelphia, New York.

- GE Healthcare.** 2005. Microcarrier cell culture – Principles and Methods. GEHealthcare cat. No. 18-1140-62
- Genzel, Y., Ritter, J.B., Konig, S., Rudiger, A., Reichl, U.** 2005. Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells. *Biotechnol Prog* **21**: 58-69
- Hassell, T., Gleave, S., Butler, M.** 1991. Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia. *Appl Biochem Biotechnol* **30(1)**:29-41.
- Horwood, N. J., Smith, C., Andreakos, E., Quattrocchi, E., Brennan, F. M., Feldmann, M., Foxwell, B. M.** 2002. High-efficiency gene transfer into nontransformed cells: utility for studying gene regulation and analysis of potential therapeutic targets. *Arthritis Res* **4 (Suppl)**: S215-S225.
- Imler, J. L.** 1995. Adenovirus vectors as recombinant viral vaccines. *Vaccine* **13(13)**:1143-51.
- Jones, T. C., Hunt, R. D., King, N. W.** 1997. *Veterinary Pathology*. 3rd edition. Williams & Wilkins, Maryland, USA.
- Klonjowski, B., Gilardi-Hebenstreit, P., Hadchouel, J., Randrianarison, V., Boutin, S., Yeh, P., Perricaudet M.,** 1997. A recombinant E1-deleted canine adenoviral vector capable of transduction and expression of a transgene in human-derived cells and in vivo. *Hum Gene Ther* **8(17)**: 2103-15.
- Kamen, A., Henry, O.** 2004. Development and optimization of an adenovirus production process. *J Gene Med.* **6 Suppl 1**:S184-92.
- Kremer, E.J.** 1997. A recombinant E1-deleted canine adenoviral vector capable of transduction and expression of a transgene in human-derived cells and in vivo. *Hum Gene Ther* **8(17)**:2103-15.
- Kremer, E. J.** 2004. CAR chasing: canine adenovirus vectors – all bite and no bark? *J Gene Med* **6**: S139-S151.
- Kremer, E.J., Boutin, S., Chillon, M., Danos, O.** 2000. Canine Adenovirus vectors: an alternative for adenovirus-mediated gene transfer. *J Virol* **74(1)**: 505-512.
- Mountain, A.** 2000. Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol* **18(3)**: 119-28.
- Nadeau, I., Jacob, D., Perrier, M., Kamen, A.** 2000. 293SF metabolic flux analysis during cell growth and infection with adenoviral vector. *Biotechnol Prog* **16**: 872-884.
- Perreau, M., Kremer, E.J.** 2006. The conundrum between immunological memory to adenovirus and their use as vectors in clinical gene therapy. *Mol Biotechnol* **34(2)**: 247-56.

- Peixoto, C., Ferreira, T.B., Carrondo, M.J.T., Cruz, P.E., Alves, P.M.** 2006. Purification of adenoviral vectors using expanded bed chromatography. *J Viro Met* **132**: 121-126.
- Pohlscheidt, M., Langer, U., Minuth, T., Apeler, H., Hörlein, H.-D., Paulsen, D., Rübsamen-Waigmann, H., Henzel, H.-J., Reichl, U.** 2008. Development and optimisation of a procedure for the production of Parapoxvirus ovis by large-scale microcarrier cell culture in a non-animal non-human and non-plant-derived medium. *Vaccine* **26**: 1552-1565.
- Reece-Ford, M., Hitchcock, A.G., Lipinski, K.S.** 2008. Aspects of process development for virus vector production to improve quality and quantity. *Pharma Technol Europe* **20(1)**: 28-34
- Segura, M.M., Monfar, M., Puig, M., Mennechet, F., Ibanes, S., Chillón, M.** 2009. A real-time PCR assay for quantification of canine adenoviral vectors. *J Viro Met* **in press**.
- Sidorenko, Y., Wahl, A., Dauner, M., Genzel, Y., Reichl, U.** 2008. Comparison of metabolic flux distributions for MDCK cell growth in glutamine- and pyruvate-containing media. *Biotechnol. Prog* **24**: 311-320.
- Stone, D., David, A., Bolognani, F., Lowenstein, P. R., Castro, M. G.** 2000. Viral vectors for gene delivery and gene therapy within the endocrine system. *J Endocrinol* **164(2)**: 103-18.
- Takahashi, E., Cohen, S.L., Tsai, P.K., Sweeney, J.A.** 2006. Quantitation of adenovirus type 5 empty capsids. *Anal Biochem.* **349(2)**: 208-17.
- Urabe, M., Xin, K., Obara, Y., Nakakura, T., Mizukami, H., Kume, A., Okuda, K., Ozawa, K.** 2006. Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. *Mol Ther* **13(4)**:823-8.
- Ugai, H., Watanabe, S., Suzuki, E., Tsutsui-Nakata, H., Yokoyama, K. K., Murata, T.** 2002. Stability of a recombinant adenoviral vector: optimization of conditions for storage, transport and delivery. *Jpn J Cancer Res* **93**: 598-603.
- Varani, J., Inman, D.R., Fligiel, S.E., Hillegas, W.J.** 1993. Use of recombinant and synthetic peptides as attachment factors for cells on microcarriers. *Cytotechnology* **13(2)**:89-98.
- Volpers, C., Kochanek, S.** 2004. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med* **6**: S164-S171.
- Wang, F., Raab, R. M., Washabaugh, M. W., and Buckland, B. C.** 2000. Gene therapy and metabolic engineering. *Metab Eng* **2(2)**: 126-39.
- Wang, Y., Ouyang, F.** 1999. Bead-to-bead transfer on Vero cells in microcarrier culture. *Bioproc Eng* **21**:211-213.
- Zetasizer NanoSeries.** 2004. User Manual MAN 0317 Issue 1.1.