

Plano de Estágio de Mestrado

Tema: *Aplicação da genómica funcional na produção de biofármacos virais: vacinas e vectores para terapia génica*

Orientador: Doutora Ana Sofia Coroadinha (avalente@itqb.unl.pt)

Local: Unidade de Tecnologia de Células Animais - ITQB/IBET (Av. da República (EAN), 2781-901 Oeiras). Web: [//tca.itqb.unl.pt](http://tca.itqb.unl.pt)

Resumo:

A crescente procura de biofármacos complexos (ex. anticorpos e vírus) requer o desenvolvimento de processos robustos em células de mamífero e requerem elevados padrões de qualidade, uma vez que são utilizados em terapias humanas. Os produtos biofarmacêuticos derivados de vírus (VBBs) representam um dos fármacos com mais potencial e são utilizados em diversas aplicações profiláticas, terapêuticas e clínicas como, a vacinação, o tratamento do cancro e a terapia génica. Do ponto de vista de manufatura, a produção de VBBs apresenta-se como um difícil desafio devido à sua inerente complexidade.

Os vectores retrovirais são um exemplo de um VBB com elevado potencial terapêutico, sendo uma ferramenta altamente eficiente quer para a transferência de genes quer para a apresentação de epitopos em vacinação. Contudo, a sua produção é muito difícil devido à elevada produção de vírus não infecciosos: apenas 1 em cada 100 partículas é infecciosa, gerando vírus de reduzida qualidade [1]. A produção de vírus defeituosos é ainda agravada quando realizada utilizando meio sem soro [2]. A razão PI/PT (Partículas Infecciosas/ Partículas Totais) pode no entanto ser melhorada alterando, o fenótipo celular utilizando diferentes condições de cultura ou via engenharia genética.

Este mestrado enquadra-se num projecto que se propõe a elucidar os constrangimentos na produção de vírus, para subsequente optimização do fenótipo celular e das condições de cultura. A estratégia delineada passa pela utilização da genómica funcional, mais especificamente transcriptómica, metabolómica e análise de fluxos. Utilizar-se-ão as células 293 FLEX, produtoras de vectores retrovirais [3] como modelo, e genómica funcional para comparar a linha celular mãe com a linha celular produtora. O trabalho já iniciado permitiu elucidar algumas das alterações transcricionais e metabólicas celulares induzidas pela replicação do vírus. As vias bioquímicas identificadas, apresentam-se agora como alvos para proceder a engenharia metabólica reversa. Esta última levará à obtenção de fenótipos celulares superiores que resultarão num melhor processo de manufatura quer em produtividade quer em qualidade (em termos de eficiência biológica e segurança).

Este estágio de mestrado visa a criação de novas linhas celulares dando continuidade ao desenvolvimento e melhoramento das 293FLEX e tendo como objectivo o estabelecimento de uma linha celular de fenótipo superior, para a produção de retrovírus em meio sem soro. Serão explorados neste estágio alvos para engenharia metabólica por sobre-expressão de genes ou por silenciamento de genes utilizando siRNA. As células geneticamente modificadas serão caracterizadas metabolicamente e em termos de produção viral. As condições de cultura serão optimizadas. Novos alvos para engenharia genética poderão vir a ser identificados.

Os vectores retrovirais constituem um excelente representante de vírus de envelope, o que prevê a aplicação do conhecimento resultante deste projecto a outros vectores virais (ex. Lentivírus), vacinas virais (ex. Influenza) e a VLPs (ex. Retroviral VLPs). O enorme potencial das células HEK293, que são utilizadas como células produtoras de diversos produtos biofarmacêuticos, tornam este projecto não só cientificamente atraente como tecnologicamente importante.

Este trabalho enquadra-se no âmbito do projecto FCT (VIROCELLOME-PTDC/EBB-BIO/100491/2008).

Metodologias: Cultura de células animais, manipulação de vectores retrovirais, real-time RT-PCR, citometria de fluxo, biologia molecular, analíticos vários.

1. Carrondo, M.J.T.; Merten, O.-W.; Haury, M.; Alves, P.M. and Coroadinha, A.S. (2008) *Impact of retroviral vector components Stoichiometry on packaging cell lines: effects on productivity and vector quality*. Hum. Gene Ther., 19(2):199-210

2. Rodrigues, A.F.; Carmo, M.; Alves, P.M. and Coroadinha A.S. (2009) *Retroviral vector production under serum deprivation: the role of lipids*. Biotechnol. Bioeng., 104(6):1171-1181

3. Coroadinha, A.S.; Schucht, R.; Gama-Norton, L; Wirth, D.; Hauser, H. and Carrondo, M.J.T. (2006) *The use of recombinase Cassette Exchange in retroviral Vector Producer Cell Lines: predictability and efficiency in transgene replacement*. J.Biotechnol., 124:1125-35

Plano detalhado:

Fase I - Aprendizagem das técnicas de manipulação de células animais: trabalho em esterilidade, propagação de células, contagem de células, congelamento e descongelamento de células. Leitura bibliográfica sobre o trabalho.

Fase II - Aprendizagem das técnicas específicas à manipulação de vectores retrovirais: cultura de células produtoras de retrovirus em *t-flask* (cultura em monocamada), quantificação de partículas retrovirais totais e infecciosas. Caracterização do crescimento celular e produtividade viral. Análise do metabolismo energético primário das células pelo consumo de glucose e glutamina e produção dos respectivos metabolitos.

Fase III: Aprendizagem das técnicas específicas de biologia molecular e construção de vectores de expressão ou desenvolvimento de sistemas para siRNA. Transfecção de células 293 FLEX e engenharia celular.

Fase VI – Caracterização e comparação de várias linhas celulares desenvolvidas: taxas específicas de crescimento, produtividade viral, perfil metabólico (transcriptómico), expressão génica. Caracterização dos vectores retrovirais.

Fase V – Elaboração da Tese de Mestrado.

Duração do estágio: 1 ano a tempo inteiro.

Planeamento das Fases de Estágio

	Mês											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fase I												
Fase II												
Fase III												
Fase IV												
Fase V												

Número de estagiários: 1