

# Genômica Funcional de Micobactérias:

## <http://dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/5734876296805347>

**Protocolo:** 2015.25.16023411      **Status:** ACEITO

**Unidade:** IOC    **Setor:** Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática    **Departamento:** Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (extinto em 2007, mas o campo é de preenchimento obrigatório)

**Líder:** LEILA DE MENDONCA LIMA    **E-mail:**

**Programa:** 3.3 - Biologia sintética (Fio-BioSin)    **Linha:** 2.6. Desenvolvimento de aplicações biotecnológicas com micro-organismos, inclusive biorremediadores e bioinseticidas

### Trabalhos :

Concluimos o sequenciamento do genoma de *M. bovis* BCG Moreau, a cepa utilizada no Brasil para produção da vacina contra a tuberculose assim como o proteoma de frações de proteínas secretadas e de superfície, comparando com a cepa Pasteur. Estes dados geraram publicações, teses/dissertações e contribuem para a caracterização molecular detalhada da cepa vacinal brasileira. O desafio atual é buscar possíveis impactos funcionais de mutações mapeadas através da análise genômica comparativa, utilizando abordagens de biologia molecular. Em paralelo iniciamos a caracterização genômica de micobactérias ambientais visando conhecer melhor a biodiversidade brasileira e buscando características compartilhadas com a vacina BCG, que podem modular a eficácia vacinal. O grupo tem forte participação na formação de recursos humanos para a Pesquisa (Pós-Graduação e Iniciação Científica) e atuação institucional (através de plataformas tecnológicas e suporte para produção de insumos recombinantes).

### Contribuições :

Desenvolvimento de novos sistemas de expressão para obtenção de proteínas recombinantes solúveis. Identificação de rotas metabólicas para síntese de produtos e intermediários de interesse biotecnológico. Construção de microrganismos recombinantes para produção de intermediários de interesse biotecnológico através de Biologia Sintética. Oferecer disciplinas na área.

### Interações :

ainda em construção.

# Desenvolvimento de Biofármacos para saúde pública; <http://dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/5724473446306520>

**Protocolo:** 2015.103.26010325

**Status:**

ACEITO

**Unidade:** Bio-Manguinhos **Setor:** LATER **Departamento:**

VDTEC

**Líder:** JOSé PROCóPIO MORENO SENNA

**E-mail:** jprocopio@bio.fiocruz.br

**Programa:** 3.3 - Biologia sintética (Fio-BioSin)

**Linha:** 26.4. Pesquisa e Desenvolvimento de biofármacos, anticorpos, e outras macromoléculas terapêuticas

## **Trabalhos :**

O grupo de pesquisa atua no desenvolvimento de biofármacos para a saúde pública. Atuamos também no desenvolvimento de anticorpos terapêuticos. Um dos nossos projetos, gerou um anticorpo monoclonal murino capaz de conferir proteção em modelo animal contra cepas de MRSA e Enterococos. Estes resultados geraram um pedido de patente depositado no INPI e em agências internacionais, tendo sido deferido em 9 países até o momento, incluindo Estados Unidos e China. Estamos trabalhando no desenvolvimento de anticorpos monoclonais para o tratamento de *Acinetobacter baumannii*. Empregando uma estratégia de imunoproteômica, identificamos alvos potenciais. Avaliamos duas proteínas candidatas, com bons resultados de proteção e estamos iniciando o desenvolvimento de anticorpos monoclonais por tecnologia de hibridomas. Publicações: 1. BONIN, RENATA FAJARDO ; CHAPEAUROUGE, ALEX ; PERALES, JONAS ; DA SILVA JÚNIOR, JOSÉ GODINHO ; DO NASCIMENTO, HILTON JORGE ; D ALINCOURT CARVALHO ASSEF, ANA PAULA ; SENNA, JOSÉ PROCÓPIO MORENO .

Identification of immunogenic proteins of the bacterium *Acinetobacter baumannii* using a proteomic approach. *Proteomics Clinical Applications*, v. 8, p. DOI: 10.1002-n/a, 2014. 2. ARAUJO, A. E. V. ; BONIN, RENATA FAJARDO ; SENNA, J. P. M. . Determination of lethal and sublethal doses of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Experimental and Applied Animal Science*, v. 1, p. 336-340, 2015. 3. CORREIA, A. L. ; SENNA, JOSÉ PROCÓPIO MORENO ; SOUZA, A. P. B. . Effects of passage number on growth and productivity of hybridoma secreting MRSA anti-PBP2a monoclonal antibodies. *Cytotechnology*, 2015. (Aceito) 4. SENNA, J. P. M. ; Teixeira M G M ; Batoréu N . Generation and Characterization of Murine Monoclonal Antibodies anti PBP2a of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 2015. (Aceito) Patente: SENNA, JOSÉ PROCÓPIO MORENO ; Teixeira M G M ; Teixeira M G M ; Batoréu N ; Batoréu N ; Queiroz J ; Queiroz J . ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA A PROTEÍNA PBP2-A E SEQÜÊNCIAS HOMÓLOGAS PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES E IMUNODIAGNÓSTICO em bactérias do filo firmicutes. 2010, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI09145087, data de depósito: 01/10/2010, título: "ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA A PROTEÍNA PBP2-A E SEQÜÊNCIAS HOMÓLOGAS PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES E IMUNODIAGNÓSTICO em bactérias do filo firmicutes" , Instituição de registro:INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Instituição(ões) financiadora(s): FIOCRUZ. Países onde a patente encontra-se deferida: África do Sul, China, Cuba, Colombia, Estados Unidos, Hong Kong, México, Singapura e Turquia.

## **Contribuições :**

Desenvolvimento de anticorpos monoclonais para o tratamento de bactérias multirresistentes a antibioticoterapia, em especial *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA), Enterococos resistentes à vancomicina (VRE) e *Acinetobacter baumannii*.

## **Interações :**

Universidade Federal do Rio de Janeiro - Instituto de Microbiologia prof Paulo de Goés - Dra Lúcia Martins Teixeira

# MODELAGEM, SIMULAÇÃO E EVOLUÇÃO, IN SILICO, de BIOMOLÉCULAS: [dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/3192790897364453](http://dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/3192790897364453)

**Protocolo:** 2015.116.26023720      **Status:** ACEITO  
**Unidade:** FIOCRUZ/CE      **Setor:** Engenharia de proteínas      **Departamento:** Biotecnologia  
**Líder:** MARCOS ROBERTO LOURENZONI      **E-mail:** mrl@fiocruz.br  
**Programa:** 3.3 - Biologia sintética (Fio-BioSin)      **Linha:** 26.4. Pesquisa e Desenvolvimento de biofármacos, anticorpos, e outras macromoléculas terapêuticos

## Trabalhos :

O pesquisador Gilvan Pessoa Furtado, participante do grupo de pesquisa e recentemente ingresso na Fiocruz-Ceará, possui experiência nas áreas de bioquímica e biologia molecular, com ênfase na área de engenharia de proteínas. Trabalhou e publicou artigos como autor ou co-autor na área de evolução dirigida de proteínas (Finding structural determinants of specificity of the ctCBM11 for xyloglucan using a direct evolution approach – artigo em elaboração), criação de enzimas quiméricas multifuncionais (Engineering Bifunctional Laccase-Xylanase Chimeras for Improved Catalytic Performance. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 286, p. 43026-43038, 2011; A designed bifunctional laccase/beta-1,3-1,4-glucanase enzyme shows synergistic sugar release from milled sugarcane bagasse. *Protein Engineering, Design & Selection*, v. 26, p. 15-23, 2012), construção de circuitos gênicos simples (d-Xylose detection in *Escherichia coli* by a xylose binding protein-dependent response. *Journal of Biotechnology*, v. 168, p. 440-445, 2013), prospecção de ligantes via phage display (Phage display as a novel promising antivenom therapy: A review. *Toxicon*, v. 93, p. 79-84, 2014.) e desenvolvimento de vetores modulares para uso na biologia sintética (Development of New Modular Genetic Tools for Engineering the Halophilic Archaeon *Halobacterium salinarum*. *Plos One*, v. 10, p. e0129215, 2015). O pesquisador, Marcos Roberto Lourenzoni, possui experiência em coordenação e projetos na área de bioinformática e biotecnologia, envolvendo os assuntos de simulação molecular, biologia molecular, engenharia de proteínas, desenvolvimento de bioprocesso e gestão da inovação tecnológica. Trabalhou em empresas de base tecnológica desenvolvendo ferramentas para engenharia de anticorpos e no desenvolvimento de enzimas especiais para industriais do setor de papel e celulose. Fez o pedido de uma patente de vetor de expressão constitutivo em *E. Coli*, que propicia baixo custo de produção de enzimas. Na Fiocruz, o Dr. Lourenzoni vem trabalhando no desenvolvimento dos modelos de parcerias para pesquisa translacional, envolvendo Embrapa, Fraunhofer e universidades, principalmente as do Ceará. Três plataformas de desenvolvimento têm sido construídas, a de bioprospecção de moléculas com potencial terapêutico, engenharia de fragmentos de anticorpos e uma plataforma de bioinformática que atua, transversalmente, entre as duas primeiras para a proposição de novas moléculas. Além disso, a plataforma de bioinformática se propõe a desenvolver novos algoritmos para proposição de novas soluções nessa área. No aspecto científico, destacam-se algumas publicações que ilustram o uso simulação computacional para estudo de mecanismos de ação de proteínas, engenharia de proteínas e inovação tecnológica. Enhanced xyloglucan-specific endo- $\beta$ -1,4-glucanase efficiency in an engineered CBM44-XegA chimera. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 12, p. 5095-5107, 2015 Study of the Interaction of Human Defensins with Cell Membrane Models: Relationships between Structure and Biological Activity. *Journal of Physical Chemistry. B*, v. 111, p. 11318-11329, 2007. Structural Bioinformatics for Protein Engineering. In: Eddy C. Agbo. (Org.). "Innovations in Biotechnology". 1ed. Baltimore-USA: Intech Books, 2012, v. 1, p. 415-431. PersoZyme - Enzimas Personalizadas Para Biobranqueamento de Polpa de Celulose. In: n: ABTCP-TAPPI 2010, 2010, SÃO PAULO. ABTCP-TAPPI Technical Sections 2010. v. C12. p. 1-10. O pesquisador João Herminio Martins da Silva ingressou no quadro da Fiocruz em 2010 e se dedica ao estudo computacional da interação proteína-proteína e proteína-ligante, particularmente na aplicação de metodologias de dinâmica molecular, docking e cálculo de energia livre utilizando FEP e LIE. Atualmente trabalha na implementação e padronização de métodos de virtual screening em bancos de dados virtuais de moléculas disponíveis comercialmente e no desenho de novas moléculas com potencial anti-inflamatório e anticâncer. Publicou artigos na área de biologia computacional em colaboração com grupos da Fiocruz e no exterior. Alguns de seus artigos na área: In silico identification of novel APRIL peptide antagonists and binding insights by molecular modeling and immunosorbent assays - *Protein & Peptide Letters*; Structural and Molecular Modeling Features of P2X Receptors - *International Journal of Molecular Sciences*; Toll-like Receptor 1 N248S Single-Nucleotide Polymorphism Is Associated With Leprosy Risk and Regulates Immune Activation During Mycobacterial Infection - *The Journal of Infectious Diseases*; Computational modeling of the bHLH domain of the transcription factor TWIST1 and R118C, S144R and K145E mutants - *BMC Bioinformatics*; Plausible binding mode of the active  $\alpha\beta 1$  antagonist, MK-0617, determined by docking and free energy calculations - *Journal of Theoretical and Computational Chemistry*; Analysis of  $\alpha\beta 1$  Integrin Specific Antagonists Binding Modes: Structural Insights by Molecular Docking, Molecular Dynamics and Linear Interaction Energy Method for Free Energy Calculations - *Journal of the Brazilian Chemical Society*. O pesquisador Raphael Trevizani, possui experiência nas áreas de programação, otimização, desenvolvimento de algoritmos e

aplicações em biologia computacional. Trabalhou com desenvolvimento de algoritmos de otimização para simulações de proteínas, especialmente voltado para a predição ab initio. Atualmente vem desenvolvendo algoritmos voltados para a busca de anticorpos melhorados, ie, com maior potencial de afinidade, especificidade e menor imunogenicidade. A pesquisadora Marcela Helena Gambim Fonseca, participante do nosso grupo de pesquisa e ingressa na Fiocruz-Ceará em 2013, possui experiência em Imunologia, como caracterização da função de receptores Fc de Imunoglobulinas e expressão de receptores Toll-Like. Tem experiência em cultura de células, vindo a contribuir nos ensaios de padronização da expressão de anticorpos em células de mamífero, bem como, nos ensaios de cultivos de linhagens tumorais para testes in vitro de anticorpos com ação terapêutica. O grupo possui ainda extensa experiência no estudo de neoplasias, destacando os trabalhos realizados pela pesquisadora Claudia do Ó Pessoa na área de bioprospecção de produtos naturais e sintéticos com atividade anticâncer. A motivação principal para participação da Dra. Cláudia está no desenvolvimento de bioconjugados no futuro.

#### **Contribuições :**

O grupo pretende contribuir com o desenvolvimento de anticorpos, enzimas terapêuticas e outras proteínas de interesse. No caso de anticorpos, fragmentos podem ser evoluídos contra alvos com interesse terapêutico, melhorando algum fenótipo de interesse, por exemplo, especificidade, humanização, afinidade, estabilidade e outros. Posteriormente o anticorpo completo pode ser restaurado ou simplesmente o fragmento pode ser utilizado. Serão utilizadas técnicas de engenharia de proteínas, rastreamento por phage display, Evolução Dirigida e simulações computacionais, que inclui uma ferramenta computacional capaz de propor variantes de fragmentos evoluídos com fenótipos desejados. Técnicas de evolução dirigida podem também ser aplicadas em diferentes classes de proteínas, de acordo com a propriedade que se queira melhorar. Com esse aspecto, proteínas em geral podem ser engendradas, inclusive quimeras, e obtidas por produção heteróloga, utilizando vários sistemas de expressão com especial interesse em expressão em leite de caprinos. Em resumo, pretende-se utilizar técnicas de Biologia Molecular e Bioinformática estrutural, atuando em sinergia, para engendrar proteínas quiméricas (anticorpos e outras necessárias), usando bibliotecas gênicas e vetores de expressão em modelos de procariotos e eucariotos. Salieta-se que outra área importante de atuação é o desenvolvimento de enzimas terapêuticas, uma vez que o grupo possui grande experiência desde o design racional, na engenharia de enzimas, até o desenvolvimento de bioprocessos.

#### **Interações :**

Nosso grupo possui uma consistente rede de colaborações que atua em diferentes áreas dentro do contexto da biologia sintética, possibilitando assim uma grande abrangência de recursos técnicos e experiência científica. Na área de evolução dirigida (evolução in-vitro de proteínas), contamos com a colaboração do grupo de Bioquímica e Biofísica de Proteínas da FFCLRP-USP, liderado pelo prof. Dr. Richard John Ward, com larga experiência em estudos de estrutura, função e evolução de proteínas. Contamos também com a parceria da empresa Invent Biotecnologia, presidida pelo Dr. Sandro Gomes Soares, sediada no SUPERA Parque de Inovação e Tecnologia de Ribeirão Preto, que atua na criação de bibliotecas e triagem de fragmentos de anticorpos humanos do tipo scFv e Fab contra alvos de interesse terapêutico. Por fim, destacamos também a recente colaboração estabelecida com o grupo de Biologia Sistêmica e Sintética da FMRP-USP, coordenado pelo prof. Dr. Rafael Silva Rocha, cuja ênfase é no estudo dos mecanismos de regulação gênica em modelos procariotos e eucariotos, usando abordagens experimentais e computacionais. No momento planeja-se uma parceria com a Fraunhofer-IME para desenvolvimento de anticorpos usando High Content Screening, para alvos de câncer.

# Estudo das Hepatites Virais

## dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/1297144689726255

**Protocolo:** 2015.52.23091532      **Status:** ACEITO

**Unidade:** IOC      **Sector:** Laboratorio de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia      **Departamento:** Virologia

**Líder:** VANESSA SALETE DE PAULA      **E-mail:** vdepaula.fiocruz@gmail.com

**Programa:** 3.3 - Biologia sintética (Fio-BioSin)      **Linha:** 27.6. Pesquisa, Desenvolvimento de novas tecnologias para diagnósticos rápidos, miniaturizados, automação, moleculares, biossensores, nanotecnologias para diagnóstico

### Trabalhos :

1. TOURINHO, R.S., Ribeiro, C.R.A, LEMOS, A. S., GARDINALI, N. R., VIEIRA, Y. R., SCHMIDT-CHANASIT, J., de Paula, V.S. Application of Synthetic Standard Curves for Absolute Quantification of Hepatitis A and E by Real-Time PCR. *Journal of Genetics and Genome Research.* , v.2, p.1 - 3, 2015.
2. de Paula, V. S. Laboratory diagnosis of hepatitis A. *Future Virology.* , v.7, p.461 - 472, 2012.
3. Amado LA. Saliva specimen sampling: a noninvasive method for diagnosis and basic investigation of viral hepatitis A, B and C. *Fut Virol* 2013; 8 (6), 575-588.
4. LIMA, L. R., DE ALMEIDA, ADILSON JOSÉ, Tourinho, R.S., HASSELMANN, B., LEWIS-XIMENEZ, L. L., de Paula, V.S. Evidence of Hepatitis A Virus Person-to-Person Transmission in Household Outbreaks. *Plos One.* , v.9, p.e102925 - , 2014.
5. DA SILVA JUNIOR, Haroldo Cid. Expressão heteróloga de proteínas do vírus da hepatite a e avaliação da imunogenicidade. 2015. Tese (Doutorado em Ciências) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro – RJ. Bruna Varginha R. Caiado. Produção e Avaliação em Termos de Imunogenicidade de Partículas Semelhantes a Vírus (VLPs) do Vírus da Hepatite A. Início: 2012. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco.
6. Alves ADR. Avaliação De Métodos Em Expressão E Purificação De Proteínas Recombinantes Do Vírus Da Hepatite A Em Sistemas Bacterianos Para Aplicação Em Imunodiagnóstico. Monografia. 2014. Universidade Estadual da Zona Oeste- Rio de Janeiro.
7. Moraes, A.C., Amado L.A., de Paula, V. S. Detection of replication-defective hepatitis A virus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Impresso).* , v.108, p.36 - 40, 2013.
8. Carneiro VCS. Desenvolvimento de teste rápido para detecção de anticorpos contra o vírus da hepatite A em fluido oral. Monografia. 2013. Universidade Estadual da Zona Oeste- Rio de Janeiro.
9. VAUGHAN, G., ROSSI, L. M. G., FORBI, J. C., de Paula, V. S., PURDY, M. A., XIA, G., KHUDYAKOV, Y. E. Hepatitis A virus: Host interactions, molecular epidemiology and evolution. *Infection, Genetics and Evolution (Print).* , p.227 - 243, 2013.
10. Tourinho, Renata Santos, ALMEIDA, A. J., Amado L.A., VILLAR, L. M., Motta-Castro, A.R.C., de Paula, V. S. Could oral fluid be used to evaluate anti-hepatitis A virus status in individuals living in difficult-to-access areas?. *Vaccine (Guildford).* , v.30, p.6421 - 6426, 2012.
11. Carneiro VCS, De Paula VS, Amado LA. Desenvolvimento de teste rápido para a detecção de anticorpos contra o vírus da hepatite A em fluido oral. XX Reunião anual de iniciação científica – Fiocruz/RJ. 20128.
12. VITRAL, C. L., ARTIMOS, S., de Paula, VS, FREIRE, M. S., GASPARGASPAR, L.P, AMADO, L. A., GASPARGASPAR, A. M. C., SOUTO, F. Declining prevalence of hepatitis A virus antibodies among children from low socioeconomic groups reinforces the need for the implementation of hepatitis A vaccination in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Impresso).* , v.107, p.652 - 658, 2012.
13. Amado, Luciane Almeida, VILLAR, Livia Melo, DE PAULA, Vanessa Salete, Pinto, Marcelo Alves, GASPARGASPAR, Ana Maria Coimbra 13. Exposure to multiple subgenotypes of hepatitis a virus during an outbreak using matched serum and saliva specimens. *Journal of Medical Virology (Print).* , v.83, p.768 - 775, 2011.
14. Tourinho, Renata Santos, Amado, Luciane Almeida, VILLAR, Livia Melo, Sampaio, Daniela Vieira, Moraes, Alyne Costa, Rodrigues do Ó, Kicia Maria, GASPARGASPAR, Ana Maria Coimbra, DE PAULA, Vanessa Salete Importance of the cutoff ratio for detecting antibodies against hepatitis A virus in oral fluids by enzyme immunoassay. *Journal of Virological Methods.* , v.173, p.169 - 174, 2011.
15. Amado L.A., Marchevsky, R.S., de Paula, V. S., Hooper C, Freire, M, GASPARGASPAR, Ana Maria Coimbra, PINTO, M. A. Experimental Hepatitis A Virus (HAV) Infection in Cynomolgus Monkeys (Macaca fascicularis): Evidence of Active Extrahepatic Site of HAV Replication. *International Journal of Experimental Pathology.* , v.91, p.87 - 97, 2010.
16. de Paula, V. S., Perse, A.S., Amado L.A., MORAIS, L. M., Lima, S.M.B., Tourinho, R.S., GASPARGASPAR, A. M. C., PINTO, M. A. Kinetics of hepatitis A virus replication in vivo and in vitro using negative-strand quantitative PCR. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* , v.1, p.1 - 1, 2009.
17. Santos, Débora Regina Lopes dos, VILLAR, Livia Melo, Paula, Vanessa Salete de, Lima, Gerson Silva de, GASPARGASPAR, Ana Maria Coimbra Hepatitis A virus subgenotypes dissemination during a community outbreak in a surrounding region of Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* , v.103, p.254 - , 2008.
18. AMADO, L, VILLAR, L, DEPAULA, V, GASPARGASPAR, A Comparison between serum and saliva for the detection of hepatitis A virus RNA. *Journal of Virological Methods.* , p.74 - , 2007.
19. de Paula, VS Diagnóstico e Epidemiologia Molecular do vírus da hepatite A. *SIICsalud (Buenos Aires).* , v.1, p.( <http://www.si> - , 2007.
20. Lu L, CHING, K. Z., de Paula, VS, NAKANO, T.,

Robertson B Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate). *Journal of General Virology*. , v.85, p.2943 - 2952, 2004. 21. DEPAULA, V, VILLAR, L, MORAIS, L, LEWISXIMENEZ, L, NIEL, C, GASPAR, A Detection of hepatitis A virus RNA in serum during the window period of infection. *Journal of Clinical Virology*. , v.29, p.254 - 259, 2004. 22. de Paula, Vanessa S., Lu, Ling, Niel, Christian, Gaspar, Ana M.C., Robertson, Betty H. Genetic analysis of hepatitis A virus isolates from Brazil. *Journal of Medical Virology*. , v.73, p.378 - 383, 2004. 23. RIBEIRO, C. R. A. ; Amado, L A ; SANTOS, R. T. ; LIMA, L. R. ; MELGAÇO, J. ; DE ALMEIDA, A. J. ; LEWIS-XIMENEZ, L. L. ; de Paula, V S . Avaliação da utilização de ensaio imunocromatográfico para o diagnóstico e estudo de prevalência da hepatite A. In: III Seminário Anual Científico e Tecnológico em Imunobiológicos de Bio-Manguinhos, 2015, Rio de Janeiro. Anais do III Seminário Anual científico e Tecnológico em Imunobiológicos. Rio de Janeiro: Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, 2015. p. 68-69

#### **Contribuições :**

A mudança do perfil epidemiológico da hepatite A no Brasil tem como consequência o aumento do número de pessoas suscetíveis à esta infecção. Com a recente implementação da vacina no calendário infantil, um teste rápido para hepatite A, utilizando biologia sintética, poderá ser utilizado para um diagnóstico rápido de casos agudos, esporádicos e em surtos epidêmicos, assim como em estudos de vigilância epidemiológica e avaliação da resposta vacinal. Durante o PDTIS iniciamos a expressão das proteínas do vírus da hepatite A em *E. coli* visando a produção de um teste rápido para hepatite A. Os resultados obtidos mostraram que as proteínas expressas têm potencial para o diagnóstico, contudo a expressão e a purificação precisavam ser aprimoradas para serem utilizadas no teste. No PPT pretendemos dar continuidade neste projeto através da expressão de proteínas sintéticas em sistema de *E. coli* e em baculovirus, utilizando como nova estratégia para expressão a otimização dos códons raros do vírus da hepatite A. Atualmente o teste para detecção de IgG anti-HAV já se encontra bastante avançado. Com a otimização da expressão pretendemos produzir um teste rápido nacional para detecção de anti-HAV IgM e anti-HAV IgG. A principal contribuição deste projeto será a produção de um kit de teste rápido para o diagnóstico e estudos da hepatite A utilizando tecnologia nacional

#### **Interações :**

O presente projeto contará com a colaboração do Dr. Bergmann Ribeiro da Universidade de Brasília. O pesquisador tem experiência na área de Microbiologia, com ênfase em biologia molecular de baculovírus, biologia molecular de vírus e produção de insumos biotecnológicos.

# Desenvolvimento de reagentes, insumos e equipamentos para Diagnóstico.

## dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/2028961948989898

**Protocolo:** 2015.265.04115438      **Status:** ACEITO

**Unidade:** ICC      **Setor:** Laboratório de Genômica      **Departamento:** Instituto Carlos Chagas

**Líder:** MARCO AURÉLIO KRIEGER      **E-mail:** mkrieger@fiocruz.br

**Programa:** 3.3 - Biologia sintética (Fio-BioSin)      **Linha:** 27.6. Pesquisa, Desenvolvimento de novas tecnologias para diagnósticos rápidos, miniaturizados, automação, moleculares, biossensores, nanotecnologias para diagnóstico

### Trabalhos :

O grupo em Parceria com Bio-Manguinhos, Instituto de Biologia Molecular do Paraná e com cPQAM vem utilizando técnicas de biologia sintética para o desenho de novos antígenos e anticorpos para utilização no desenvolvimento de testes para diagnóstico. 1: VIANA, ISABELLE F. T. ; SOARES, THEREZA A. ; LIMA, LUCIANNA F. O. ; MARQUES, ERNESTO T. A. ; Krieger, Marco A. ; DHALIA, RAFAEL ; LINS, ROBERTO D. . De novo design of immunoreactive conformation-specific HIV-1 epitopes based on Top7 scaffold. RSC Advances: an international journal to further the chemical sciences, v. 3, p. 11790-11800, 2013 2: Foti L, Fonseca Bde P, Nascimento LD, Marques Cde F, da Silva ED, Duarte CA, Probst CM, Goldenberg S, Pinto AG, Krieger MA. Viability study of a multiplex diagnostic platform for Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 Jul;104 Suppl 1:136-41. PubMed PMID: 19753468. 3: Gadelha AA, Verçosa AF, Lorena VM, Nakazawa M, Carvalho AB, Souza WV, Ferreira AG, Silva ED, Krieger MA, Goldenberg S, Gomes YM. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA with conventional ELISA and the haemagglutination test. Vox Sang. 2003 Oct;85(3):165-70. PubMed PMID: 14516446. 4: Silva ED, Pereira VR, Gomes JA, Lorena VM, Cançado JR, Ferreira AG, Krieger MA, Goldenberg S, Correa-Oliveira R, Gomes YM. Use of the EIE-recombinant-Chagas-biomanguinhos kit to monitor cure of human Chagas' disease. J Clin Lab Anal. 2002;16(3):132-6. PubMed PMID: 11968049. 5: Gomes YM, Pereira VR, Nakazawa M, Rosa DS, Barros MD, Ferreira AG, Silva ED, Ogatta SF, Krieger MA, Goldenberg S. Serodiagnosis of chronic Chagas infection by using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001 May;96(4):497-501. PubMed PMID: 11391421. 6: Carvalho MR, Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Shikanai-Yassuda MA, Ferreira AW, Pereira JB, Sáez-Alquézar A, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DF, et al. Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. Transfusion. 1993 Oct;33(10):830-4. PubMed PMID: 8236424. 7: dos Santos CN, Krieger MA, Almeida E, Lafaille JJ, Goldenberg S, Galler R. Trypanosoma cruzi flagellar repetitive antigen expression by recombinant baculovirus: towards an improved diagnostic reagent for Chagas' disease. Biotechnology (N Y). 1992 Nov;10(11):1474-7. PubMed PMID: 1369025. 8: Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Lafaille JJ, Pereira JB, Krieger H, Carvalho MR, Goldenberg S. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg. 1992 Apr;46(4):427-34. PubMed PMID: 1575289. 9: Almeida E, Krieger MA, Carvalho MR, Oelemann W, Goldenberg S. Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas disease and blood bank screening. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1990 Oct-Dec;85(4):513-7. PubMed PMID: 2152209. 10: Malaghini M, Thomaz-Soccol V, Probst CM, Krieger MA, Preti H, Kritski A, Soccol CR. Recombinant antigen production for assays of intradermoreaction for diagnosis and surveillance of tuberculosis. J Biotechnol. 2011 Oct 20;156(1):56-8. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.07.015. Epub 2011 Jul 22. PubMed PMID: 21810448. 11: Fonseca BP, Marques CF, Nascimento LD, Mello MB, Silva LB, Rubim NM, Foti L, Silva ED, Ferreira AG, Krieger MA. Development of a multiplex bead-based assay for detection of hepatitis C virus. Clin Vaccine Immunol. 2011 May;18(5):802-6. doi: 10.1128/CVI.00265-10. Epub 2011 Feb 23. PubMed PMID: 21346054; PubMed Central PMCID: PMC3122539.

### Contribuições :

O grupo pretende disponibilizar as técnicas de desenho e produção de genes sintéticos, incluindo a síntese dos iniciadores, e otimizar a expressão e purificação destas moléculas desde a fase de bancada até a produção em Boas Práticas de Fabricação.

### Interações :

O grupo tem importante colaboração com grupos no exterior na Universidade de Pittsburg e Stanford

# Imunidade das Doenças Virais -

<http://dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/4412799874911541>

**Protocolo:** 2015.274.05101723

**Status:**

ACEITO

**Unidade:** CPqRR

**Setor:**

Imunopatologia **Departamento:**

----

**Líder:** ALEXANDRE DE MAGALHÃES VIEIRA  
MACHADO

**E-mail:** amarok@cpqrr.fiocruz.br

**Programa:** 3.3 - Biologia sintética (Fio-BioSin)

**Linha:** 3.5. Estudos de candidatos vacinais voltados para infecções virais

## Trabalhos :

Trabalhos realizados pelo grupo na área do PPT (resumidos e/ou com referências de publicações relevantes do grupo): Os vírus Influenza são vírus envelopados de forma esférica ou filamentosa pertencente à família Orthomixoviridae e se dividem em três tipos A, B e C. Os vírus influenza do tipo A por sua vez estão subdivididos em diferentes subtipos. Esta classificação é feita em função das duas glicoproteínas de superfície: a hemaglutinina (HA: 1-18) e neuraminidase (NA: 1-11). Atualmente, circulam na população humana os vírus influenza A dos subtipos H1N1 e H3N2 e os vírus influenza do tipo B. Os vírus influenza A além serem responsáveis pelas epidemias sazonais de gripe, também podem causar pandemias esporádicas, quando novos vírus influenza (novos subtipos ou novo vírus influenza zoonótico), contra os quais não temos imunidade prévia, começam a circular na população humana prévia. Os ovos embrionados de galinha são o principal substrato para a produção de vacinas contra o vírus influenza. Resumidamente, os ovos são simultaneamente infectados com os vírus influenza contra os quais se pretende gerar a resposta imunológica e o isolado viral A/PR/8/34 (H1N1), o qual não é virulento para seres humanos, mas se multiplica de maneira eficaz em ovos embrionados. Apesar de esta técnica ser a espinha dorsal para a produção de vacinas contra vírus influenza há mais cinco décadas, ela apresenta limitações, dentre as quais o exíguo espaço de tempo de que as empresas dispõem para a produção e validação dos lotes vacinais a partir do momento em que a Organização Mundial da Saúde escolhe as amostras que deverão ser utilizadas para a confecção da vacina, havendo ocasiões em que determinado isolado viral não foi incluído na composição vacinal pelo fato de ele não se propagar de forma eficaz em ovos embrionados (10) Em se tratando de vacinas contra vírus influenza pandêmicos ou potencialmente pandêmicos, somam-se outros problemas àqueles previamente acima mencionados (sobretudo se em se tratando de vírus influenza altamente virulentos, como por exemplo, os vírus aviários H5N1 e H7N9). Dentre esses problemas, podemos destacar: 1) A necessidade de se utilizar cepas parentais dos vírus altamente patogênicos, alta virulência para o embrião de galinha e a demora na obtenção dos primeiros lotes vacinais, o que é um problema de importância maior quando se considera a rápida propagação que um vírus pandêmico na população humana e o seu potencial (dependendo do vírus pandêmico) em causar a morte de milhões de pessoas. Ao longo de pouco mais de dez anos, a tecnologia denominada genética reversa tem se estabelecido como uma alternativa promissora para a produção de vacinas contra os vírus influenza, devido a algumas características, dentre as quais: a possibilidade da introdução de mutações nos segmentos virais e assim, suprimir determinantes de patogenicidade e/ou aumentar a capacidade desses vírus em multiplicar em células e/ou ovos embrionados. Resumidamente, esta tecnologia consiste transfecção de células permissivas por plasmídeos, cada um deles codificando um dos segmentos do vírus influenza. Nessas construções, a expressão das sequências virais se encontra sob o controle de promotores das RNA polimerases humanas I e/ou II, as quais permitem a transcrição e a replicação dos segmentos virais e, conseqüentemente, a síntese de novas partículas virais (7-9). Essa técnica conferiu à biologia molecular dos vírus influenza uma plasticidade sem precedentes e se tornou uma ferramenta indispensável para, dentre outras aplicações, permitir o rápido desenvolvimento de vacinas contra vírus influenza causadores de gripe sazonal e pandêmica, além de impulsionar os estudos de utilização do vírus influenza como vetor para a construção de vacinas recombinantes (12). Neste sentido, o nosso grupo de pesquisa foi o pioneiro no Brasil na utilização da técnica da genética reversa do vírus influenza. Ao longo dos últimos onze anos, construímos vírus influenza recombinantes carreando antígenos de *Toxoplasma gondii* ou *Trypanosoma cruzi*, os quais foram utilizados com sucesso em protocolos de vacinação contra a toxoplasmose e a Doença de Chagas (1, 11). Além de publicações científicas, nossos estudos resultaram em patentes nacionais e internacionais. Artigos científicos: 1) Barbosa, R. P., B. G. Filho, L. I. Dos Santos, P. A. Junior, P. E. Marques, R. V. Pereira, D. C. Cara, O. Bruna-Romero, M. M. Rodrigues, R. T. Gazzinelli, and A. V. Machado. 2013. Vaccination using recombinants influenza and adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 are highly effective on protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *PloS one* 8:e61795. 2) Machado, A. V., B. C. Caetano, R. P. Barbosa, A. P. Salgado, R. H. Rabelo, C. C. Garcia, O. Bruna-Romero, N. Escriou, and R. T. Gazzinelli. 2010. Prime and boost immunization with influenza and adenovirus encoding the *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) induces strong protective immunity. *Vaccine* 28:3247-3256. Patentes: 1. GAZZINELLI, R. T. ; MACHADO, A. M. V. ; FONSECA, F. G. ; RODRIGUES, M. M. ; BARBOSA, R. P. A. ; Dutra M.S . Sequência geneticamente modificada do antígeno ts de *trypanosoma cruzi*, proteína recombinante ts e vírus geneticamente modificados que expressam o antígeno ts recombinante. 2008. 3. GAZZINELLI, R. T. ; MACHADO, A. M. V. ; BRUNA-ROMERO, O. ; CAETANO, B. C. ; ARAUJO, E. M. ; BARBOSA, R. P. A. ; FONSECA, F. G. . Utilização de vírus influenza recombinantes e vírus vaccinia Ankara modificado (MVA) com genes que codificam para as proteínas de superfície SAG1 e SAG2 do *Toxoplasma gondii* como vacinas contra Toxoplasmose. 2007. 4. GAZZINELLI, R. T. ; MACHADO, A. M. V. ; Dutra M.S ; FONSECA, F. G. ; RODRIGUES, M.



M. ; BARBOSA, R. P. A. . Sequência geneticamente modificada do antígeno asp-2 de trypanosoma cruzi, proteína recombinante asp-2 e vírus geneticamente modificados que expressam o antígeno asp-2 recombinante. 2007.

5. GAZZINELLI, R. T. ; MACHADO, A. M. V. ; BRUNA-ROMERO, O. ; RODRIGUES, M. M. . Sequências geneticamente modificadas dos antígenos ts e asp-2 de trypanosoma cruzi, constructos genéticos que contêm ts ou asp-2 e adenovírus geneticamente modificados que codificam TS ou ASP-2. 2007. Mais recentemente, nosso grupo de pesquisa construiu vírus influenza recombinantes defectivos para a multiplicação, os quais não causam doença nos hospedeiros inoculados, sendo não obstante, eficazes na indução da resposta imune . Ao longo dos últimos cinco anos, construímos mais de dez vírus influenza recombinantes defectivos para a multiplicação, carreando proteínas de outros patógenos (protozoários e bactérias) e citocinas ou quimiocinas murinas, os quais estão sendo atualmente utilizados em projetos relacionados ao desenvolvimento de vacinas, imunomodulação e estudo da imunopatogênese da infecção pelo vírus influenza (2). Finalmente, a partir de 2009, ano da pandemia da gripe suína, nosso grupo de pesquisa abriu outra frente de estudo, a qual tem como objetivo a utilização de técnicas de genética reversa para a construção de vírus influenza A recombinantes visando ao desenvolvimento de vacinas contra a gripe sazonal e pandêmica. Este projeto teve o apoio de Biomanguinhos (FIOCRUZ-RJ), celebrado através de uma Carta Compromisso e do financiamento pela FIOCRUZ, através do Programa de Desenvolvimento de Insumos em Saúde (PDTIS-Vacinas). Também é importante enfatizar a colaboração do grupo de Pesquisa do Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo (Instituto Oswaldo Cruz; IOC-FIOCRUZ/RJ), chefiado pela Dra Marilda Siqueira Teixeira, o qual selecionou, propagou e forneceu a maioria das amostras de vírus influenza que têm sido utilizadas nos nossos estudos. Finalmente nos últimos três anos, estabelecemos uma parceria com grupo coordenado pela Dra Laura Gil e pelo Dr. Lindomar Pena (Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz; CPqAM-FIOCRUZ/PE). Ambos os pesquisadores, cujos conhecimentos em virologia e biologia molecular do vírus influenza, têm sido de grande importância para o sucesso do nosso projeto, mais especificamente, utilizando técnicas alternativas para a construção dos plasmídeos de transferência dos segmentos da HA e da NA e nos processos de geração dos vírus pela técnica de genética reversa. Estes pesquisadores também serão colaboradores nesta proposta de programa de pesquisa translacional.

### **Contribuições :**

A primeira etapa para a construção de um vírus influenza recombinante pela técnica de genética reversa consiste na construção dos plasmídeos de transferências dos segmentos virais. Em se tratando da produção de vacinas, isso significa que é necessário que tenhamos acesso às amostras virais parentais, para as quais pretendemos gerar os vírus recombinantes carreando a HA e NA desse vírus e os demais segmentos do vírus A/PR8/34. Isto implica que entre o momento em que a OMS determina quais serão as amostras virais utilizadas para a confecção da vacina (sazonal ou pandêmica) e a disponibilidade dessas amostras por parte dos produtores de vacina, há um intervalo de tempo, o qual pode ser crucial, sobretudo em se tratando da produção de vacinas contra vírus influenza pandêmicos. As técnicas de Biologia Sintética são ferramentas promissoras para, associadas às técnicas de genética reversa, permitir a rápida construção de vírus influenza recombinantes. Dentre as diferentes aplicações da biologia sintética no contexto da geração de vírus influenza recombinantes, merecem menção: a manipulação do genoma viral e introdução de mutações nos segmentos virais e assim suprimir determinantes de patogenicidade, tais como o sítio de clivagem multibásico da hemaglutinina dos vírus H5N1 (13). A introdução de mutações que melhorem a multiplicação dos vírus influenza em linhagens celulares certificadas para a produção de vacinas e, conseqüentemente o rendimento da produção do vírus vacinais. Todavia, possivelmente a maior contribuição da tecnologia da biologia sintética para a técnica de genética reversa, consiste na eliminação da necessidade da disponibilidade da amostra viral para o início do processo de construção dos vírus recombinantes. Mais especificamente, a partir de dados disponíveis em bancos públicos como o Genbank, é possível iniciar o processo de síntese dos segmentos da HA dos isolados de vírus influenza selecionados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para serem incluídos na composição vacinal, sem que seja necessário aguardar o envio das amostras pela OMS. Os segmentos virais produzidos sinteticamente poderão tanto corresponder à sequência do vírus selvagem, ou carrear modificações no genoma, a fim de eliminar determinantes de virulência ou aumentar a multiplicação desses vírus no substrato escolhido. Desta forma, a tecnologia de biologia sintética, associada às técnicas de genética reversa, são ferramentas de primeira importância para a geração de vírus influenza recombinantes visando ao desenvolvimento de vacinas seguras, com alto rendimento de produção e geradas no menor espaço de tempo o possível (4). A fim de estabelecer a tecnologia de biologia sintética para a produção de vírus influenza recombinantes no âmbito da FIOCRUZ e dar maior robustez e rapidez para a construção dos vírus influenza recombinantes pela técnica de genética reversa, o nosso grupo de pesquisa estabeleceu recentemente uma parceria com o grupo liderado pelo Dr. Marco Krieger do Instituto Carlos Chagas (ICC; FIOCRUZ-PR). Esta etapa do projeto será coordenada pelo Dr. Alexandre Tavares Dias da Costa, o qual possui notório conhecimento nas técnicas de biologia sintética. Resumidamente, as sequências completas dos segmentos da HA (cerca de 1800 pares de bases) e da NA (cerca de 1400 pares de bases) serão (entre 3000 e 4000 bases) serão divididas em sequências menores, com aproximadamente 250-300 bases, e sintetizadas pela FioCruz-PR/IBMP em sintetizadores Expedite 8909 através do método de acoplamento de fosforamiditas (3). As sequências serão purificadas em coluna de fase reversa em HPLC (5) ou cartucho, e em seguida dessalinizadas. Cada sequência conterá uma pequena sobreposição, de aproximadamente 20 bases, com a sequência imediatamente seguinte. Esta sobreposição auxiliará no alinhamento correto das sequências, guiando a enzima Taq DNA polimerase no preenchimento da fita complementar. As reações de preenchimento das fitas complementares serão visualizadas em gel de agarose e extraídas para posterior amplificação por PCR e sequenciamento. Uma vez confirmada a sequência das construções, os genes sintéticos serão enviados para as equipes do CPqRR e CPqAM, a fim de que sejam utilizados para a geração dos vírus Influenza recombinantes. A participação do Grupo de Pesquisa Imunidade Inata das Doenças Virais do CPqRR consistirá na construção dos plasmídeos de transferência da HA e da NA a partir dos genes sintéticos enviados pela equipe do ICC, geração, propagação e caracterização dos vírus influenza recombinantes construídos pela técnica de genética reversa. Além disso, através da parceria estabelecida com o grupo liderado pelo Dr. Jerônimo Conceição Ruiz, do Grupo Informática de Biosistemas do CPqRR, será criado um banco de dados no qual serão incluídos as informações disponíveis na literatura acerca das mutações relacionadas à adaptação dos vírus influenza aos substratos cultura

celular e ovo embrionado. Desta forma, as sequências das HA e NA disponibilizadas nos bancos de dados públicos serão analisadas frente às informações disponíveis nos nossos bancos de dados, a fim de gerar sequências da HA e da NA adaptadas aos substratos de interesse, a fim de melhorar a multiplicação desses vírus, sem contudo comprometer a sua imunogenicidade. Inicialmente, estabeleceremos a tecnologia de biologia sintética para gerar os segmentos da HA e da NA, os quais, por sua vez, serão utilizados na técnica de genética reversa para a geração de vírus influenza A de subtipos H1N1 e H3N2 em cultura celular. Uma vez construídos e devidamente caracterizados, esses vírus serão propagados em ovos embrionados quanto em células MDCK, as quais também são utilizadas como substrato para a produção de vacinas contra o vírus influenza (6). Uma vez que tenhamos estabelecido a tecnologia para a produção de vírus influenza A de subtipos H1N1 e H3N2, extrapolaremos essa técnica para a construção de vírus influenza do tipo B. Finalmente, num terceiro momento, avaliaremos a nossa capacidade em construir vírus influenza recombinantes dos subtipos potencialmente pandêmicos H5N1 e H7N9 (amostras vacinais de baixa virulência). Concluindo, a nossa proposta resultará na consolidação da rede de pesquisadores já existente e agregará outros pesquisadores de diferentes instituições, com diferentes expertises, criando desta forma, Grupo Transdisciplinar de Desenvolvimento de Vacinas contra o Vírus Influenza, o qual trabalhará de forma coordenada visando ao estabelecimento de protocolos não somente capazes de resultar na geração de vírus influenza recombinantes no menor espaço de tempo o possível, mas também contribuir para a autonomia do Brasil no que tange à produção de vacinas contra vírus influenza pandêmicos e sazonais. Finalmente, esperamos estabelecer futuramente outras colaborações com pesquisadores de outros grupos de pesquisa no Brasil e no exterior, consolidando ainda mais o nosso grupo, tornando-nos ainda mais aptos a responder de forma mais rápida e eficaz ao agravo influenza.

Referências bibliográficas 1. Barbosa, R. P., B. G. Filho, L. I. Dos Santos, P. A. Junior, P. E. Marques, R. V. Pereira, D. C. Cara, O. Bruna-Romero, M. M. Rodrigues, R. T. Gazzinelli, and A. V. Machado. 2013. Vaccination using recombinants influenza and adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 are highly effective on protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *PloS one* 8:e61795. 2. Barbosa, R. P., A. P. Salgado, C. C. Garcia, B. G. Filho, A. P. Goncalves, B. H. Lima, G. A. Lopes, M. A. Rachid, A. C. Peixoto, D. B. de Oliveira, M. A. Ataíde, C. A. Zirke, T. M. Cotrim, E. A. Costa, G. M. Almeida, R. C. Russo, R. T. Gazzinelli, and M. Machado Ade. 2014. Protective immunity and safety of a genetically modified influenza virus vaccine. *PloS one* 9:e98685. 3. Beaucage, S. L., and R. P. Lyer. 1993. The synthesis of modified oligonucleotides by the phosphoramidite approach and their applications. *Tetrahedron* 49: 6123–6194. 4. Dormitzer, P. R., P. Suphaphiphat, D. G. Gibson, D. E. Wentworth, T. B. Stockwell, M. A. Algire, N. Alperovich, M. Barro, D. M. Brown, S. Craig, B. M. Dattilo, E. A. Denisova, I. De Souza, M. Eickmann, V. G. Dugan, A. Ferrari, R. C. Gomila, L. Han, C. Judge, S. Mane, M. Matrosovich, C. Merryman, G. Palladino, G. A. Palmer, T. Spencer, T. Strecker, H. Trusheim, J. Uhlendorff, Y. Wen, A. C. Yee, J. Zaveri, B. Zhou, S. Becker, A. Donabedian, P. W. Mason, J. I. Glass, R. Rappuoli, and J. C. Venter. 2013. Synthetic generation of influenza vaccine viruses for rapid response to pandemics. *Science translational medicine* 5:185ra168. 5. Gilar, M., K. J. Fountain, Y. Budman, U. D. Neue, K. R. Yardley, P. D. Rainville, R. J. Russell, 2nd, and J. C. Gebler. 2002. Ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography analysis of oligonucleotides: retention prediction. *Journal of chromatography*. A 958:167-182. 6. Gregersen, J. P., H. J. Schmitt, H. Trusheim, and M. Broker. 2011. Safety of MDCK cell culture-based influenza vaccines. *Future microbiology* 6:143-152. 7. Hoffmann, E., S. Krauss, D. Perez, R. Webby, and R. G. Webster. 2002. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine* 20:3165-3170. 8. Hoffmann, E., G. Neumann, G. Hobom, R. G. Webster, and Y. Kawaoka. 2000. "Ambisense" approach for the generation of influenza A virus: vRNA and mRNA synthesis from one template. *Virology* 267:310-317. 9. Hoffmann, E., G. Neumann, Y. Kawaoka, G. Hobom, and R. G. Webster. 2000. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:6108-6113. 10. Lu, B., H. Zhou, D. Ye, G. Kemble, and H. Jin. 2005. Improvement of influenza A/Fujian/411/02 (H3N2) virus growth in embryonated chicken eggs by balancing the hemagglutinin and neuraminidase activities, using reverse genetics. *Journal of virology* 79:6763-6771. 11. Machado, A. V., B. C. Caetano, R. P. Barbosa, A. P. Salgado, R. H. Rabelo, C. C. Garcia, O. Bruna-Romero, N. Escriou, and R. T. Gazzinelli. 2010. Prime and boost immunization with influenza and adenovirus encoding the *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) induces strong protective immunity. *Vaccine* 28:3247-3256. 12. Rocha, C., B. Caetano, A. Machado, and O. Bruna-Romero. 2004. Recombinant viruses as tools to induce protective cellular immunity against infectious diseases. *International Microbiology* 7:89-94. 13. Subbarao, K., and J. M. Katz. 2004. Influenza vaccines generated by reverse genetics. *Current topics in microbiology and immunology* 283:313-342.

#### **Interações :**

Até o presente momento, não estabelecemos parecerias com grupos ou instituições externas à FIOCRUZ. Todavia é importante salientar que já dispomos de uma carta compromisso com Biomanguinhos.

# Laboratório de Modelagem de Sistemas Biológicos (aguarda decisão da Presidência) - <http://dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/0000000000000181>

**Protocolo:** 2015.184.28065940

**Status:** ACEITO

**Unidade:** CDTS      **Sector:** Laboratório de Modelagem de  
Sistemas Biológicos

**Departamento:** CDTS

**Líder:** NICOLAS CARELS      **E-mail:**

nicolas.carels@gmail.com

**Programa:** 3.3 - Biologia sintética  
(Fio-BioSin)      **Linha:**

9.11. Bioinformática e Biologia Computacional,  
modelagem de Sistemas

## **Trabalhos :**

DOI: 10.4137/BBI.S10053 DOI: 10.4137/BBI.S13161 DOI: 10.4137/BBI.S24021

## **Contribuições :**

Genes sintéticos

## **Interações :**

Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Ciências Exatas e da Terra. Rua Silveira Martins, 2555, Cabula, 41195001 - Salvador, BA - Brasil Department of Physics, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada T6G 2E1

# Proteômica e Engenharia de Proteínas - <http://dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/8356769112192899>

**Protocolo:** 2015.192.28100929

**Status:** ACEITO

**Unidade:** IOC      **Setor:** Laboratório de Proteômica e Engenharia de Proteínas

**Departamento:** N/A

**Líder:** NILSON IVO TONIN ZANCHIN      **E-mail:**

nizanchin@fiocruz.br

**Programa:** 3.3 - Biologia sintética (Fio-BioSin)      **Linha:**

9.7. Pesquisa, desenvolvimento e uso de ferramentas de Biologia Sintética

## Trabalhos :

O grupo de Proteômica e Engenharia de Proteínas utiliza recursos e métodos de Biologia Sintética aplicado ao desenvolvimento de novos sistemas de expressão para proteínas e anticorpos recombinante em sistemas de expressão de *E. coli*, *Pichia pastoris*, células de inseto e células de mamíferos. O grupo tem se dedicado ao desenvolvimento de sistemas e processo de produção de antígenos e anticorpos para novos testes de diagnóstico do conjunto de patógenos testados no controle de qualidade do sangue de doadores na hemorrede brasileira e do diagnóstico do conjunto de patógenos testados no acompanhamento materno-infantil. Embora fundado há menos de quatro anos, o grupo já estabeleceu em escala de sistema de expressão e processo da purificação de proteínas antigênicas de onze patógenos além de um anticorpo contra um antígeno viral. Estes antígenos já tiveram sua eficiência em sistemas de diagnóstico testados pela técnica de ELISA, de micro-arranjos líquidos e em testes rápidos em membranas. Boa parte dos antígenos, particularmente os desenvolvidos para detectar a doença de Chagas, sífilis, toxoplasmose e a hepatite C apresentaram o nível de reação requerido para serem incluídos dos testes de diagnóstico e já foram selecionados para serem incluídos nestes novos produtos que estão sendo desenvolvidos no âmbito do Instituto de Biologia Molecular do Paraná, do Laboratório de Tecnologia de Diagnóstico do Instituto de Imunobiológicos de Biomanguinhos, do Centro de Pesquisa Ageu Magalhães, tendo também participação no desenvolvimento de nova instrumentação para estes testes pesquisadores da Universidade Federal do Paraná e da Universidade Técnica Federal do Paraná. Os resultados diretos obtidos até o momento correspondem a nada menos que 48 sistemas de expressão estabelecidos e processos de purificação padronizados que formam um ativo estratégico para o Instituto de Biologia Molecular do Paraná e a FIOCRUZ na produção de insumos para imunodiagnóstico. O desenvolvimento do projeto teve um componente importante na formação de recursos humanos com a formação de oito alunos de pós-graduação (3 mestrandos e 5 doutorandos) além de seis pós-doutorandos, os quais adquiriram conhecimentos específicos com as tecnologias de produção de proteínas recombinantes e purificação de proteínas para aplicações sbiotecnológicas. Vale ressaltar também o desenvolvimento da expressão de um anticorpo recombinante funcionalmente ativo em células de mamíferos.

## Contribuições :

O grupo pode contribuir tanto com seus conhecimentos que domina na área de Biologia Sintética como com a infraestrutura laboratorial associada ao Laboratório e à Plataforma de Proteínas do Instituto Carlos Chagas. O conhecimento científico envolve o planejamento e a concepção de novas proteínas, utilizando ou o conhecimento da sua estrutura tridimensional quando disponível, para gerar novas proteínas para aplicações biotecnológicas. O grupo também atua na otimização de vetores de expressão com melhorias específicas destinadas a expressar proteínas sintéticas e oligoméricas, estas na devida proporção estequiométrica. O desenho das novas proteínas com métodos de Biologia Sintética vem sendo aplicados para uma série de objetivos: - obter níveis maiores de expressão de proteínas com estrutura complexa. - reduzir o número de processos fermentativos e conseqüentemente os custo e o tempo de produção das proteínas de interesse biotecnológico. - desenvolver anticorpo para diagnóstico de patógenos. - desenvolver proteínas terapêuticas com novas propriedades específicas, por exemplo com maior tempo de vida, maior taxa de catálise e menor imunogenicidade. Para alcançar estes objetivos, uma série de parâmetros são otimizados para obtenção de genes sintéticos com alta taxa de expressão e proteínas recombinantes com propriedades mais favoráveis a produção recombinante, maior tempo de vida, maior estabilidade no armazenamento e manutenção da taxa de atividade.

## Interações :

1. Instituto de Biologia Molecular do Paraná. No contexto da Interação com o Instituto de Biologia Molecular do Paraná trabalhamos desenvolvimento de sistemas e processo de produção de antígenos e anticorpos para novos testes de diagnóstico do conjunto de patógenos testados no controle de qualidade do sangue de doadores na hemorrede brasileira e do diagnóstico do conjunto de patógenos testados no acompanhamento materno-infantil. Atuamos também como consultores e colaboradores na implantação de um Laboratório de Bioprocessos em escala piloto de fermentação e processamento pós-fermentação para produção de proteínas recombinantes. 2. Centro de Biologia Sintética Integrativa de Warwick (Warwick Integrative Synthetic Biology Centre (WISB)). Através desta cooperação interancional, já consolidada pelo nosso grupo, podemos temos acesso à tecnologias avançadas em Biologia Sintética, as quais podemos aplicar para o desenvolvimento de biofármacos e de proteínas terapêuticas e de diagnóstico. 3. Instituto Nacional do Cancer, Rio de Janeiro. No contexto da Interação com o Instituto Nacional do Câncer desenvolvemos novas ferramentas bioquímicas para quantificação de marcadores moleculares de câncer de

pulmão utilizando métodos de Biologia Sintética. As novas ferramentas serão testadas em novos métodos de quantificação destes marcadores

# Genômica Comparativa e aplicações biotecnológicas em saúde - dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/6373052067063189

**Protocolo:** 2015.301.06114932

**Status:** ACEITO

**Unidade:** IOC    **Setor:** Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática - LAGFB

**Departamento:** DBBM

**Líder:** WIM DEGRAVE  
3.3 - Biologia

**E-mail:**

wdegrave@fiocruz.br

**Programa:** sintética (Fio-BioSin)

**Linha:**

9.7. Pesquisa, desenvolvimento e uso de ferramentas de Biologia Sintética

## **Trabalhos :**

Construção e expressão de genes sintéticos em E. coli Otimização de codons para expressão em sistemas diversos Desenvolvimento de sistemas de expressão heteróloga em sistemas bacterianas diversos, algas e cianobactérias

## **Contribuições :**

Construção e expressão de genes sintéticos em E. coli Otimização de codons para expressão em sistemas diversos Desenvolvimento de sistemas de expressão heteróloga em sistemas diversos Seleção e uso de aptâmeros

## **Interações :**

LNCC

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, Rio de Janeiro - CEP: 21040-360 - Tel: (0xx21) 3885-1696