

# ESTUDOS VISANDO AO DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE PARTÍCULAS PSEUDO-VIRAIS DE DENGUE

Nathalia Ribeiro de Mattos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientadora: Leda dos Reis Castilho

Rio de Janeiro

Maio de 2023

ESTUDOS VISANDO AO DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO PARA  
OBTENÇÃO DE PARTÍCULAS PSEUDO-VIRAIS DE DENGUE

Nathalia Ribeiro de Mattos

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS  
PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA  
QUÍMICA.

Orientadores: Leda dos Reis Castilho

Aprovada por: Dr. Martin Hernan Bonamino

Prof. Dr. André Macedo Vale

Prof. Dr. Renato Sampaio Carvalho

Prof. Dr. Ivaldo Itabaiana Júnior

Prof<sup>a</sup>. Dr. Helen Conceição Ferraz

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MAIO DE 2023

Ribeiro de Mattos, Nathalia

Estudos Visando ao Desenvolvimento de Processo para  
Obtenção de Partículas Pseudo-Virais de Dengue/Nathalia  
Ribeiro de Mattos – Rio de Janeiro: UFRJ/ COPPE, 2023.

XV, 96 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadora: Leda dos Reis Castilho

Tese (Doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de  
Engenharia Química, 2023.

Referências Bibliográficas: p. 75-92.

1. Partículas pseudo-virais. 2. Dengue. 3. Cultivo de  
células animais. 4. Cromatografia. 5. Transfecção. I. Castilho,  
Leda dos Reis. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

# Agradecimentos

Dedico esse trabalho principalmente a minha mãe, por sempre apoiar meus sonhos e não medir esforços para que eu os realize. Você é minha inspiração de força e coragem.

À minha família, que mesmo distante, me apoia e compreende minha ausência nos momentos importantes. Sem vocês eu não alcançaria meus objetivos.

Ao meu tio Guilherme Travassos por me incentivar e ser minha inspiração. Certamente, sem seu exemplo e afinco eu não estaria aqui hoje.

Ao PEQ e a COPPE, bem como aos funcionários, pela oportunidade de realizar o doutorado em uma instituição tão bem qualificada e por todo o apoio.

À CAPES por viabilizar a realização do doutorado com a concessão da bolsa de estudos.

Aos Professores Leda pela oportunidade e pelas contribuições para a realização desse projeto.

Aos amigos que tive o prazer de conhecer nessa caminhada e que foram fundamentais em todos os momentos, vocês me fizeram crescer.

Por fim, agradeço os companheiros do LECC, por dividirem o conhecimento, pela troca de experiências e pelo convívio diário. Agradeço a cada um que tive a oportunidade de conhecer. Um agradecimento especial para Wallace e Túlio pela paciência, pelo auxílio sempre que solicitado. Vocês foram indispensáveis nessa caminhada.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém  
ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

*Arthur Schopenhauer*

Resumo da tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.).

## ESTUDOS VISANDO AO DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE PARTÍCULAS PSEUDO-VIRAIS DE DENGUE

Nathalia Ribeiro de Mattos

Maio/2023

Orientadores: Leda dos Reis Castilho

Programa: Engenharia Química

Neste trabalho, partículas pseudo-virais (VLPs, do inglês *virus-like particles*) dos quatro sorotipos do vírus da Dengue foram produzidas, purificadas e caracterizadas. As VLPs foram produzidas por células da linhagem HEK293-3F6 transfectadas utilizando lipídeos catiônicos e o vetor plasmidial contendo as sequências genéticas referentes às proteínas estruturais de pré-membrana (prM) e envelope (E) dos respectivos sorotipos do vírus. As células transfectadas foram cultivadas em suspensão sob agitação orbital, em meio de cultivo quimicamente definido e livre de compostos de origem animal. Para a purificação das VLPs, foi utilizada a técnica cromatográfica de troca iônica (IEX) com uma membrana de troca aniônica, seguida por uma etapa de cromatografia de exclusão estérica (SXC), realizada com uma membrana de troca catiônica na presença de PEG (polietilenoglicol 8% m/v), realizando-se por fim a concentração das VLPs utilizando um dispositivo contendo membranas de ultrafiltração de poliétersulfona (PES) com massa molecular de corte de 100 kDa. As amostras purificadas foram avaliadas através das técnicas de *Immunoblot*, eletroforese e *Western blot*, quantificação de proteínas totais, SEC-HPLC, quantificação de DNA residual e microscopia eletrônica de transmissão. As análises confirmaram que foi possível obter partículas pseudo-virais para os quatro sorotipos do vírus da dengue com tamanho e estrutura compatíveis com os vírus nativos. O processo de purificação combinando as técnicas cromatográficas de IEX e SXC se mostrou eficiente para remoção de contaminantes críticos, e a ultrafiltração/diafiltração (UF/DF) foi útil para concentrar as amostras de DENV1/TT, DENV2/TT e DENV1/TE.

Abstract of thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

## STUDIES ON THE DEVELOPMENT OF A PROCESS FOR OBTAINING DENGUE VIRUS-LIKE PARTICLES

Nathalia Ribeiro de Mattos

May/2023

Advisors: Leda dos Reis Castilho

Department: Chemical Engineering

In this work, virus-like particles (VLPs) of the four serotypes of the dengue virus were produced, purified and characterized. The VLPs were produced by HEK293-3F6 cells transfected using cationic lipids and the plasmid vector containing the genetic sequences encoding the pre-membrane (prM) and envelope (E) proteins of the respective virus serotypes. The cells were grown in suspension culture under orbital agitation, in a chemically-defined, animal-component free medium. In the purification process, the ion exchange chromatography (IEX) technique utilizing an anion exchange membrane was applied, followed by steric exclusion chromatography (SEC) utilizing a cation exchange membrane in the presence of PEG (polyethylene glycol 8% m/v). Finally, the concentration of the VLPs was carried out using a device containing ultrafiltration membranes of polyethersulfone (PES) with a molecular mass cut-off of 100 kDa. Purified samples were evaluated using Immunoblot, SDS-PAGE and western blot techniques, total protein quantification, SEC-HPLC, residual DNA quantification and transmission electronic microscopy. The analyses confirmed that it was possible to obtain virus-like particles for the four serotypes of the dengue virus with size and structure compatible with the native viruses. The purification process combining IEX and SEC chromatographic techniques proved to be efficient for removing critical contaminants, and ultrafiltration/diafiltration (UF/DF) was useful for concentrating DENV1/TT, DENV2/TT, and DENV1/TE samples.

# Sumário

Lista de Figuras .....	X
Lista de Tabelas .....	XIII
Lista de abreviações.....	XIV
1. Introdução .....	1
2. Revisão da literatura.....	4
2.1. <i>Dengue</i> .....	4
2.1.1. Epidemiologia .....	4
2.1.2. O vírus.....	7
2.1.3. A doença .....	10
2.2. <i>Vacinas</i> .....	11
2.2.1. Vacinas para dengue em desenvolvimento.....	17
2.3. <i>Cultivo de células animais</i> .....	23
2.4. <i>Biorreatores e modos de operação</i> .....	25
2.5. <i>Purificação de proteínas recombinantes</i> .....	27
2.5.1. Cromatografia de troca iônica .....	28
2.5.2. Cromatografia de exclusão estérica.....	30
3. Objetivos .....	32
4. Metodologia .....	33
4.1. <i>Desenvolvimento das linhagens celulares recombinantes</i> .....	33
4.2. <i>Construções gênicas e vetores de expressão</i> .....	33
4.3. <i>Produção das VLPs</i> .....	36
4.3.1. Transfecções transientes.....	36
4.3.2. Transfecções estáveis .....	36
4.3.3. Produção em frascos agitados.....	37
4.3.4. Produção em biorreator do tipo tanque agitado .....	37
4.4. <i>Purificação de VLPs de DENV</i> .....	38

4.4.1.	Cromatografia de troca iônica .....	38
4.4.2.	Cromatografia de exclusão estérica.....	39
4.4.3.	Ultrafiltração/Diafiltração.....	39
4.5.	<i>Ensaio Analítico</i> .....	40
4.5.1.	<i>Immunoblot</i> .....	40
4.5.2.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	41
4.5.3.	Imunoensaio de <i>Western blot</i> .....	43
4.5.4.	Quantificação de proteínas totais.....	43
4.5.5.	Cromatografia líquida de alta eficiência com coluna de exclusão molecular (SEC-HPLC) .....	43
4.5.6.	Quantificação de DNA residual .....	44
4.5.7.	Microscopia eletrônica de transmissão (MET) .....	45
5.	Resultados e Discussão .....	46
5.1.	<i>Produção de VLPs de DENV em células HEK293</i> .....	46
5.1.1.	Produção de VLPs de DENV1-4 por meio de transfecção transiente... 46	
5.1.2.	Produção de VLPs de DENV1 por meio de células estáveis cultivadas em biorreator.....	47
5.2.	<i>Purificação de VLPs de DENV</i> .....	49
5.2.1.	Investigação de um processo baseado em cromatografia de exclusão estérica (SXC) e ultrafiltração/diafiltração (UF/DF).....	49
5.2.1.1.	Avaliação da identidade e da presença de impurezas proteicas por SDS-PAGE e <i>Western blot</i> .....	54
5.2.1.2.	Avaliação da estrutura das VLPs por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	57
5.2.1.3.	Avaliação de pureza cromatográfica por SEC-HPLC .....	58
5.2.1.4.	Quantificação de proteínas totais.....	64
5.2.1.5.	Avaliação da presença de DNA residual como contaminante crítico derivado do processo.....	66
5.2.2.	Investigação de um processo baseado em cromatografias de troca iônica e exclusão estérica e ultrafiltração/diafiltração .....	67
5.2.2.1.	Avaliação da identidade e da presença de impurezas proteicas por SDS-PAGE e <i>Western blot</i> .....	70
5.2.2.2.	Quantificação de proteínas totais.....	71
6.	Conclusões e Sugestões.....	73

6.1. Conclusões.....	73
6.2. Sugestões .....	73
Referências Bibliográficas .....	75
Apêndices.....	93

# Lista de Figuras

FIGURA 1. Número total de casos de dengue reportado nas Américas nos últimos 13 anos.

FIGURA 2. Distribuição da taxa de incidência de dengue, por município, no Brasil. Semanas epidemiológicas de 1-51.

FIGURA 3. Esquema do genoma do vírus da dengue. Denomina-se que capsídeo C, pr-e-membrana, prM e envelope E.

FIGURA 4. Estrutura da proteína do envelope (E) da dengue.

FIGURA 5. Organização da proteína E na superfície do vírus da dengue

FIGURA 6. Diagramas esquemáticos de flavivírus.

FIGURA 7. Esquema exemplificativo das transfecções estável e transiente.

FIGURA 8. Ilustração das etapas de separação em cromatografia de troca aniônica.

FIGURA 9. Mecanismo de ação do PEG na SXC.

FIGURA 10. Mapa do plasmídeo pCI-neo utilizado como vetor de expressão.

FIGURA 11. Vetor plasmidial recombinantes do sorotipo 1 do vírus da dengue.

FIGURA 12. Gel de agarose dos plasmídeos recombinantes dos quatro sorotipos da dengue sem digestão e com digestão enzimática.

FIGURA 13. Immunoblot das amostras de sobrenadante obtidas por transfecção transiente em 48h pós-transfecção.

FIGURA 14. Perfil cinético das células HEK293-DENV1 cultivadas em biorreator operado em modo batelada.

FIGURA 15. Immunoblot das amostras de VLPs de DENV1/TE da cinética em biorreator operado em modo batelada.

FIGURA 16. Perfil de consumo de glicose e produção de lactato para a cinética de produção de VLPs de DENV1/TE em biorreator operado em modo batelada.

- FIGURA 17. Cromatograma do processo purificação por SXC utilizando membrana de troca catiônica e Immunoblot utilizando anticorpo primário 4G2 das frações da cromatográfica de SXC para DENV1.
- FIGURA 18. Cromatograma do processo purificação por SXC utilizando membrana de troca catiônica e Immunoblot utilizando anticorpo primário 4G2 das frações da cromatográfica de SXC para DENV2.
- FIGURA 19. Cromatograma do processo purificação por SXC utilizando membrana de troca catiônica e Immunoblot utilizando anticorpo primário 4G2 das frações da cromatográfica de SXC para DENV3.
- FIGURA 20. Cromatograma do processo purificação por SXC utilizando membrana de troca catiônica e Immunoblot utilizando anticorpo primário 4G2 das frações da cromatográfica de SXC para DENV4.
- FIGURA 21. SDS-PAGE das amostras de VLP antes e após purificação. A) DENV1 e DENV2. B) DENV3 e DENV4.
- FIGURA 22. Western blot de amostras de VLP antes e após purificação. A) DENV1 e DENV2. B) DENV3 e DENV4.
- FIGURA 24. Imagem de MET de VLPs de DENV1/TE.
- FIGURA 25. Cromatogramas obtidos por SEC-HPLC. A) SN de DENV1. B) comparação SN, eluído e retido UF/DF de DENV1.
- FIGURA 26. Cromatogramas obtidos por SEC-HPLC. A) SN de DENV2. B) comparação SN, eluído e retido UF/DF de DENV2.
- FIGURA 27. Cromatogramas obtidos por SEC-HPLC. A) SN de DENV3. B) comparação SN, eluído e retido UF/DF de DENV3.
- FIGURA 28. Cromatogramas obtidos por SEC-HPLC. A) SN de DENV4. B) comparação SN, eluído e retido UF/DF de DENV4.
- FIGURA 29. Cromatograma do processo purificação por IEX utilizando membrana de troca aniônica e Immunoblot utilizando anticorpo primário 4G2 das frações da cromatografia.

FIGURA 30. Cromatograma do processo purificação por SXC utilizando membrana de troca aniônica e Immunoblot utilizando anticorpo primário 4G2 das frações da cromatografia.

FIGURA 31. Western blot e SDS-PAGE de amostras de VLP antes e após purificação para VLPs DENV1/TE.

FIGURA A1. Curva padrão e regressão linear para determinação da concentração de proteínas totais de DENV 1-4/TT, utilizando BSA como padrão.

FIGURA A2. Curva padrão e regressão linear para determinação da concentração de proteínas totais de DENV1/TE, utilizando BSA como padrão.

FIGURA A3. Curva padrão e regressão linear para determinação da concentração de proteínas totais de DENV1-4/TT, por SEC-HPLC.

FIGURA A4. Curva padrão e regressão linear para determinação de DNA residual da célula hospedeira.

# Lista de Tabelas

TABELA 1. Possíveis vacinas recombinantes para dengue que não atingiram as fases de ensaios clínicos.

TABELA 2. Candidatos a vacina para dengue em fase de ensaios clínicos.

TABELA 3. Identificador do Genbank das sequências utilizadas.

TABELA 4. Concentração de proteínas totais determinada nos eluídos de SXC e concentrados de UF/DF, das amostras de VLPs de DENV 1-4/TT.

TABELA 5. Concentração de VLPs de DENV 1 – 4/TT no retido de UF/DF obtidas por HPLC/SEC/UV.

TABELA 6. Dados para a determinação da eficiência de remoção de DNA residual.

TABELA 7. Concentração de proteínas totais determinada nas frações de SN, alimentação, eluídos de IEX e SXC, concentrados de UF/DF e permeado UF/DF, das amostras de VLPs de DENV 1/TE.

# Lista de abreviações

VLP – Partículas pseudo-virais (*virus-like particles*)

prM – proteína de pré-membrana

E - Glicoproteína do envelope

C – Proteína do envelope

SN – Sobrenadante

ADE – Aumento imunomediado da infecção (*Antibody-dependent enhancement of infection*)

IEX – Cromatografia de troca iônica

SXC – Cromatografia de exclusão estérica

DENV – Vírus da Dengue

DENV1-4/TT – VLPs obtidas por transfecção transiente

DENV1/TE – VLPs obtidas por transfecção estável

DNA – Ácido desoxirribonucleico

RNA - Ácido Ribonucleico

WHO/OMS – Organização Mundial da Saúde

PAHO – Organização Pan-Americana da Saúde

FD - Febre da dengue

FHD - Febre hemorrágica da dengue

SCD - Síndrome do choque da dengue potencialmente fatal

CHO – Célula de ovário de hamster chinês

NS0 – Célula de mieloma de camundongo

BHK – Célula de rim de hamster neonato

HEK-293 – Célula de rim de embrião humano

SAGE - Grupo de Especialistas de Aconselhamento Estratégico da OMS

NMRC - US Naval Medical Research Center

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

## 1. Introdução

A dengue é uma doença que tem se espalhado rapidamente pelo mundo, tornando-se endêmica em mais de 100 países e colocando quase metade da população mundial em risco de infecção. Segundo a Organização Mundial da Saúde, nos últimos 50 anos, a incidência da dengue aumentou 30 vezes, estimando-se que 390 milhões de infecções ocorram por ano (“WHO | Dengue”, 2018). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, até dezembro de 2022 os casos de dengue aumentaram em 160,4% no País em relação a 2021, atingindo uma taxa de 667,4 casos/100 mil habitantes e atingindo um recorde de 1.016 óbitos no ano de 2022, porém vale ressaltar que durante a pandemia de COVID-19 houve uma redução na notificação dos casos de dengue no Brasil (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Com todo esse aumento, muitos esforços têm sido feitos, não só no combate ao vetor transmissor, como também no desenvolvimento de vacinas para prevenção e de medicamentos para terapia. O maior desafio no desenvolvimento de uma vacina para dengue é garantir imunogenicidade para os quatro sorotipos, sem risco de aumento imunomediado da infecção (*Antibody-dependent enhancement of infection – ADE*) e consequente aumento nos casos graves, ou seja, é desenvolver uma vacina tetravalente que seja altamente eficiente e segura (DENG, *et al.* 2020, MARTINEZ, *et al.* 2021, WANG, *et al.* 2021).

O ADE é um fenômeno, já observado *in vitro* em modelos animais, que ocorre devido a mais de uma infecção heterotípica por DENV, ou seja, a presença de anticorpos provenientes de infecção anterior com vírus de um dado sorotipo, não são capazes de neutralizar o vírus do outro sorotipo (infecção heterotípica), mas não se ligam aos receptores das células e assim facilitam a entrada do vírus nessas células, podendo levar a um maior número de células infectadas e a um aumento na produção intracelular do vírus, consequentemente gerando uma maior carga viral no organismo do indivíduo (DENG, *et al.* 2020, MARTINEZ, *et al.* 2021, WANG, *et al.* 2021).

O produto DENGVAXIA® (Sanofi Pasteur) foi a primeira vacina contra a dengue desenvolvida a ser licenciada para uso humano, tendo obtido registro até o momento em 19 países. Seu uso foi recomendado pelo SAGE (Grupo de Especialistas de Aconselhamento Estratégico da OMS) em países com alto índice endêmico. É uma vacina tetravalente de vírus quiméricos vivos atenuados, que apresenta eficácia vacinal de 66% após três doses com intervalos de 6 meses. Durante os ensaios clínicos que a vacina tem uma menor eficácia em indivíduos soronegativos, ou seja, pessoas que

nunca foram infectadas com nenhum sorotipo do DENV apresentam menor resposta imune comparado aos indivíduos soropositivos. Além disso, houve um aumento nos casos de dengue grave em crianças menores de 9 anos, em comparação com crianças não vacinadas, razão pela qual o registro da vacina só contempla indivíduos maiores de 9 anos (AGUIAR, STOLLENWERK, 2018, AGUIAR, *et al.* 2016, SCHERWITZL, *et al.* 2017, TORRESI, *et al.* 2017, “WHO | Revised SAGE recommendation on use of dengue vaccine”, 2018). A segunda vacina licenciada para uso humano é a vacina QDenga® (Takeda Pharma), até o momento obteve o registro em países da união européia, Reino Unido, Indonésia e Brasil, sendo recomendado o uso em países com alto índice endêmico. A QDenga é uma vacina tetravalente de vírus quiméricos vivos atenuados, possui uma cobertura vacinal de 61% contra casos sintomáticos de dengue após duas doses com intervalos de 3 meses. É indicada para prevenção de dengue causada em indivíduos de 4 a 60 anos independente da exposição anterior ao vírus (BISWAL, *et al.* 2020, RIVERA, *et al.* 2022).

As partículas pseudo-virais (VLPs, do inglês *virus-like particles*) são estruturas tridimensionais compostas por proteínas estruturais virais, expressas em sistemas recombinantes, que se auto-organizam na forma de partículas. Elas mimetizam a organização e a conformação tridimensional dos vírus nativos e, quando usadas como vacinas, apresentam o antígeno em um arranjo repetitivo, porém sem possuírem o genoma viral. Estes fatores as tornam seguras e em geral capazes de induzir respostas imunes robustas (GRGACIC, ANDERSON, 2006, LUDWIG, WAGNER, 2007, NOAD, ROY, 2003).

Atualmente, as células de mamíferos são o sistema mais utilizado para produção de proteínas recombinantes utilizadas na área da saúde humana, representando de 60% a 70% de todos os produtos biofarmacêuticos comercializados. Dentre as linhagens existentes, a de ovário de hamster chinês (CHO), mieloma de camundongo (NS0), rim de hamster neonato (BHK) e rim de embrião humano (HEK-293) são as mais utilizadas para produção dessas proteínas recombinantes (FUENMAYOR, *et al.* 2018, WURM, 2004).

Para a produção de uma proteína recombinante de uso biofarmacêutico, um processo muito bem estabelecido e validado deve ser desenvolvido. Para isso, etapas como a definição da sequência genética recombinante, bem como a transferência desses genes para as células, a obtenção de linhagens recombinantes preferencialmente estáveis e clonalmente derivadas, o estabelecimento do processo de cultivo celular (*upstream processing*), o desenvolvimento do processo de purificação

(*downstream processing*), o desenvolvimento e validação analítica para caracterização do produto, a realização de estudos de estabilidade e a condução de ensaios não-clínicos e clínicos, devem ser cuidadosamente planejadas e executadas (MAO, CHAO, 2019).

## 2. Revisão da literatura

### 2.1. Dengue

#### 2.1.1. Epidemiologia

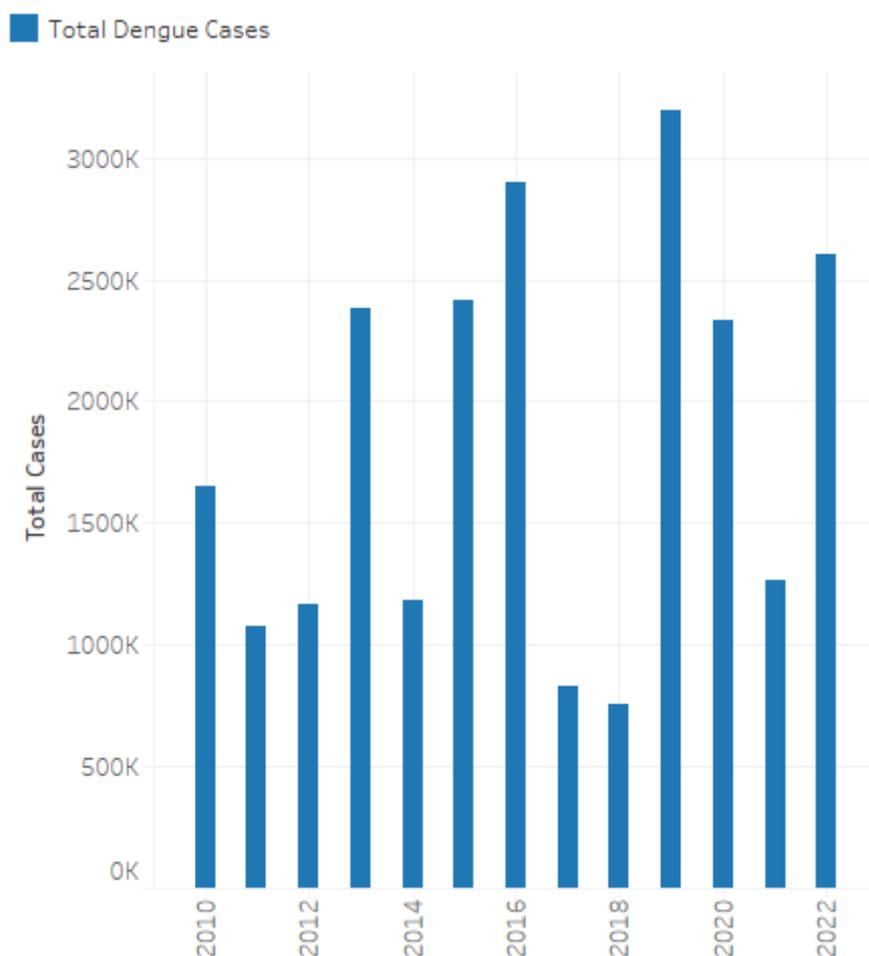
As infecções causadas pelos quatro sorotipos do vírus da dengue vêm crescendo devido à capacidade de adaptação dos mosquitos e ao aumento da circulação do vírus desde a década de 1980 (BARRETO, TEIXEIRA, 2008).

Uma enciclopédia chinesa datada de 610 DC descreve eventos clínicos que são compatíveis com a dengue, embora o período exato do acontecimento não seja conhecido. De 1779 a 1780 são descritas as primeiras epidemias de uma doença semelhante à dengue em Batavia (Jacarta), Cairo e Filadélfia. As epidemias atingiram as Américas, África, Ásia, Europa e Austrália em intervalos irregulares entre 1823 e 1945 (HENCHAL, PUTNAK, 1990, KAUTNER, *et al.* 1997, MAIRUHU, *et al.* 2004, RIGAU-PÉREZ, *et al.* 1998, TEIXEIRA, *et al.* 1999). O isolamento do vírus ocorreu na década de 1940, quando pesquisadores observaram que existiam características antigênicas distintas e foram denominados então de sorotipos 1 e 2.

Durante a Segunda Guerra Mundial, houve um aumento na circulação dos mosquitos, uma vez que eles foram transportados nos navios dos países tropicais para outros países. Essa introdução dos mosquitos levou à co-circulação de vários sorotipos e conseqüentemente ao aumento da atividade epidêmica. Em 1953 nas Filipinas, ocorreu a primeira epidemia relatada de dengue hemorrágica, que persistiu no sudeste asiático até os anos 70, quando então foram isolados os sorotipos 3 e 4. No entanto, a epidemia se espalhou para o sul da Ásia e leste da China nos anos de 80 e 90 (KAUTNER, *et al.* 1997, MAIRUHU, *et al.* 2004, RIGAU-PÉREZ, *et al.* 1998, TEIXEIRA, *et al.* 1999).

Nas Américas, a primeira epidemia de febre da dengue foi registrada em 1977 e de febre hemorrágica da dengue em 1981, ambas em Cuba. Outras duas grandes epidemias ocorreram na Venezuela (1989) e novamente em Cuba (1997) (MALAVIGE, *et al.* 2004). Em 1998, 17 países das Américas já haviam registrados casos de dengue, porém não havia registros de casos graves de dengue (BARRETO, TEIXEIRA, 2008, TEIXEIRA, *et al.* 1999).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no final de 2022 haviam sido relatados nas Américas aproximadamente 2,6 milhões de casos de dengue, sendo aproximadamente 4.300 casos graves e 2000 mortes (“PAHO/WHO | Description of the current epidemiological trends of dengue in the Americas”, [S.d.]). A Figura 1 apresenta o número total de casos da dengue reportado nas Américas até 2022.



**FIGURA 1.** Número total de casos de dengue reportado nas Américas nos últimos 13 anos. Adaptado de (“PAHO/WHO Data - Boletim Anual Arbovirose 2022”).

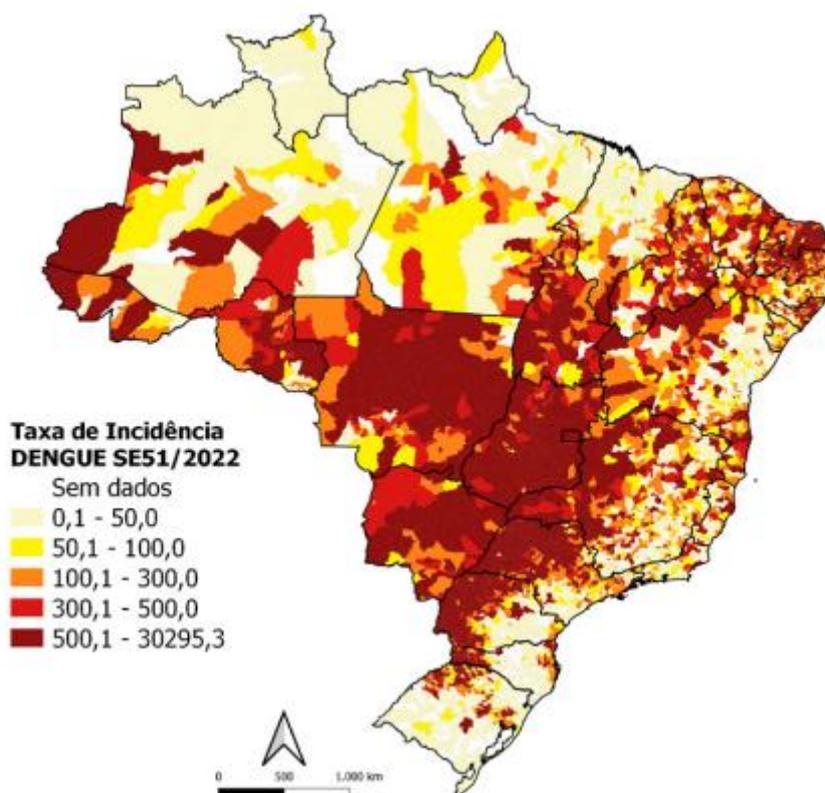
No Brasil, em 1982 foram isolados os sorotipos 1 e 4 em Roraima, sendo comprovadamente a primeira epidemia registrada no Brasil (BARRETO, TEIXEIRA, 2008, TEIXEIRA, *et al.* 1999).

A disseminação da dengue no Brasil ocorreu em 1987 com epidemias no Rio de Janeiro, Alagoas, Ceará, Pernambuco e pequenos surtos em São Paulo, Minas Gerais e Bahia (BARRETO, TEIXEIRA, 2008, TEIXEIRA, *et al.* 1999).

Nos anos 90, surgem os primeiros casos de dengue hemorrágica e ocorre um aumento na circulação viral, causando uma epidemia gravíssima em 1994 no Ceará (BARRETO, TEIXEIRA, 2008, TEIXEIRA, *et al.* 1999).

Em 2002, ocorreu uma grande epidemia e confirma-se a presença do sorotipo 3 no Brasil. Segundo BARRETO, TEIXEIRA (2008), a partir de 2005 era esperado um aumento vertiginoso nos casos de dengue e, em 2008, chegou-se a mais de 700 mil casos registrados pelo Ministério da Saúde.

O Brasil passou anos apresentando epidemias apenas nos grandes centros urbanos e em alguns estados (Figura 2), porém atualmente a doença é bem disseminada em todas as regiões. Segundo o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde de Dezembro de 2022, as regiões Centro-Oeste e Sul apresentaram em 2022 o maior número de casos prováveis, seguida das regiões Sudeste, Nordeste e Norte, respectivamente (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

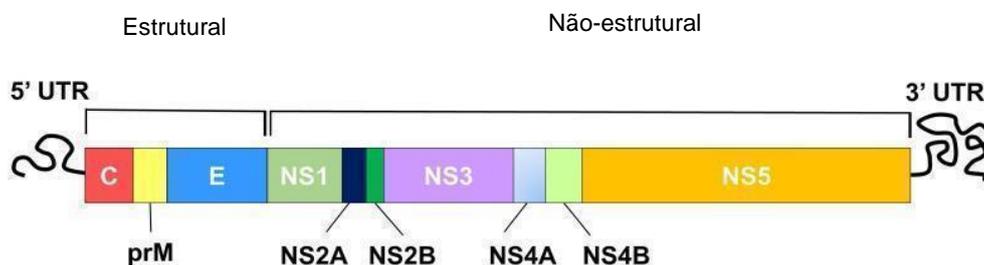


**FIGURA 2.** Distribuição da taxa de incidência de dengue, por município, no Brasil. Semanas epidemiológicas de 1-51 - Adaptada de (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Segundo o estudo de BRADY, *et al.* (2012), a dengue está presente em 128 países, deixando 3,97 bilhões de pessoas em risco de infecção. Desses países, 46 registram casos de dengue anualmente, sendo o maior número de notificações na Ásia e nas Américas.

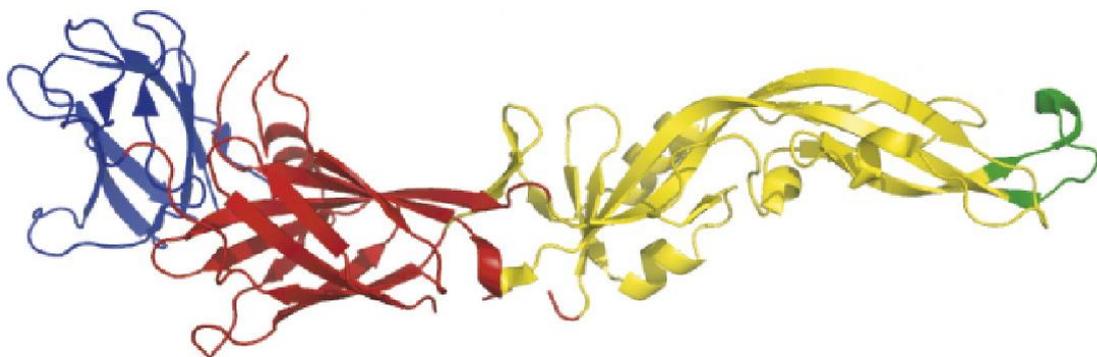
### 2.1.2. O vírus

O vírus da dengue (DENV) é pertencente ao gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*, que também inclui os vírus da zika, febre amarela, encefalite japonesa, febre do Nilo Ocidental, encefalite de Saint Louis, entre outros. É um vírus envelopado icosaédrico, com aproximadamente 50 nm de diâmetro, cujo genoma é composto por uma molécula de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples com polaridade positiva e um único quadro de leitura aberto (ORF), que codifica três proteínas estruturais (capsídeo, pré-membrana, membrana e envelope) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), como esquematizado na Figura 3 (ADIKARI, *et al.* 2016, UNO, ROSS, 2018, WONG, *et al.* 2012, ZHANG, *et al.* 2017). Existem quatro sorotipos (DENV 1-4) antigenicamente distintos do vírus que se diferenciam em 25-40% no nível de aminoácidos do envelope viral e são clinicamente indistinguíveis, isto é, apresentam sintomas clínicos indistinguíveis, mas geram anticorpos neutralizantes específicos para cada sorotipo devido às diferenças na sequência de aminoácidos (LIU, *et al.* 2014, RAMASAMY, *et al.* 2018b).



**FIGURA 3.** Esquema do genoma do vírus da dengue. As proteínas estruturais são a proteína do capsídeo (C), a proteína pré-membrana (prM) e a proteína do envelope (E). Adaptada de CHEW, *et al.* (2017).

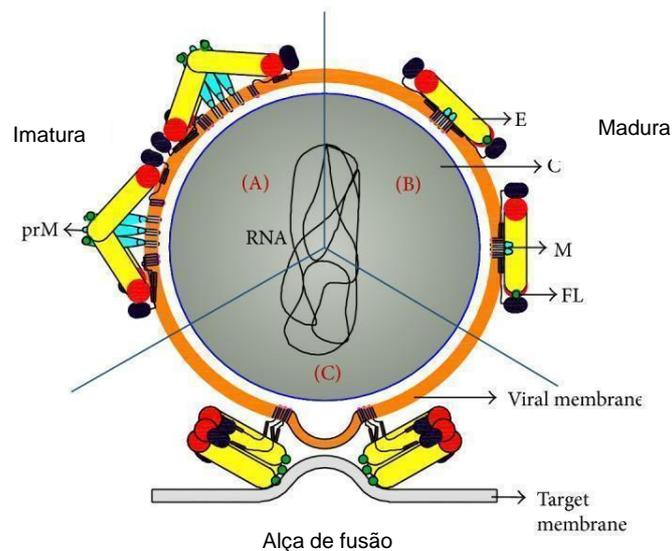
Das proteínas estruturais, a glicoproteína do envelope (E) (Figura 4) está localizada na superfície do vírus e é organizada em três domínios (EDI, EDII, EDIII). Tem como propriedades principais a ligação e fusão do vírus ao receptor da membrana celular, bem como a entrada nas células do hospedeiro, sendo também o principal alvo do sistema imunológico, gerando anticorpos que podem ser neutralizantes e protetores (DE LA GUARDIA, LLEONART, 2014, FAHIMI, *et al.* 2018, UNO, ROSS, 2018, ZHANG, *et al.* 2017). Segundo a literatura, cada domínio possui uma função: o EDI está localizado na porção N-terminal da proteína E, possui sítios de glicosilação e é responsável pelas mudanças conformacionais e estabilização da proteína E, podendo gerar anticorpos não neutralizantes. O EDII é responsável pela fusão do vírus com as células através da ligação aos receptores celulares e interage com a proteína pré-membrana (prM) bloqueando o *loop* de fusão. O EDIII está localizado na porção C terminal da proteína E, possui os principais sítios de ligação ao receptor da célula-alvo, auxiliando na entrada do vírus nas células, além de possuir epítomos específicos para cada sorotipo, que podem levar à geração de anticorpos Anti-EDIII neutralizantes que geram memória imunológica e são específicos para cada sorotipo do vírus da dengue. Os anticorpos voltados para os domínios I e II são em geral responsáveis pela reatividade cruzada, uma vez que apresentam fraca neutralização e reconhecem diversos flavivírus, pois esta região é altamente conservada nessa família (FAHIMI, *et al.* 2018, ZHANG, *et al.* 2017, ZHANG, *et al.* 2003, ZHANG, *et al.* 2004).



**FIGURA 4.** Estrutura da proteína do envelope (E) da dengue. Os três domínios da proteína E são mostrados: domínio I, vermelho; domínio II, amarelo; domínio III, azul. Adaptada de PERERA, KUHN, (2008).

A proteína prM encontra-se presente nos vírus imaturos e é responsável pela proteção do *loop* de fusão da proteína E, evitando que a proteína E sofra mudanças conformacionais com a mudança de pH que alterem suas propriedades antigênicas. Quando clivada pela protease furina do hospedeiro, se transforma em proteína M, fazendo com que os epítomos da proteína E fiquem expostos, com isso o vírus passa a ser maduro e ter capacidade de infecção e replicação (DE LA GUARDIA, LLEONART, 2014, KROL, *et al.* 2019, UNO, ROSS, 2018, ZHANG, *et al.* 2003).

A proteína C (nucleocapsídeo) tem como papel principal a estabilização e proteção do RNA viral (DE LA GUARDIA, LLEONART, 2014, KROL, *et al.* 2019, UNO, ROSS, 2018, ZHANG, *et al.* 2017). A organização estrutural do vírus pode ser observada na Figura 5.



**FIGURA 5.** Organização da proteína E na superfície do vírus da dengue. (a) O vírus imaturo. (b) O vírus maduro. (c) Exposição da alça de fusão. E, C, M, FL e prM denotam envelope, capsídeo, membrana, *loop* de fusão e pré-membrana, respectivamente. Adaptada de KHETARPAL, KHANNA, (2016).

As proteínas não-estruturais estão relacionadas às atividades de replicação e montagem viral, indução de apoptose nas células infectadas, e auxílio na fuga do vírus do sistema imunológico do hospedeiro bloqueando a transdução de sinal induzida por interferon  $\alpha$  e  $\beta$  (DE LA GUARDIA, LLEONART, 2014, KHETARPAL, KHANNA, 2016, UNO, ROSS, 2018).

### 2.1.3. A doença

A dengue é uma doença viral transmitida aos humanos por mosquitos fêmeas do gênero *Aedes*, espécies *aegypti*, *albopictus* e *polynesiensi*, ou através de transfusão sanguínea, transplante de órgãos, secreções mucosas e materiais perfuro-cortantes (por exemplo, agulhas). Não existem relatos de transmissão sexual, porém estudos demonstraram que o vírus permanece na secreção vaginal por até 18 dias após o início dos sintomas, e para mulheres grávidas virêmicas no parto, pode ocorrer uma transmissão vertical e posteriormente via amamentação (RIGAU-PÉREZ, *et al.* 1998, UNO, ROSS, 2018, WILDER-SMITH, *et al.* 2019).

A infecção por esse vírus leva ao desenvolvimento de quadros clínicos bem descritos que se diferenciam através da intensidade dos sintomas, sendo classificados como febre da dengue (FD), febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome do choque da dengue potencialmente fatal (SCD), com tempo de incubação de 4 a 7 dias, podendo chegar a 14 dias (BHATT, *et al.* 2013, KHETARPAL, KHANNA, 2016, LIU, *et al.* 2014, METZ, *et al.* 2018, RAMASAMY, *et al.* 2018b, RIGAU-PÉREZ, *et al.* 1998, UNO, ROSS, 2018).

A FD é uma doença febril que varia de acordo com a idade do paciente e tem como principais sintomas cefaleia frontal intensa, náusea, vômito, dor retro-ocular, dores musculares e nas articulações, hemorragia gengival e manchas avermelhadas na pele (petéquias), podendo em alguns casos ser assintomática. Os sintomas podem durar de 5 a 7 dias, e o vírus desaparece do sangue com o desaparecimento da febre (KHETARPAL, KHANNA, 2016, MAIRUHU, *et al.* 2004, MALAVIGE, *et al.* 2004, RIGAU-PÉREZ, *et al.* 1998).

A FHD é uma doença febril aguda que geralmente ocorre em indivíduos adultos e crianças que foram infectadas pela segunda ou mais vezes, porém pode ocorrer em bebês em uma infecção primária. Apresenta sintomas mais graves que FD, como manifestações hemorrágicas (gengival, vaginal, gastrointestinal etc.), febre alta, taquicardia, hipotensão, insuficiência circulatória e aumento na permeabilidade vascular resultando no extravasamento de plasma. O desenvolvimento da FHD ocorre devido a um aumento repentino da temperatura entre 3 a 7 dias após o aparecimento dos sintomas de FD e de uma queda repentina da temperatura para níveis normais, com uma diminuição progressiva da contagem de plaquetas e aumento de hematócritos, resultando no extravasamento de plasma da cavidade vascular. O tratamento inadequado gera um choque profundo que pode levar os pacientes a óbito devido ao

aparecimento de outros sintomas graves (KHETARPAL, KHANNA, 2016, MAIRUHU, *et al.* 2004, MALAVIGE, *et al.* 2004, RIGAU-PÉREZ, *et al.* 1998).

A SCD ocorre devido ao tratamento inadequado do extravasamento de plasma, o qual, em situações críticas, leva ao desenvolvimento de sintomas gravíssimos, deixando o paciente em choque e podendo levar a óbito entre 12 e 24 h após o choque. Os sintomas de SCD são insuficiência circulatória, pulso rápido e fraco, pele fria, inquietação, hipotensão súbita, dor abdominal aguda e vômito persistente (KHETARPAL, KHANNA, 2016, MAIRUHU, *et al.* 2004, MALAVIGE, *et al.* 2004, RIGAU-PÉREZ, *et al.* 1998).

Algumas complicações são observadas em pacientes que desenvolvem os casos graves, por exemplo, insuficiência hepática, insuficiência renal aguda, edema cerebral, encefalite, encefalopatias, cardiomiopatia, miocardite e, em casos mais raros, a síndrome hemolítico-urêmica (MAIRUHU, *et al.* 2004, MALAVIGE, *et al.* 2004).

A FHD e a SCD são associadas ao fenômeno denominado de aumento imunomediado da infecção, ADE, onde, em uma infecção secundária com um sorotipo diferente do anterior, os anticorpos não neutralizantes da infecção primária se ligam ao vírus do novo sorotipo e formam complexos vírus-anticorpos. Esses complexos são mais facilmente fagocitados pelas células, resultando em um aumento da replicação viral no organismo e conseqüentemente em um aumento da patologia que leva aos casos graves. Segundo a literatura, a ADE é dependente do receptor da porção Fc dos anticorpos (FcR), e os complexos vírus-anticorpo formados se ligam às células que possuem FcR na sua superfície, facilitando e aumentando a infecção viral (DENG, *et al.* 2020, KHETARPAL, KHANNA, 2016, LIU, *et al.* 2014, MARTINEZ, *et al.* 2021, TAKADA, KAWAOKA, 2003, WANG, *et al.* 2021).

## **2.2. Vacinas**

O desenvolvimento e a popularização de vacinas em escala mundial, ocorrido em especial no último século, é considerado um grande avanço para o controle e erradicação de doenças infecciosas, melhorando drasticamente a saúde humana. Segundo a OMS aproximadamente 1,5 milhões de pessoas perdem a vida por doenças evitáveis por vacina a cada ano e a imunização salva de 4 a 5 milhões de vidas anualmente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

As primeiras vacinas desenvolvidas utilizavam vírus vivos atenuados ou vírus inativados, sendo que o princípio da vacinologia remete às descobertas de Jenner no final do século XVIII e novas técnicas estão constantemente sendo desenvolvidas para que vacinas mais seguras e eficazes sejam produzidas (PITOISET, *et al.* 2015, SUSAN L. PLOTKIN, STANLEY A. PLOTKIN, 2018).

As primeiras imunizações contra vírus ocorreram na Inglaterra em 1721 com a introdução da técnica que ficou conhecida como variolização. Desde então, diversos estudos foram desenvolvidos proporcionando o desenvolvimento das tecnologias hoje utilizadas. Em 1986, ocorreu o licenciamento da primeira vacina recombinante, que foi produzida em leveduras, contra a hepatite B (SUSAN L. PLOTKIN, STANLEY A. PLOTKIN, 2018).

As vacinas são responsáveis pela ativação das imunidades inata e adaptativa, possuindo a capacidade de geração de memória imunológica. Existem vários tipos de vacinas para doenças virais, sendo os principais a vacina de vírus inativado, vírus vivo atenuado, DNA, subunidades, mRNA e de partículas pseudo-virais, conforme será discutido abaixo.

Os processos de fabricação de vacinas são complexos, com altos custos associados ao desenvolvimento, produção e fornecimento. Exigem alta segurança, eficácia e reprodutibilidade, não podendo haver mudanças que levem a alterações no produto final. Em caso de alguma mudança no processo, novos testes são requisitados pelas agências regulatórias para confirmar que a vacina é comparável à produzida pelo processo original (HAYMAN, *et al.* 2022, STANLEY A. PLOTKIN, *et al.* 2017).

A etapa inicial de um processo de fabricação é a obtenção de uma linhagem celular e/ou de um vírus semente e a confecção de um banco mestre com células ou vírus suficientes para toda a produção futura. confecção de um banco mestre com células suficientes para toda a produção futura. A partir desse banco mestre, obtém-se os bancos de trabalho, cujas alíquotas são utilizadas como partida para cada lote de fabricação (GOMEZ, ROBINSON, 2018, PLOTKIN, *et al.* 2017, PUJAR, LUNDGREN, 2018). Todo material biológico utilizado deve ser devidamente caracterizado quanto a segurança, estabilidade genética, tumorigenicidade e viabilidade, para comprovar que não apresentam risco para o indivíduo (ROBINSON, 2016).

A formulação da vacina é projetada para maximizar a sua estabilidade, garantir a distribuição eficiente do produto no corpo e garantir que a potência no final da vida de prateleira permanece acima da dose efetiva demonstrada em ensaios clínicos em

humanos (AUNIŇŠ, 2010, GARÇON, FRIEDE, 2018). O controle de qualidade nesta etapa geralmente consiste em avaliar potência, pureza, esterilidade, e outros ensaios específicos para o produto. Após formulada, a vacina é envasada em um recipiente apropriado, que pode variar de acordo com o tipo de formulação, passa pelos testes de controle de qualidade e é distribuída para comercialização (GOMEZ, ROBINSON, 2018). Todos os componentes usados na fabricação da vacina estão sujeitos a um controle rigoroso de qualidade, sendo feitos testes de composição para provar que os materiais utilizados são adequados e não alteram o produto durante o processamento (ROBINSON, 2016).

A via de administração pode afetar a segurança, imunogenicidade e eficácia de uma vacina. Por isso, testes não-clínicos são realizados em animais para avaliação do método que apresente maior eficácia e diminua o risco de reações adversas, como, por exemplo, irritação local, inflamação e formação de granulomas. Contudo, a via de administração é dependente do tipo de vacina e da proteção necessária, levando em consideração a via de infecção e transmissão (AUSTRALIAN GOVERNMENT DEPARTMENT OF HEALTH, [S.d.], STANLEY A. PLOTKIN, 2001, ZHANG, *et al.* 2015).

As vias convencionais de vacinação incluem a via parenteral, que inclui inoculação intramuscular, intradérmica e subcutânea (AUSTRALIAN GOVERNMENT DEPARTMENT OF HEALTH, [S.d.], ZHANG, *et al.* 2015).

As vacinas de vírus inativados são vacinas que contêm o vírus inativado por agentes químicos ou físicos, ou seja, são manipulados para impedir a replicação viral, porém evitando alterar sua constituição antigênica, que é determinante na qualidade dos anticorpos gerados. Tem como principais vantagens a segurança, pois não há a possibilidade de reversão da atenuação, não são transmitidos a indivíduos não imunizados uma vez que os vírus não estão se multiplicando, podem ser usados em indivíduos imunocomprometidos e geram resposta imune estável e duradoura. Contudo, requerem várias doses, uma vez que não ocorre multiplicação do agente vacinal no organismo, são altamente reatogênicos (BAXTER, 2007).

Já as vacinas de vírus vivos atenuados são vacinas tradicionalmente obtidas por passagens sucessivas do vírus vacinal em animais ou culturas celulares, para proporcionar mutações no vírus, diminuindo assim seu poder infeccioso. Atualmente, mutações podem também ser inseridas de forma planejada por técnicas de manipulação genética. Nesse tipo de vacina, o vírus encontra-se vivo, porém com poder infeccioso

baixo. São capazes de gerar respostas imunes de longa duração, apresentam padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) e capacidade do patógeno se multiplicar no hospedeiro por tempo limitado, necessitando de uma menor quantidade de antígeno por dose. Entretanto, pode haver reversão da atenuação e não é feita a administração em pessoas imunocomprometidas (BAXTER, 2007, ROITT, *et al.* 2013).

Nas vacinas de DNA, utiliza-se um vetor que contenha o gene do patógeno, responsável pela codificação de proteína do patógeno que representa antígeno importante para a imunização. Como vantagens, apresentam maior estabilidade térmica, química e biológica, e as proteínas expressas são sintetizadas *in vivo*, sendo mais propensas a ter a conformação nativa. Entretanto, têm como desvantagens o fato de requererem em geral doses muito altas, apresentarem risco potencial de mutagênese insercional e serem contraindicadas para indivíduos imunocomprometidos (BAXTER, 2007, DINIZ, FERREIRA, 2010).

Assim como as vacinas de DNA, existem também as vacinas de mRNA. Para a produção destas vacinas, utiliza-se um vetor molde (DNA plasmídeo) que codifica o antígeno de interesse e realiza-se uma transcrição *in vitro*, obtendo então o mRNA desejado. A vantagem desse tipo de tecnologia é que não há risco de mutagênese insercional, tem propriedades autoadjuvantes, e a resposta imunológica é potente. Além disso, o mRNA é uma plataforma de entrega facilmente degradado pelas vias metabólicas do hospedeiro sem causar efeitos colaterais. Entretanto, tem como desvantagens a instabilidade do mRNA e a necessidade de um sistema de entrega eficaz como as nanopartículas lipídicas (SCHLAKE, *et al.* 2012, WANG, Yang, *et al.* 2021, XU, *et al.* 2020).

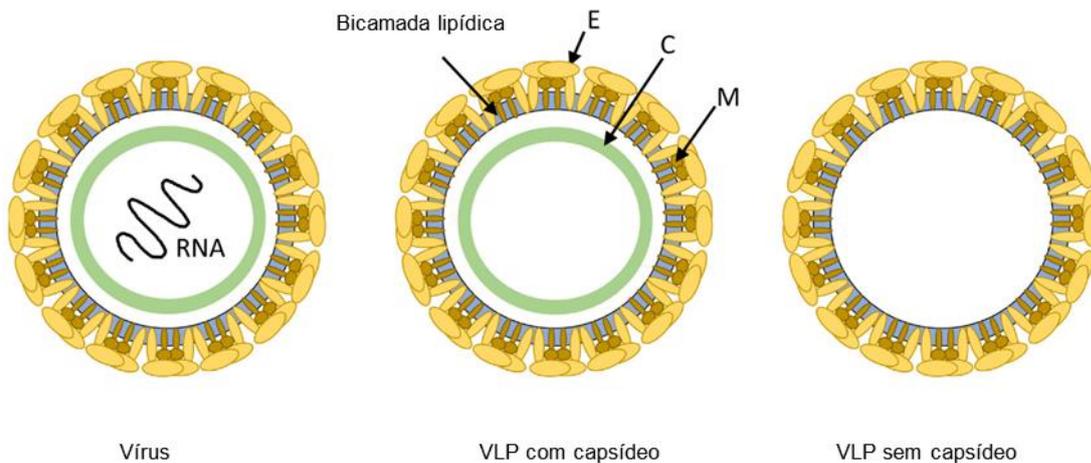
As vacinas de subunidades são vacinas que utilizam fragmentos do patógeno que estimulam o sistema imunológico sem risco de patogenicidade e evitam a produção de anticorpos das frações que não estão relacionadas com a resposta imune do hospedeiro, prevenindo problemas por inibição, hipersensibilidade ou exacerbação da infecção. Podem ser compostas por peptídeos, proteínas ou polissacarídeos que contenham os epítomos geradores de resposta imune (BAXTER, 2007, HANSSON, *et al.* 2000, HOU, *et al.* 2023). Tem como principais vantagens a segurança, pois são apenas fragmentos bem conhecidos dos vírus, sem capacidade de replicação, causam menos efeitos colaterais e podem ser administradas em indivíduos imunocomprometidos (BAXTER, 2007, HANSSON, *et al.* 2000, HOU, *et al.* 2023).

Por outro lado, as vacinas de subunidades têm algumas desvantagens, pois requerem várias doses, uma vez que geram efeitos imunológicos de menor intensidade, requerem o uso de adjuvantes para melhorar a resposta no organismo (BAXTER, 2007, HANSSON, *et al.* 2000, HOU, *et al.* 2023).

As vacinas baseadas em partículas pseudo-virais (VLPs, do inglês *virus like-particles*), são um tipo promissor de vacinas de subunidade, sendo que para algumas doenças já há vacinas em comercialização em todo o mundo, como, por exemplo, CERVARIX® (papilomavírus humano, GSK), e Gardasil® (papilomavírus humano, Merck e Co.) (PITOISET, *et al.* 2015, ROLDÃO, *et al.* 2010).

As VLPs (Figura 6) são nanoestruturas tridimensionais compostas por proteínas estruturais virais que têm a capacidade de se auto-montar quando estas proteínas virais são expressas na forma recombinantes. Elas mimetizam a organização e a conformação do vírus nativo do qual foram derivadas e apresentam as proteínas antigênicas em um arranjo altamente repetitivo, apresentando, portanto, alto potencial imunogênico. Além disso, elas permitem modificações na cadeia de aminoácidos e conjugações com outras moléculas, podendo ser manipuladas para aumentar a eficiência da entrega em um alvo específico (FUENMAYOR, J., *et al.* 2017, GRGACIC, ANDERSON, 2006, LUDWIG, WAGNER, 2007, NOAD, ROY, 2003, SAHA, *et al.* 2020).

Apesar de mimetizarem a estrutura do vírus nativo, não possuem o genoma viral. Logo, são incapazes de se replicar, de sofrer reversão da atenuação e de infectar o hospedeiro, o que as torna uma alternativa muito segura. Contudo, o uso de adjuvantes pode ser necessário para obter alto efeito protetor e duradouro os quais, elevam o custo de produção da vacina (FUENMAYOR, J., *et al.* 2017, GRGACIC, ANDERSON, 2006, LUDWIG, WAGNER, 2007, NOAD, ROY, 2003, SAHA, *et al.* 2020). A geometria e o tamanho (20-100 nm) das VLPs, correspondente aos respectivos vírus, contribuem para a drenagem rápida para os linfonodos e a captação por células apresentadoras de antígenos, bem como a ativação dos sistemas imune inato e adaptativo, gerando respostas imunes potentes e de longa duração (plasmócitos). Portanto, a montagem das VLPs na geometria e tamanho corretos é o ponto crítico para a utilização dessas partículas em vacinas (BRUNE, *et al.* 2016, FRIETZE, *et al.* 2016, LUDWIG, WAGNER, 2007, SAHA, *et al.* 2020). Devido à sua versatilidade, as VLPs já foram produzidas para mais de 30 diferentes vírus, desde os que possuem somente a proteína do capsídeo até os envelopados e não envelopados (NOAD, ROY, 2003).



**FIGURA 6.** Diagramas esquemáticos de flavivírus: vírus infecciosos (virions), VLP contendo capsídeo e VLP sem capsídeo, todos na conformação madura do vírus. O RNA de sentido positivo encontrado nos virions é mostrado em preto. A proteína do capsídeo (C) está representada em verde, a proteína do envelope (E) em laranja, a proteína da membrana (M) em marrom e a bicamada lipídica da membrana em azul. Adaptada de CASTILHO, *et al.* (2022).

O sistema de expressão utilizado para a produção de VLPs deve ser escolhido levando-se em consideração o correto enovelamento e montagem das proteínas, bem como as modificações pós-tradução apropriadas (ARORA, *et al.* 2013, ROLDÃO, *et al.* 2011, SAHA, *et al.* 2020, SHANG, *et al.* 2012). Um dos sistemas existentes, é baseado em leveduras, apresentando baixo custo de produção e facilidade de escalonamento de processos. No entanto, nesse sistema o padrão de glicosilação é do tipo alta manose, e o dobramento e montagem das VLPs podem não ocorrer de maneira correta (FUENMAYOR, *et al.* 2017, GRGACIC, ANDERSON, 2006, ROLDÃO, *et al.* 2011).

O sistema baculovírus-células de inseto também é bastante utilizado por apresentar alta produtividade, facilidade de escalonamento e minimização do risco de contaminação por outros patógenos (por exemplo, vírus que causem doença em humanos), porém a glicosilação também é do tipo alta manose e os contaminantes derivados da célula hospedeira apresentam-se em alta concentração, uma vez que o produto é intracelular, tornando difícil a sua remoção (FUENMAYOR, *et al.* 2017, NOAD, ROY, 2003, ROLDÃO, *et al.* 2011).

O sistema que utiliza bactérias (*E. coli*) permite uma fácil expressão de proteínas simples, apresenta baixo custo e facilidade de escalonamento. No entanto, as bactérias em geral não realizam modificações pós-tradução, as proteínas recombinantes em geral permanecem intracelularmente, dificultando a purificação, e as endotoxinas bacterianas podem ser um problema (FUENMAYOR, *et al.* 2017, GRGACIC, ANDERSON, 2006, NOAD, ROY, 2003).

As células de mamíferos constituem o sistema de expressão mais comum para VLPs de todos os tipos, inclusive as envelopadas e que requerem modificações pós-tradução mais complexas, pois apresentam montagem e dobramentos autênticos (FUENMAYOR, *et al.* 2017, GRGACIC, ANDERSON, 2006, SAHA, *et al.* 2020).

A resposta imunológica gerada pelas VLPs é dependente do tipo de partícula que se está produzindo. Elas podem conter todas as proteínas de um dado vírus ou apenas parte delas. Elas ainda podem ser quiméricas, ou seja, conter proteínas oriundas de mais de um vírus ou sorotipos diferentes do mesmo vírus. Essa composição estrutural das VLPs é determinante do tipo de resposta imune que será gerada (FUENMAYOR, *et al.* 2017).

### **2.2.1. Vacinas para dengue em desenvolvimento**

A dengue tem se espalhado progressivamente no mundo inteiro, tornando-se uma das doenças globalmente mais importante em transmissão, e isso tem gerado esforços intensivos em pesquisas para a descoberta de novas drogas e vacinas que sejam eficazes e seguras no combate à doença (DENG, YANG, *et al.* 2020, LIM, 2019).

Em 2015, a primeira vacina para dengue foi licenciada em diversos países da Ásia e América Latina, a DENG VAXIA® (Sanofi Pasteur). É uma vacina tetravalente, de vírus vivo atenuado recombinante, o qual possui o *backbone* do vírus da febre amarela 17D e os genes de prM/E dos quatro sorotipos da dengue. Foi licenciada para indivíduos com idade entre 9 e 45 anos e a administração é de 3 doses em intervalos de 6 meses (SWAMINATHAN, KHANNA, 2019, WICHMANN, *et al.* 2017). A segunda vacina licenciada para uso é a QDenga (Takeda Pharma), atualmente está licenciada na União Europeia, Reino Unido, Indonésia e Brasil. É uma vacina tetravalente, de vírus vivo atenuado recombinante, e consiste em 1 cepa do vírus da dengue sorotipo 2 atenuado e 3 cepas recombinantes de vírus da dengue 2 atenuado que expressam os genes prM/E correspondentes aos sorotipos 1, 3 e 4 da dengue. A vacina foi licenciada para

uso em indivíduos de 4 a 60 anos, tanto soropositivos quanto soronegativos, e a administração é de 2 doses em um intervalo de 3 meses (BISWAL, *et al.* 2020, RIVERA, *et al.* 2022).

Essa vacina tem algumas desvantagens, como, por exemplo, não ser recomendada para indivíduos soronegativos, ter apenas 66% de eficácia após as três doses e não ter uma faixa etária de cobertura tão abrangente, deixando a parte da população mais vulnerável sem a possibilidade de vacinação (SWAMINATHAN, KHANNA, 2019, WICHMANN, *et al.* 2017). Por estas razões, no Brasil, embora aprovada pela Anvisa, não foi incorporada no calendário público de vacinação.

Um dos maiores obstáculos, para o desenvolvimento de vacinas para a dengue, além da ADE, é a compreensão dos mecanismos imunológicos e patogênicos do vírus, uma vez que tem-se como obstáculo a falta de um modelo animal verdadeiramente adequado e confiável para os estudos (JOHNSON, ROEHRIG, 1999, MORRISON, *et al.* 2017, RATHORE, *et al.* 2021, WILDER-SMITH, 2020).

Vários tipos de vacinas para dengue encontram-se em desenvolvimento, sendo que, no que diz respeito a vacinas baseadas em proteínas e vírus recombinantes, que é o foco deste trabalho, várias abordagens e sistemas de expressão vêm sendo investigadas e as vacinas candidatas resultantes têm sido testadas em ensaios não-clínicos em diferentes espécies animais (Tabela 1).

Por outro lado, várias vacinas baseadas em vírus vivos atenuados, vírus inativados, de subunidades e de DNA já conseguiram chegar a testes clínicos em humanos. A Tabela 2 apresenta os candidatos vacinais atualmente em avaliação clínica, conforme busca realizada na base de dados de ensaios clínicos mantida pelo governo norte-americano (clinicaltrials.gov).

**TABELA 1.** Candidatos vacinais para dengue que não atingiram as fases de ensaios clínicos.

<b>Tipo</b>	<b>Empresa/Instituto</b>	<b>Abordagem</b>	<b>Espécie animal usada no teste pré-clínico</b>	<b>Referência</b>
Viva atenuada quimérica	Universidade Chiang Mai, Universidade Mahidol, NSTDA, BioNet Asia	Sequência prM/E de DENV1 com background de DENV2 atenuado	Macaco Rhesus ( <i>Macaca mulatta</i> )	(KEELAPANG, <i>et al.</i> 2013)
Viva atenuada quimérica	Instituto de Microbiologia e Epidemiologia de Pequim, Instituto de Produtos Biológicos de Chengdu	Sequência prM/E de DENV2 com backbone de JEV	Macaco Rhesus ( <i>Macaca mulatta</i> )	(LI, <i>et al.</i> 2013)
Viva atenuada	Arbovax	Truncamento do domínio transmembranar I para selecionar os vírus que se replicam apenas em células de insetos	Macaco verde africano ( <i>genus Chlorocebus</i> )	(BRIGGS, <i>et al.</i> 2014)
Inativada	US NMRC	Vírus purificado inativado com psoraleno	Macaco-da-noite ( <i>Aotus nancymaae</i> )	(MAVES, <i>et al.</i> 2011)
Vacina de DNA	Universidade Chiang Mai, NSTDA	Sequência de consenso prM/E de cada sorotipo	Camundongos ICR e NHPs ( <i>Macaca fascicularis</i> )	(PROMPETCHARA, <i>et al.</i> 2014)

Tipo	Empresa/Instituto	Abordagem	Espécie animal usada no teste pré-clínico	Referência
VLP	NCR Biotech Science Cluster/Centro Internacional de Engenharia Genética e Biotecnologia, Índia e Universidade Emory.	VLPs quiméricas usando antígeno de superfície da hepatite B para exibir o domínio do envelope III de quatro sorotipos de DENV	Imonogenicidade: camundongos BALB/c e macaco Rhesus  Modelo de desafio: camundongos AG129	(RAMASAMY, <i>et al.</i> 2018a)
VLP	Universidade Chiang Mai, Universidade Mahidol, NSTDA, Tailândia	VLP-DENV2	Camundongos BALB/c e NHPs ( <i>Macaca fascicularis</i> )	(SUPHATRAKUL, <i>et al.</i> 2015)

**TABELA 2.** Candidatos a vacina para dengue em fase de ensaios clínicos.

<b>Candidato</b>	<b>Empresa</b>	<b>Tipo de vacina</b>	<b>Abordagem</b>	<b>Status*</b>	<b>Referência</b>
Dengvaxia®	Sanofi-Pasteur	Viva atenuada quimérica	<i>Backbone</i> de febre amarela (YF-17D) com prM/E dos vírus da dengue 1-4	Licenciada	(GUY, <i>et al.</i> 2017)
TetraVax-V/TV003/ TV005	US NIH	Viva atenuada	Vírus da dengue total 1-4 com deleção de 30 nt em 3'UTR	Fase III	(KALLAS, <i>et al.</i> 2020)
DENVax/ TAK003	Takeda/Inviragen/ US CDC	Viva atenuada	Backbone do vírus da dengue 2 com prM/E dos vírus 1, 3 e 4	Licenciada	(BISWAL, <i>et al.</i> 2020)
TDEN PIV	WRAIR/GSK	Inativada	Vírus da dengue 1-4 inativado por formalina	Fase I	(SCHMIDT, <i>et al.</i> 2017)
DEN-80E	MERCK	Subunidade recombinante	80% da proteína E expressa em células de insetos	Fase I	(COLLER, <i>et al.</i> 2011)

<b>Candidato</b>	<b>Empresa</b>	<b>Tipo de vacina</b>	<b>Abordagem</b>	<b>Status*</b>	<b>Referência</b>
D1ME100/TVDV	US NMRC	DNA	Plasmídeos expressando prM/E de dengue 1-4	Fase I	(DANKO, <i>et al.</i> 2018)
TDV	PBL	Viva atenuada	Vírus da dengue 1-4	Fase I/II	(MOHANTY, <i>et al.</i> 2022)

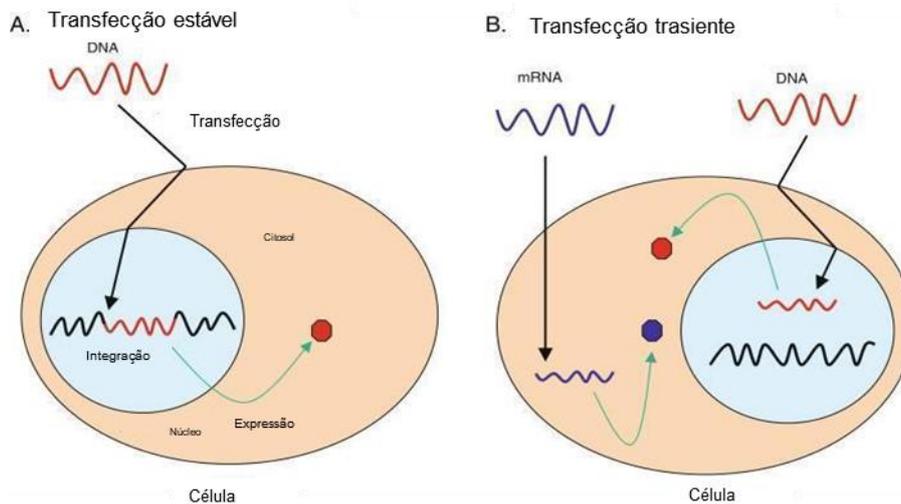
\* Consultado em: <https://clinicaltrials.gov> em janeiro/2023.

## 2.3. Cultivo de células animais

As proteínas recombinantes têm ganhado cada vez mais interesse para uso em medicamentos, em vacinas e em kits diagnósticos. O surgimento da técnica do DNA recombinante levou ao crescimento da indústria biofarmacêutica, pois possibilitou a produção de uma variedade de proteínas recombinantes e produtos nelas baseados, como as VLPs. Para os biofármacos já aprovados, diversos foram os sistemas de expressão são utilizados para fabricação, como, por exemplo, bactérias, leveduras, sistema baculovírus-células de insetos e células de mamíferos. Contudo, a crescente complexidade dos produtos, em especial quanto as modificações pós-tradução têm resultado em um progressivo aumento do uso de células de mamíferos como sistema de expressão (FUENMAYOR, *et al.* 2019, SCHMITZ, *et al.* 2019, ZHU, 2012).

Dentre as linhagens celulares existentes, as mais utilizadas em processos industriais para produção de produtos biofarmacêuticos são as células de ovário de hamster chinês (CHO), células de rim embrionário humano (HEK293), células de rim de embrião de hamster neonato (BHK-21) e células de mieloma murino (NS0) (LISTE-CALLEJA, *et al.* 2015, SCHMITZ, *et al.* 2019, ZHU, 2012). A linhagem HEK293 tem sido muito utilizada para produzir VLPs, apresentando relativa facilidade de cultivo em suspensão em meios quimicamente definidos sem a presença de componentes de origem animal (soro fetal bovino), altas densidades celulares, padrão de glicosilação humano e altos níveis de expressão (HENRY, DUROCHER, 2010, VINK, *et al.* 2014).

O uso de vetores de expressão é necessário para a produção de proteínas recombinantes. Esses vetores são transferidos para o interior das células por transfecção, a qual pode ser estável ou transiente (Figura 7). A transfecção estável é um processo de longa duração onde as células integram o DNA exógeno em seu genoma, transferindo a informação para células filhas e expressando a proteína de maneira uniforme por um tempo indeterminado. A expressão transiente é um processo rápido, onde as proteínas de interesse são expressas apenas por alguns dias, uma vez que o gene de interesse não é incorporado ao genoma das células e pode ser perdido, por exemplo, após a divisão celular (BÜSSOW, 2015, FUENMAYOR, *et al.* 2017, KIM, EBERWINE, 2010, LISTE-CALLEJA, *et al.* 2015, ZHU, 2012).



**FIGURA 7.** Esquema exemplificativo das transfecções estável e transiente. (a) Transfecção estável. O DNA exógeno (vermelho) é integrado ao genoma da célula (preto) e expresso de forma contínua. (b) Transfecção transiente. O DNA exógeno não se integra ao genoma. O mRNA exógeno (azul) é traduzido e entregue no citosol. Os círculos representam as proteínas expressas a partir do DNA exógeno. Adaptada de KIM, EBERWINE, (2010).

As metodologias de inserção de vetores contendo genes heterólogos são dependentes principalmente e do objetivo do uso da célula, mas sempre se busca alta eficiência de transfecção, baixa toxicidade à célula e mínimos distúrbios fisiológicos possíveis (CARSON, *et al.* 2019, KIM, EBERWINE, 2010).

Os métodos convencionais descritos na literatura podem ser de natureza biológica, química ou física. Os métodos biológicos são mediados por vírus, os métodos químicos utilizam lipídeos catiônicos, polímeros catiônicos ou sais inorgânicos, já os métodos físicos utilizam eletroporação ou irradiação a laser. Cada método apresenta suas vantagens e desvantagens, devendo ser escolhido com base no objetivo do trabalho (CARSON, *et al.* 2019, KIM, EBERWINE, 2010).

As células animais requerem meios de cultivo *in vitro* que mimetizem o conjunto de nutrientes disponíveis *in vivo*, de acordo com a origem da célula, para o seu crescimento e manutenção. Para os meios livres de soro animal a composição é basicamente de aminoácidos, vitaminas, fontes de carbono, sais inorgânicos, fatores de crescimento, agentes tamponantes, lipídeos, ácidos orgânicos, entre outros, que sejam necessários para a linhagem utilizada (EAGLE, 1959, YAO, ASAYAMA, 2017).

As linhagens que adquirem capacidade de crescimento contínuo *in vitro* (linhagens contínuas) apresentam um metabolismo *in vitro* bastante desregulado quando comparado com as células *in vivo*. Como resultado do metabolismo desregulado, ocorre um elevado consumo de glicose e glutamina, que são as fontes de carbono e energia, e levando a uma elevada geração de metabólitos tóxicos (lactato e amônio), que são produtos das vias metabólicas (glicólise e glutaminólise, respectivamente). Tanto o amônio quanto o lactato podem influenciar negativamente o crescimento da célula e a qualidade da proteína de interesse (ALTAMIRANO, *et al.* 2013, OZTURK, *et al.* 1997).

A glicose e a glutamina são componentes fundamentais nos meios de cultivo. A glicose é essencial ao crescimento celular, atuando como fonte de carbono e energia. Sua concentração nos meios varia em geral de 0,9 a 10 g/L. Sua metabolização ocorre inicialmente pela glicólise, onde a glicose é transformada em piruvato, gerando ATP e NADH. O piruvato pode ser metabolizado subsequentemente pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e via de fosforilação oxidativa, com alta eficiência de geração de ATP, ou então ser convertido diretamente em lactato, sem ingressar no TCA, acumulando-se como subproduto tóxico dessa via metabólica. O acúmulo de lactato nos cultivos *in vitro* é prejudicial em concentrações acima de 40 mM, causando acidificação do meio, alterando a osmolalidade, inibindo o crescimento celular e a formação do produto de interesse. Contudo, em especial em cultivos onde se controla a concentração de glicose em níveis baixos, várias linhagens celulares são capazes de sofrer um *shift* metabólico, passando a consumir lactato como fonte adicional de carbono (ALTAMIRANO, *et al.* 2013; MORAES, *et al.* 2008).

A glutamina é uma fonte de carbono, nitrogênio e energia e sua concentração nos meios de cultivo varia de 1 a 8 mM. Sua metabolização ocorre principalmente pela glutaminólise, onde a glutamina é convertida em glutamato gerando ATP. O glutamato é convertido em  $\alpha$ -cetoglutarato. Em cada uma destas reações é gerado 1 mol de amônio. O acúmulo de amônio nos cultivos é prejudicial em concentrações a partir de 2 mM, causando inibição do crescimento celular (ALTAMIRANO, *et al.* 2013; MORAES, *et al.* 2008).

## **2.4. Biorreatores e modos de operação**

Para seu cultivo *in vitro*, as linhagens de células animais requerem condições físico-químicas bem controladas, como pH, temperatura, oxigênio dissolvido e agitação. Biorreatores são sistemas de cultivo com sensores e sistemas de controle para estas variáveis, propiciando condições adequadas e permitindo alcançar altas concentrações

de células viáveis e do produto de interesse. Em geral, devido à complexidade desses sistemas, é recomendado primeiramente fazer estudos em pequena escala, utilizando, para células em suspensão, os frascos agitados, tais como tubos ventilados, *erlenmeyer*, *spinners*, etc (BURCHAM, *et al.* 2018, HAGEL, *et al.* 2008).

Os biorreatores podem ser operados em diferentes modos, que diferem principalmente em relação à alimentação (ou não) ao longo do cultivo. Os modos de cultivo em que os biorreatores podem ser operados são batelada, batelada alimentada, contínuo simples e contínuo em perfusão. O cultivo em batelada tem como vantagens a maior simplicidade de operação, porém apresenta baixa produtividade volumétrica e o tempo de residência do produto no sistema é longo, podendo levar à degradação do mesmo. É mais utilizado em pequenas e médias escalas para propagação de inóculo e desenvolvimento de processos. O modo de batelada alimentada é mais complexo que a batelada, pois envolve alimentação, ao longo do processo de cultivo celular, dos nutrientes mais consumidos pelas células, aumentando a produtividade. Contudo, ao longo do cultivo o acúmulo de metabólitos tóxicos é bem maior, podendo inibir o crescimento celular e limitar a produção. O tempo de residência do produto no biorreator é ainda mais longo, podendo haver degradação (FUENMAYOR, *et al.* 2017).

O modo contínuo simples ocorre por meio de uma alimentação contínua de meio fresco e uma remoção contínua de suspensão celular, ambas com a mesma vazão, de forma a manter sempre constante o volume de trabalho do biorreator. Esse método tem como vantagens a remoção de metabólitos tóxicos, a renovação contínua do meio de cultivo e um menor tempo de residência do produto no biorreator. No entanto, o processo é limitado a baixas vazões de alimentação/remoção e, conseqüentemente, baixas concentrações celulares, pois altas vazões resultariam em remoção de células em uma taxa maior que o seu crescimento. Por isso, a produtividade volumétrica é baixa, sendo um modo pouco atrativo para a produção industrial (KARST, *et al.* 2016).

O interesse no modo de cultivo contínuo em perfusão, ou modo contínuo com retenção celular, tem crescido tanto em escala de bancada quanto industrialmente. É um modo muito complexo, mas altamente produtivo. Nesse modo, meio fresco é alimentado com a mesma vazão com a qual o perfundido isento ou quase isento de células é retirado, sendo que as células são mantidas no biorreator através de um dispositivo de retenção celular, permitindo a operação a altas vazões de alimentação e altas concentrações de células (ALVIM, *et al.* 2019, CASTILHO, 2014, FIGUEREDO-CARDERO, *et al.* 2014, KARST, *et al.* 2016, SCHWARZ, *et al.* 2020).

## 2.5. Purificação de proteínas recombinantes

O processamento *downstream* é uma etapa crítica e de custo muito elevado na produção industrial de proteínas recombinantes para uso médico-farmacêutico em humanos, devido às elevadíssimas purezas requeridas, com níveis extremamente baixos de contaminantes derivados das células e do meio, de um modo a atender aos requisitos das agências regulatórias. A estratégia geralmente selecionada para atender aos rígidos requisitos de pureza é desenvolver um processo composto por uma sequência de passos de purificação, majoritariamente baseados em técnicas altamente seletivas, como cromatografia líquida de proteínas. Estes passos de purificação em geral são agrupados, de acordo com o nível de pureza alcançado, em grandes etapas: uma etapa de captura, seguida de uma etapa intermediária (concentração/purificação) e uma de polimento (a purificação intermediária e o polimento podem consistir em várias etapas/passos de purificação) (HUGHSON, *et al.* 2017, LESER, ASENJO, 1992, ROLDÃO, *et al.* 2011, ZHANG, *et al.* 2021).

A sequência de técnicas a serem utilizadas na purificação é dependente das características do produto de interesse, mas deve ser capaz de reduzir os contaminantes aos níveis preconizados pelas agências regulatórias, preferencialmente mantendo alto rendimento do processo e minimizando custos. Diversas técnicas podem ser utilizadas para purificação de partículas pseudo-virais e vírus, tais como diafiltração, ultracentrifugação em gradientes e técnicas cromatográficas. No entanto, na produção em larga escala, as técnicas de ultracentrifugação são de difícil escalonamento, e as técnicas baseadas em membranas de ultrafiltração apresentam limitações quanto aos níveis de purificação alcançados. Por isso, os processos cromatográficos são os mais indicados para obtenção de altos níveis de pureza (HAGEL, *et al.* 2008b, HAGEL, *et al.* 2008a, LIMA, *et al.* 2019, ROLDÃO, *et al.* 2011).

Os processos cromatográficos baseiam-se em interações físico-químicas, são seletivos e apresentam alta resolução de separação, por isso, tem sido amplamente utilizados na indústria biofarmacêutica para captura, concentração e purificação de proteínas recombinantes e partículas pseudo-virais (IYER, *et al.* 2011, NESTOLA, *et al.* 2015, ROLDÃO, *et al.* 2011).

Para purificação de vírus e partículas pseudo-virais, poderiam ser utilizadas são de afinidade, troca iônica, exclusão por tamanho, interação hidrofóbica, multimodal e exclusão estérica, utilizando como suporte diferentes tipos de resinas, membranas e monolitos (IYER, *et al.* 2011, MARICHAL-GALLARDO, *et al.* 2017).

Neste trabalho as técnicas utilizadas foram cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão estérica, que serão discutidas em maior detalhe nos próximos itens.

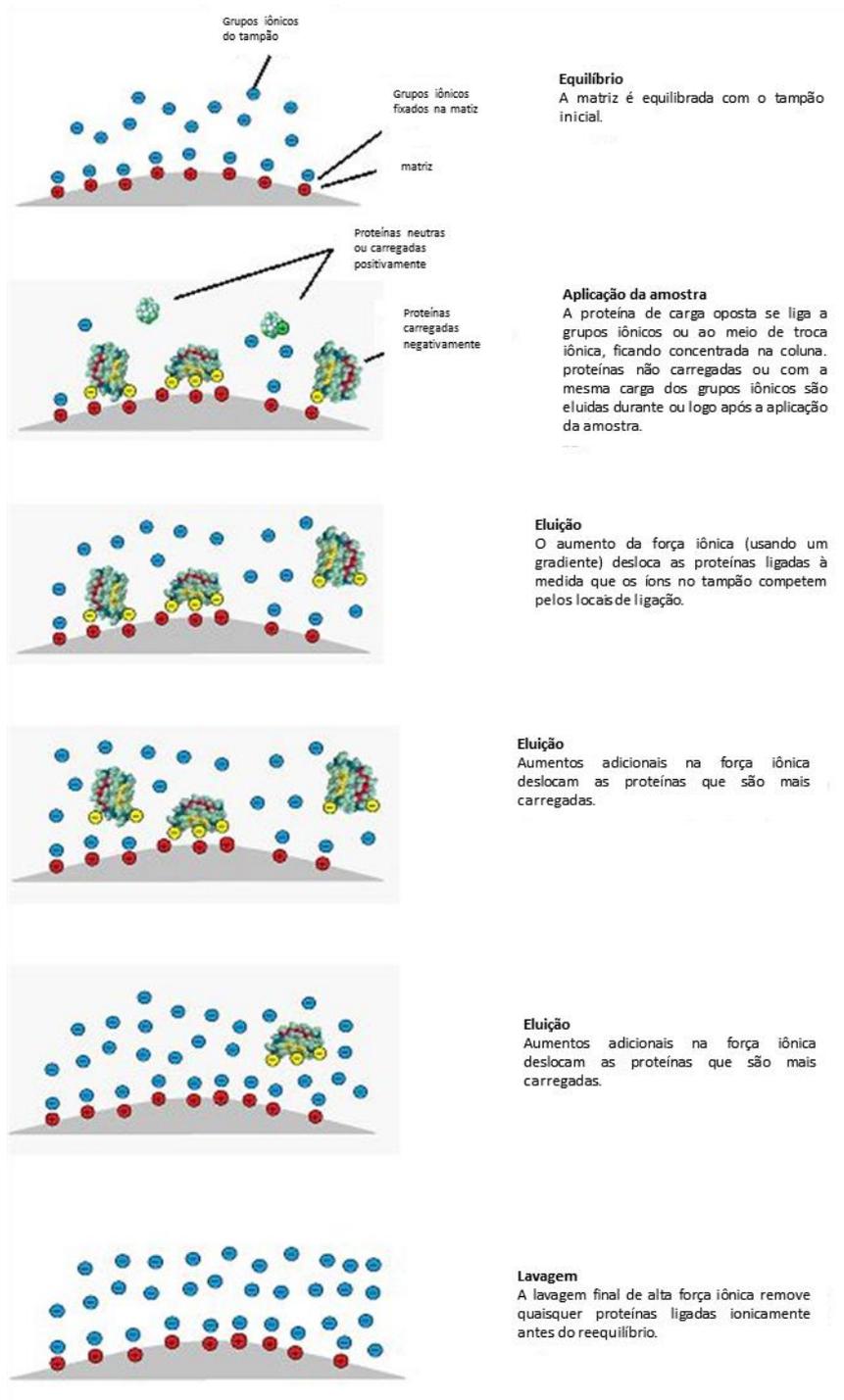
### **2.5.1. Cromatografia de troca iônica**

A cromatografia de troca iônica é um tipo de cromatografia líquida que tem como princípio uma interação eletrostática reversível entre a carga superficial distribuída na superfície da proteína com o ligante carregado imobilizado na resina de membrana utilizada como suporte (Figura 8). Os ligantes imobilizados podem ser de troca catiônica (ligantes com carga negativa) ou troca aniônica (ligantes com carga positiva) e a adsorção das proteínas ao adsorvente, bem como o tipo de cromatografia utilizado, é dependente do pH da solução em que a proteína se encontra e do ponto isoelétrico (pI) de cada proteína (BIOSCIENCES, *et al.* 2004, FEKETE, *et al.* 2015, JUNGBAUER, HAHN, 2009, WILLIAMS, FRASCA, 1999).

Os ligantes imobilizados na matriz se comportam como um ácido ou uma base e podem ser ligantes fracos e fortes. O que determina se um ligante é fraco ou forte é a capacidade de ionização desses ligantes em uma determinada faixa de pH. Ligantes fortes se comportam como um ácido ou base forte e não alteram a carga dentro de uma ampla faixa de pH, tornando seu uso vantajoso, uma vez que a capacidade adsortiva do ligante não se altera em uma ampla faixa de pH, já que não há mudança significativa de carga do ligante. Ligantes fracos podem perder ou ganhar prótons de acordo com a variação de pH, ou seja, a capacidade de ionização é variável de acordo com o pH do meio, o que pode acarretar uma variação da capacidade adsortiva do ligante. Nesse tipo de cromatografia, a seletividade está diretamente relacionada à natureza do ligante, ao pH, à força iônica e às condições de eluição (eluição com pH ou força iônica sendo alterados em gradiente linear ou em degraus) (BIOSCIENCES, *et al.* 2004, FEKETE, *et al.* 2015, JUNGBAUER, HAHN, 2009, WILLIAMS, FRASCA, 1999).

A cromatografia de troca iônica (IEX) vem sendo largamente utilizada nos processos de purificação de VLPs para remoção de DNA da célula hospedeira, proteínas da célula hospedeira, lipídeos e componentes do meio de cultivo, podendo ser usada na etapa de captura ou de purificação intermediária (FEKETE, *et al.* 2015, KALBFUSS, *et al.* 2007a, KALBFUSS, *et al.* 2007b, KIMIA, *et al.* 2019, ROLDÃO, *et al.* 2011). Além disso, a IEX é uma técnica bastante difundida e utilizada também para

purificação de vírus, anticorpos monoclonais, e outras proteínas recombinantes. (BAKHSHIZADEH GASHTI, *et al.* 2023) utilizou a IEX como uma das etapas de purificação de um candidato a vacina contra o HIV baseada no vírus da estomatite vesicular recombinante, FISCHER, *et al.* (2018) purificaram com sucesso vírus da influenza A utilizando IEX.



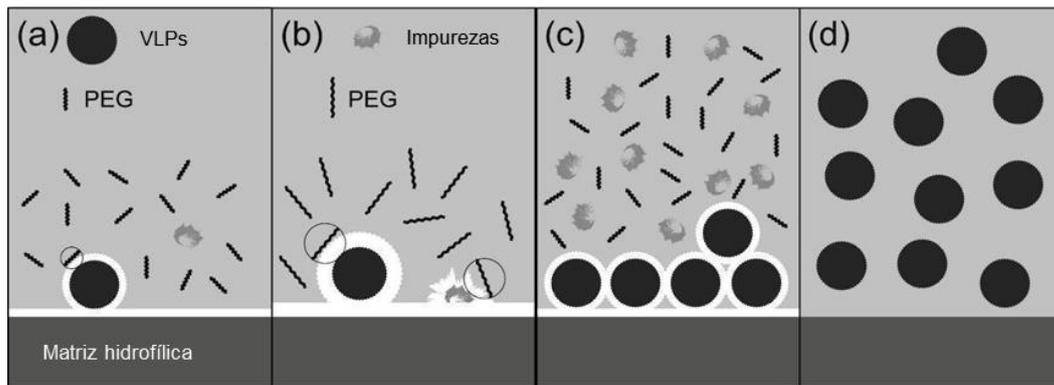
**FIGURA 8.** Ilustração das etapas de separação em cromatografia de troca aniônica. Adapta de BAHADIR, (2013).

## 2.5.2. Cromatografia de exclusão estérica

A cromatografia de exclusão estérica (SXC) é um tipo de cromatografia líquida que tem como princípio a exclusão mútua da molécula alvo e de polietilenoglicol (PEG) através da associação com uma superfície hidrofílica, sem ocorrer nenhuma interação física ou química (adsorção, troca iônica, etc.), conforme mostrado na Figura 9 (N.A. PARRIS, 1984, NESTOLA, *et al.* 2015). Nesse tipo de cromatografia, a seletividade está diretamente relacionada ao tamanho da molécula alvo e ao tamanho e concentração de PEG, onde moléculas maiores são retidas mais fortemente, sendo que, quanto maior e mais concentrado o PEG maior será a associação com as superfícies hidrofílicas da cromatografia. Por isto, a SXC é uma técnica potencial para ser aplicada na purificação de VLPs a partir de sobrenadantes de cultura celular (LEE, *et al.* 2012, NESTOLA, *et al.* 2015).

O PEG é um polímero orgânico, quimicamente inerte a superfícies hidrofílicas, que age como um agente precipitante na SXC. Esse polímero promove uma desestabilização termodinâmica fazendo com que as proteínas se associem para diminuir a área de contato entre elas e o solvente rico em PEG. Com isso, as partículas menores são facilmente lavadas, enquanto as macromoléculas ficam retidas na superfície. Na fase de eluição, reduz-se ao diminuir a concentração de PEG e a proteína de interesse pode ser recuperada na fração eluída (LEE, *et al.* 2012, MARICHAL-GALLARDO, *et al.* 2017).

A SXC tem sido estudada para purificação de vetores virais, vírus, RNA e baculovírus (EILTS, *et al.* 2022, LABISCH, *et al.* 2022, MARICHAL-GALLARDO, *et al.* 2021).



**FIGURA 9.** Mecanismo de ação do PEG na SXC. (a) PEG é estericamente excluído da superfície das partículas virais e da matriz hidrofílica, criando uma zona deficiente em PEG (área branca) onde a concentração de PEG é menor em comparação com o solvente. (b) Na presença de PEG, as impurezas de baixa massa molecular associam-se à membrana. (c) O PEG cria um estado termodinamicamente desfavorável fazendo com que as partículas virais se associem, reduzindo a área de contato entre elas e o solvente. Como não há interação química direta, as espécies-alvo não se ligam à superfície. (d) As partículas virais são recuperadas por meio da redução da concentração de PEG na fase móvel. Adaptada de MARICHAL-GALLARDO, *et al.* (2017).

### 3. Objetivos

O objetivo geral desse trabalho foi a investigação de uma plataforma para a produção de partículas pseudo-virais (VLPs) do vírus da dengue dos 4 sorotipos, com base no uso de células animais da linhagem HEK293 e no emprego de técnicas de purificação baseadas em cromatografia líquida de proteínas.

Para isso, os objetivos específicos definidos foram:

- Produção de VLPs de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 por meio de transfecção transiente.
- Produção de VLPs de DENV-1 por meio de um *pool* de células transfectadas de forma estável, cultivadas em biorreator agitado.
- Avaliação de processos de purificação de VLPs de DENV combinando técnicas de cromatografia de exclusão estérica, cromatografia de troca iônica e ultrafiltração/diafiltração
- Avaliação de desempenho dos processos de purificação por meio de análise de pureza e quantificação de proteínas totais e DNA residual.
- Caracterização de VLPs de DENV por microscopia eletrônica de transmissão.

## 4. Metodologia

### 4.1. Desenvolvimento das linhagens celulares recombinantes

Células da linhagem HEK 293-3F6 (NRC, Canadá), capazes de crescer em suspensão, foram cultivadas em meio HEK-TF (Sartorius-Xell, Alemanha), o qual é adequado tanto para manutenção e crescimento celular, quanto para etapas de transfecção. Este meio é quimicamente definido, livre de soro e de componentes de origem animal ou humana.

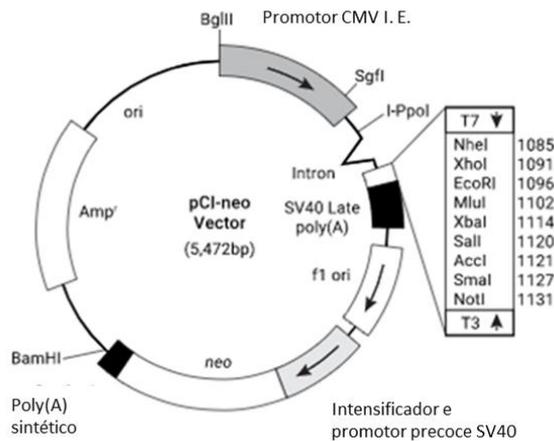
### 4.2. Construções gênicas e vetores de expressão

As construções gênicas utilizadas, previamente desenhadas e sintetizadas na Genscript, continham a sequência codificante das proteínas prM e E das cepas de DENV1-4 mostradas na Tabela 3.

**TABELA 3.** Identificador do Genbank das sequências utilizadas

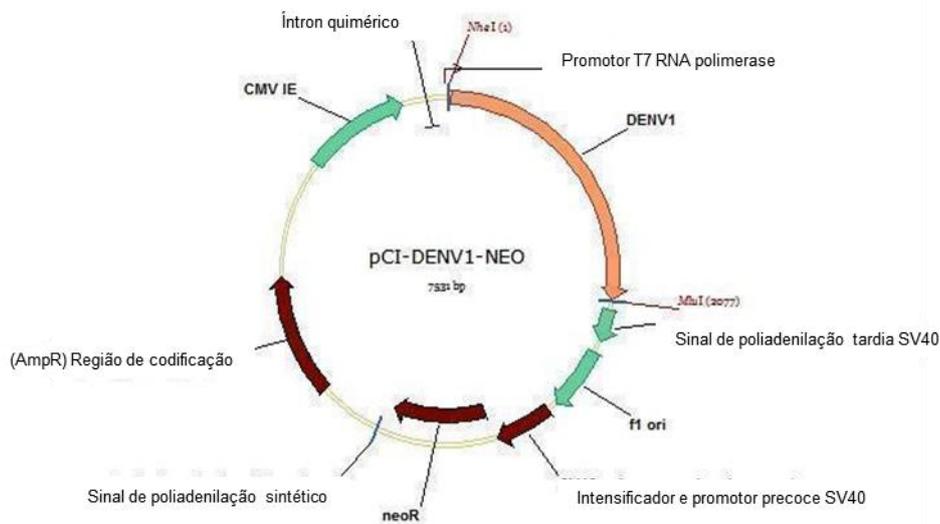
<b>Sorotipo</b>	<b>Indicador Genbank</b>
DENV 1	KJ189368
DENV 2	M20558
DENV 3	M93130
DENV 4	M14931

O vetor de expressão utilizado foi o plasmídeo pCI-neo (Promega), o qual contém os elementos mostrados na Figura 10.



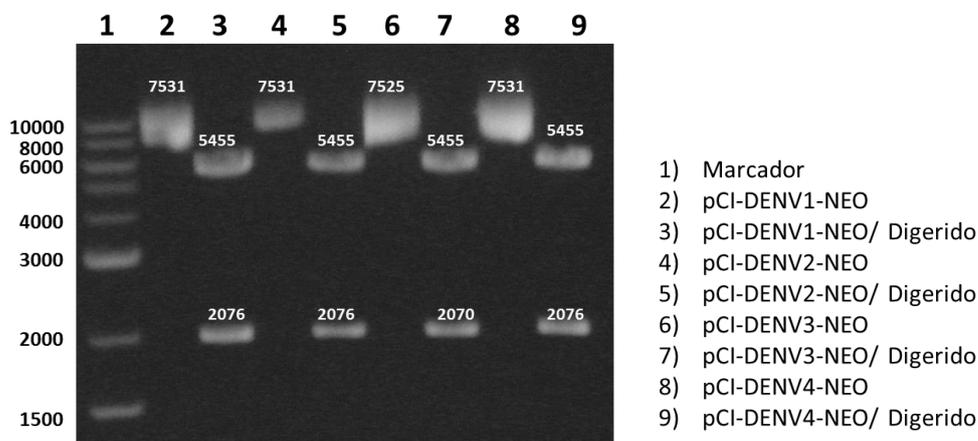
**FIGURA 10.** Mapa do plasmídeo pCI-neo utilizado como vetor de expressão. Adaptado de [www.promega.com.br/products/vectors/protein-expression-vectors/pci\\_neo-mammalian-expression-vector/](http://www.promega.com.br/products/vectors/protein-expression-vectors/pci_neo-mammalian-expression-vector/).

Os insertos codificantes de prM/E, para os 4 sorotipos, foram subclonados no vetor de expressão pCI-neo por membro anterior do LECC/COPPE/UFRJ (Thayana A. Cruz), utilizando técnicas fundamentais de biologia molecular. O vetor de expressão obtido para os 4 sorotipos é exemplificado por meio do vetor para expressão de DENV-1 na Figura 11.



**FIGURA 11.** Vetor plasmidial recombinantes do sorotipo 1 do vírus da dengue. Os sorotipos 2, 3 e 4 apresentam o mesmo desenho variando apenas a porção referente ao sorotipo.

Conforme o gel de agarose apresentado na Figura 12, foi possível confirmar a presença dos insertos dos 4 sorotipos no vetor pCI-neo, visto que, após digestão enzimática dupla, observaram-se fragmentos nos tamanhos esperados, que correspondem à sequência genética codificante das proteínas prM/E dos quatro sorotipos no vetor de expressão pCI-neo.



**FIGURA 12.** Gel de agarose dos plasmídeos recombinantes dos quatro sorotipos da dengue sem digestão e com digestão enzimática dupla utilizando as enzimas *Nhe* I e *Mlu* I.

Para a preparação dos vetores referentes aos 4 sorotipos nas quantidades e pureza requeridas para transfecção, os mesmos foram propagados em culturas de *Escherichia coli* e purificados utilizando o kit PureLink HiPure Plasmid Midiprep (Thermo Fisher, EUA). A quantificação de DNA foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher, EUA), e a integridade e pureza dos DNAs foi avaliada através de digestões enzimáticas duplas com as enzimas *Nhe* I e *Mlu* I (New England Biolabs® Inc., Reino Unido), seguidas de análise por eletroforese em gel de agarose.

## **4.3. Produção das VLPs**

### **4.3.1. Transfecções transientes**

A transfecção transiente foi realizada para avaliação inicial da produção de VLPs. As células foram transfectadas com os vetores plasmidiais recombinantes purificados, utilizando erlenmeyers de 500 mL com volume de trabalho de 200 mL para DENV1, 300 mL para DENV2, 150 mL para DENV3 e 300 mL para DENV4. A transfecção foi realizada utilizando o método de lipofecção a uma  $X_v$  de  $1,0 \cdot 10^6$  cels/mL, utilizando 0,5 µg/mL de plasmídeo e 1,0 µL/mL do reagente de transfecção catiônico Lipofectamine® 3000 (Invitrogen, EUA), 25 µL/mL de meio Opti-MEM e 1 µL/mL de reagente P300 (Invitrogen, EUA) em meio HEK TF (Sartorius-Xell, Alemanha).

As células foram mantidas em estufa incubadora a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e velocidade de agitação de 180 rpm. Após 48h, a suspensão foi centrifugada a 1000 g por 10 min e o sobrenadante recolhido e armazenado a 4°C para posterior utilização.

### **4.3.2. Transfecções estáveis**

Para a transfecção estável utilizou-se o método de lipofecção a uma  $X_v$  de  $1,0 \cdot 10^6$  cels/mL, utilizando 0,5 µg/mL de plasmídeo e 1,0 µL/mL do reagente de transfecção catiônico Lipofectamine® 3000 (Invitrogen, EUA), 25 µL/mL de meio Opti-MEM e 1 µL/mL de reagente P300 (Invitrogen, EUA) em meio HEK TF (Sartorius-Xell, Alemanha). em tubos agitados com tampa ventilada (TPP AG, Suíça) com volume de trabalho de 5 mL ou placa de 24 poços profundos (Corning Sciences, Reino Unido, ou Thomson Instrument Company, EUA) com volume de trabalho de 2 mL. As populações celulares obtidas foram mantidas sob pressão seletiva com antibiótico específico G418 sulfatado (100 µg/mL) (Gibco, EUA) por 60 dias, em estufa incubadora a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e velocidade de agitação de 180 rpm.

Todos os experimentos foram realizados em duplicatas experimentais.

Para os quatro sorotipos, linhagens celulares recombinantes ficaram em seleção por 60 dias. Um banco foi feito após 30 dias de seleção, e outro após 60 dias.

### **4.3.3. Produção em frascos agitados**

O pool de células HEK293 parental e o pool de células estáveis produtor de VLPs de DENV-1 foi descongelado, expandido e cultivado em frascos agitados.

Inicialmente para a produção de VLPs-TT e VLPs-TE para caracterização e avaliação da etapa de purificação foi descongelado um criotubo de cada banco de trabalho e colocado em banho-maria a 37°C para rápido descongelamento. As células foram ressuspensas em 5 mL de meio HEK-TF fresco e centrifugadas a 300 g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e as células foram novamente ressuspensas em meio fresco de modo a manter a concentração de células viáveis (Xv) a  $1,0 \cdot 10^6$  cels/mL.

As diluições em meio fresco foram realizadas em intervalos de dois a três dias, com Xv inicial de  $1,0 \cdot 10^6$  cels/mL, até que se obtivesse inóculo suficiente para todo o experimento.

Foram utilizados quatro frascos agitados do tipo erlenmeyer de vários volumes e Xv inicial de  $1,0 \cdot 10^6$  cels/mL em cada. As células foram mantidas em estufa incubadora a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e velocidade de agitação de 125 rpm. Diariamente foram retirados 500 uL de amostra para contagem de células viáveis.

A cada dois dias a suspensão foi centrifugada a 300 g por 5 min, as células ressuspensas em um novo volume e o sobrenadante recolhido e armazenado a 4°C até obtenção de um volume total de 1 L para posterior utilização.

### **4.3.4. Produção em biorreator do tipo tanque agitado**

Para a cinética de produção em biorreator operado em modo batelada, foi descongelado um criotubo do banco de trabalho de HEK 293-DENV1 e colocado em banho-maria a 37°C para rápido descongelamento. As células foram ressuspensas em 5 mL de meio HEK-TF fresco e centrifugadas a 300 g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e as células foram novamente ressuspensas em meio fresco de modo a manter a concentração de células viáveis (Xv) a  $1,0 \cdot 10^6$  cels/mL.

As diluições em meio fresco foram realizadas em intervalos de dois a três dias, com Xv inicial de  $1,0 \cdot 10^6$  cels/mL, até que se obtivesse inóculo suficiente para o experimento.

O biorreator (ez-Control, Applikon Biotechnology, Holanda) foi inoculado com

0,5•10<sup>6</sup> células/mL em meio HEK-TF, sendo o cultivo mantido a 37 °C, pH 7,1 e teor de oxigênio dissolvido em 40% da saturação do ar. O controle automático de dO<sub>2</sub> foi feito por meio da injeção de ar por um aerador macroporoso do tipo L (*drilled hole sparger*), um impelidor de pás inclinadas foi utilizado para controle da agitação e manteve-se a velocidade entre 200 e 300 rpm, com volume de trabalho mantido em 1,5 L. O pH foi controlado por meio da injeção de CO<sub>2</sub> pelo aerador a uma vazão máxima de 0,02 L/min.

Diariamente foram retirados 2 mL de amostra para contagem de células viáveis e determinação da concentração de glicose e lactato, em triplicata.

Após 10 dias o experimento foi finalizado e a suspensão celular foi centrifugada a 200 g por 10 min para obtenção do sobrenadante de cultivo celular.

#### **4.4. Purificação de VLPs de DENV**

Os sobrenadantes oriundos das transfecções transientes e da produção em frascos, foram centrifugados à 1000 g por 10 min e filtrados com uma membrana de nitrocelulose com tamanho de poro nominal de 0,45 µm (Millipore, EUA) previamente aos estudos de purificação.

Foram avaliados 2 processos:

- 1) SXC + UF/DF – transfecção transiente
- 2) IEX + SXC + UF/DF – transfecção estável

##### **4.4.1. Cromatografia de troca iônica**

A purificação foi realizada utilizando uma membrana de troca aniônica Sartobind® Q nano 3 mL (Sartorius, Alemanha), operado no modo bind-and-elute, em um sistema de purificação ÄKTA Purifier controlado pelo software Unicorn 5.20 (GE Healthcare) e com os seguintes tampões:

A – PBS (KCl 0,2 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,15 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g/L; pH 8,0)

B – PBS (pH 8,0) + NaCl (1 M)

Para a etapa de equilíbrio, utilizou-se 100% de A, para a lavagem 10% de B. Já para a eluição, utilizou-se 35% do tampão B, permitindo que as VLPs fossem liberadas e coletadas à saída da membrana. Para todas as corridas cromatográficas e em todas as etapas a vazão utilizada foi de 5 mL/min, e as amostras foram recolhidas em frações de 5 mL. A membrana foi regenerada por uma lavagem com 100% do tampão A, a uma vazão de 5 mL/min, seguido de NaOH 1 M a uma vazão de 1 mL/min por 30 min, água ultrapura a uma vazão de 5 mL/min e armazenada preenchida com etanol 20% (v/v).

#### **4.4.2. Cromatografia de exclusão estérica**

A purificação foi realizada utilizando uma membrana de troca catiônica Sartobind® S75X (Sartorius, Alemanha), operado em modo flow-through, em um sistema de purificação ÄKTA Purifier controlado pelo software Unicorn 5.20 (GE Healthcare) e com os seguintes tampões:

A – PBS (NaCl 8 g/L; KCl 0,2 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,15 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g/L; pH 7,4)

B – PBS (pH 7,4) + PEG 6000 (16% (m/v)) + NaCl (50 mM)

Para as etapas de equilíbrio, alimentação e lavagem, utilizou-se 50% de B, a fim de que a concentração final de PEG 6000 fosse 8% (m/v). Já para a eluição, utilizou-se 100% do tampão A, reduzindo a concentração de PEG e permitindo que as VLPs fossem liberadas e coletadas à saída da membrana. Para todas as corridas cromatográficas e em todas as etapas a vazão utilizada foi de 5 mL/min, e as amostras foram recolhidas em frações de 2 mL. A membrana foi regenerada por uma lavagem com NaCl 1 M, a uma vazão de 5 mL/min, seguido de NaOH 1 M a uma vazão de 1 mL/min por 30 min, água ultrapura a uma vazão de 5 mL/min e armazenada preenchida com etanol 20% (v/v).

#### **4.4.3. Ultrafiltração/Diafiltração**

Após a etapa cromatográfica, realizou-se uma ultrafiltração/diafiltração para concentração das amostras utilizando o dispositivo Vivaspin® (Merck) de 20 mL contendo membranas de poliétersulfona (PES) com massa molecular de corte de 100 kDa. Inicialmente para equilibrar a membrana utilizou-se o tampão A, centrifugando por

10 min a 2000 g. Após o equilíbrio, as amostras foram centrifugadas por 5 min à 2000 g, esse procedimento se repetiu por três vezes, onde a cada centrifugação o permeado era recolhido e o mesmo volume de tampão A era adicionado ao retido. Para as VLPs obtidas por transfecção transiente os seguintes volumes foram obtidos, DENV1 o volume inicial foi de 4,5 mL, e o volume retido 1,4 mL, DENV2 volume inicial 10,0 mL, volume retido 6,0 mL, DENV3 volume inicial 3,8 mL, volume retido 2,5 mL e DENV4 volume inicial 4,9 mL, volume retido 2,5 mL.

Para as VLPs de DENV1/TE o volume inicial utilizado foi de 8 mL e o volume retido obtido foi 2 mL.

## **4.5. Ensaio Analítico**

### **4.5.1. *Immunoblot***

Os ensaios de spot blot foram realizados para verificação da produção das VLPs e para avaliação do processo de purificação. É um ensaio qualitativo, onde 3 µL de cada amostra é aplicado em uma membrana de nitrocelulose (Vita Scientific, EUA) de alta adsorção de proteínas, sem nenhuma preparação prévia. As etapas que seguem a aplicação das amostras são descritas abaixo.

**Bloqueio:** a membrana foi incubada com solução de bloqueio (tampão TBS com Tween 20 0,05% (v/v) e leite em pó desnatado (Molico) 5% (m/v)) por 1h. Essa etapa tem como objetivo evitar reações cruzadas com outros sítios reativos.

**Incubação com anticorpo primário:** a membrana foi incubada em solução de incubação (tampão TBS com Tween 20 0,05% (v/v) e leite em pó desnatado 0,5% (m/v)) acrescida de anticorpo monoclonal 4G2 murino cedido pelo LATAM; Biomanguinhos, Brasil, na diluição de 1:5000, por 1h. Este anticorpo monoclonal (mAb) reconhece o *loop* de fusão altamente conservado dos flavivírus.

**Incubação com anticorpo secundário:** a membrana foi incubada em solução de incubação acrescida de anticorpo secundário IgG (H+L) anti-camundongo acoplado à HRP (Peroxidase de raiz forte; #RF238276, Invitrogen), que reconhece o anticorpo primário, na diluição de 1:4000, por 1h.

Lavegem: foi realizada três lavagens com tampão (tampão TBS com Tween 20 0,05% (v/v) e leite em pó desnatado (Molico) 5% (m/v)) por três vezes.

Revelação: uma mistura de 1:1 de luminol e peróxido de hidrogênio (Clarity™ Western ECL Substrate; Bio-Rad, EUA), que catalisa uma reação de quimiluminescência, foi utilizada. O sinal foi detectado por meio do uso de foto documentador modelo FluorChemE™ (Protein Simple, EUA).

#### **4.5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

A eletroforese é uma técnica baseada na mobilidade eletroforética das moléculas, que tem como objetivo separar as proteínas de acordo com suas massas moleculares.

A análise foi realizada em condições não redutoras utilizando o sistema Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad, EUA). Foram preparados géis com espessura de 1,5 mm, empregando uma concentração de 5% acrilamida/bisacrilamida (persulfato de amônio (PSA) 10 % (m/v), TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamino) (PlusOne, GE Healthcare Life Sciences, Alemanha), SDS 10 % m/v, solução de acrilamida (30 % m/v)/ bis-acrilamida (0,8 % m/v) em tampão Tris-HCl 0,5 M e pH = 6,8) para o gel de empilhamento e 12% acrilamida-bisacrilamida (PSA 10 %, TEMED (PlusOne, GE Healthcare Life Sciences, Alemanha), SDS 10% m/v, solução de acrilamida (30 % m/v)/ bis-acrilamida (0,8 % m/v) em tampão Tris-HCl 1,5 M e pH = 8,8) para o gel de corrida. As amostras foram diluídas em tampão de amostra (Tris.HCl 50 mM, SDS 2% (m/v), azul de bromofenol 0,1% (m/v), glicerol 10% (v/v)) na proporção de 25% de tampão para 75% de amostra e, posteriormente, aquecidas a 99°C por 5 min sob condição desnaturante e não redutora. Na cuba para eletroforese, o gel foi submergido em tampão de corrida (Tris-base 125 mM, glicina 1,25 M, SDS 0,1% (m/v), pH 8,3). Foram aplicados 30 µL de amostra em cada poço do gel e o tempo de corrida foi de aproximadamente 2 h à voltagem constante de 150 V, utilizando marcador de massa molecular (MM) comercial (Precision Plus Protein™ All Blue Standards, Bio-Rad, EUA; Precision Plus Protein™ Unstained Standards, Bio-Rad, EUA; e Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad, EUA). A revelação dos géis foi realizada com nitrato de prata conforme se segue.

#### **4.5.2.1. Revelação com nitrato de prata**

Após a corrida, o gel foi revelado e acordo com as etapas descritas abaixo.

Fixação: o gel foi deixado sob agitação por 30 min a 320 rpm em solução de fixação (etanol 30% (v/v); ácido acético 10% (v/v)).

Lavagem: após descartada a solução de fixação, o gel foi mantido em agitação por 10 minutos em solução de lavagem (etanol 30% (v/v)).

Sensibilização: a solução de lavagem foi descartada, e o gel foi submetido a duas lavagens com água ultrapura por 10 minutos cada, em seguida, foi mantido em solução de sensibilização (tiosulfato de sódio 0,02% (m/v)) por 5 minutos.

Nitrato de prata: o gel foi lavado por três vezes com água ultrapura por 1 minuto cada. Após a última lavagem o gel foi colocado em solução de nitrato de prata (0,15% (m/v)) por 30 minutos.

Revelação: descartou-se a solução de nitrato de prata e submeteu-se o gel a agitação com solução de revelação (carbonato de sódio 3% (m/v); formaldeído 0,05% (v/v)). A revelação foi acompanhada atentamente para determinação do momento de parada.

Parada: Após completa revelação, o gel foi colocado em solução de parada (ácido acético 5% (v/v)) por 10 minutos.

Ao final, o gel foi colocado em água ultrapura e armazenado a 4°C para posterior digitalização.

#### **4.5.2.2. Revelação com azul de Coomassie**

Após a corrida o gel foi colocado em agitação a 320 rpm por 30 minutos em um recipiente contendo a solução corante (Coomassie blue G250 0,25% (m/v); metanol 90% (v/v) e ácido acético glacial 0,1% (v/v)). Em seguida, a solução foi descartada e o gel permaneceu sob agitação com solução descorante (metanol 10% (v/v); ácido acético 7% (v/v)) overnight. Após completa revelação o gel foi colocado em água ultrapura e armazenado a 4°C para posterior digitalização.

### **4.5.3. Imunoensaio de *Western blot***

Após a realização da eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Inicialmente, a membrana foi submersa em tampão de transferência (Tris base 5,82g/L, glicina 2,93 g/L, 3,75 mL de solução de SDS (10% (m/v)), metanol 20% (v/v)) por 5 min, assim como as folhas de papel filtro utilizadas. Em seguida, montou-se um “sanduíche” com duas folhas de papel filtro, o gel, a membrana de nitrocelulose e mais duas folhas de papel filtro. A transferência foi feita utilizando-se o aparelho Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, EUA), com voltagem constante de 15 V por 3h. Após a transferência, a membrana foi submetida às etapas de bloqueio, incubação com anticorpos e revelação metodologia descrita para o *Immunoblot* no item 4.5.1.

### **4.5.4. Quantificação de proteínas totais**

A quantificação de proteínas totais foi realizada utilizando o kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fischer Scientific, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. A albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como padrão para elaboração da curva padrão.

Uma microplaca de 96 poços foi utilizada, aplicou-se 25 µL de amostras, 200µL de reagente de trabalho WR conforme especificações do fabricante (na razão 50:1, reagentes A:B). A placa foi incubada por 30 min a 37°C e a absorbância foi medida em 595 nm.

### **4.5.5. Cromatografia líquida de alta eficiência com coluna de exclusão molecular (SEC-HPLC)**

Um cromatógrafo líquido de alta eficiência (modelo LC-20A Prominence, Shimadzu, Japão) foi utilizado juntamente com uma coluna de exclusão molecular (modelo TSKgel G3000 SWxl, Tosoh, Japão) para avaliação das amostras oriundas do processo de purificação das VLPs obtidas por transfecção transiente. O equipamento foi operado com uma vazão de 1 mL/min, forno a 30°C e volume de injeção de 100 µL de amostra em duplicata. A fase móvel utilizada é composta de fosfato de sódio monobásico 12,5 mM; fosfato de sódio dibásico 12,5 mM; NaCl 250 mM; pH 7,0. As

análises foram feitas de acordo com as recomendações do fabricante da coluna, e com base no processo desenvolvido por STEPPERT *et al.* (2017) que foi adaptado pela equipe do LECC/PEQ/COPPE/UFRJ.

Foram utilizadas amostras purificadas de VLPs de febre amarela, obtidas por Renata Alvim e purificadas por Tulio M. Lima (LECC/PEQ/COPPE/UFRJ), utilizando o mesmo processo de purificação descrito nesse trabalho, para construção de uma curva de calibração que permitisse a quantificação das VLPs.

#### 4.5.6. Quantificação de DNA residual

A quantificação da eficiência de redução de DNA dupla fita residual da célula hospedeira nas amostras purificadas de VLPs obtidas por transfecção transiente, foi realizada utilizando o kit Quant-iT™ dsDNA Assay (Invitrogen™).

O DNA presente nas amostras se ligam a fluoróforos presentes no reagente e torna-se fluorescente, sendo a intensidade da fluorescência diretamente proporcional à concentração de DNA presente. Uma curva com um padrão de DNA disponibilizado no kit foi feita, conforme as orientações do fabricante.

Para a análise das amostras de DENV 1-4, obtidas por transfecção transiente, foram diluídas 1:10 e seguiu-se o protocolo estabelecido pelo fabricante. A partir da curva padrão a concentração de DNA foi calculada com base na equação da reta obtida pela regressão linear.

Para o cálculo da eficiência de remoção de DNA utilizou-se a equação 1.

$$E(\%) = \left( \frac{M_{SN} - M_E}{M_{SN}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

E é a eficiência de remoção de DNA

$M_{SN}$  é a massa total de DNA no sobrenadante

$M_E$  é a massa total de DNA no eluído da SXC

#### **4.5.7. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

Para obtenção das imagens de MET, 4  $\mu$ L de uma amostra foram aplicados a um filme de carbono previamente formado em grades de cobre de 300 mesh (CF300-CU-TH, Electron Microscopy Sciences, EUA) por 1–2 min, suavemente seco com papel de filtro e corado por 2 – 5 s com 15 mg/mL de formato de uranila (22450, Electron Microscopy Sciences, EUA). Amostras coradas negativamente foram fotografadas em um microscópio Hitachi HT-7800, operado a 80 kV, pertencente ao Centro Nacional de Bioimagem (Cenabio) da UFRJ.

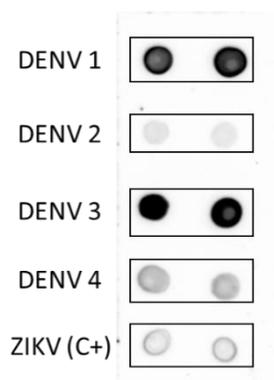
## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Produção de VLPs de DENV em células HEK293

#### 5.1.1. Produção de VLPs de DENV1-4 por meio de transfecção transiente

Foram realizados ensaios de transfecção transiente em volumes de trabalho de 200 mL, 300 mL, 150 mL, 300 mL, de DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4, respectivamente, de modo a tentar obter aproximadamente a mesma quantidade em massa de todas as VLPs, uma vez que já havia sido observado através de *Immunoblot* em experimentos preliminares, no âmbito deste trabalho, que para DENV2 e DENV4 obtém-se menor produção de VLPs no sobrenadante.

A produção de VLPs de modo transiente, em amostras de sobrenadante coletadas 48h após a transfecção foi avaliada por *Immunoblot*, conforme apresentado na Figura 13. Observou-se que foi possível obter VLPs secretadas para os quatro sorotipos, e confirmou-se que DENV2 e DENV4 são secretadas no sobrenadante em menor concentração.

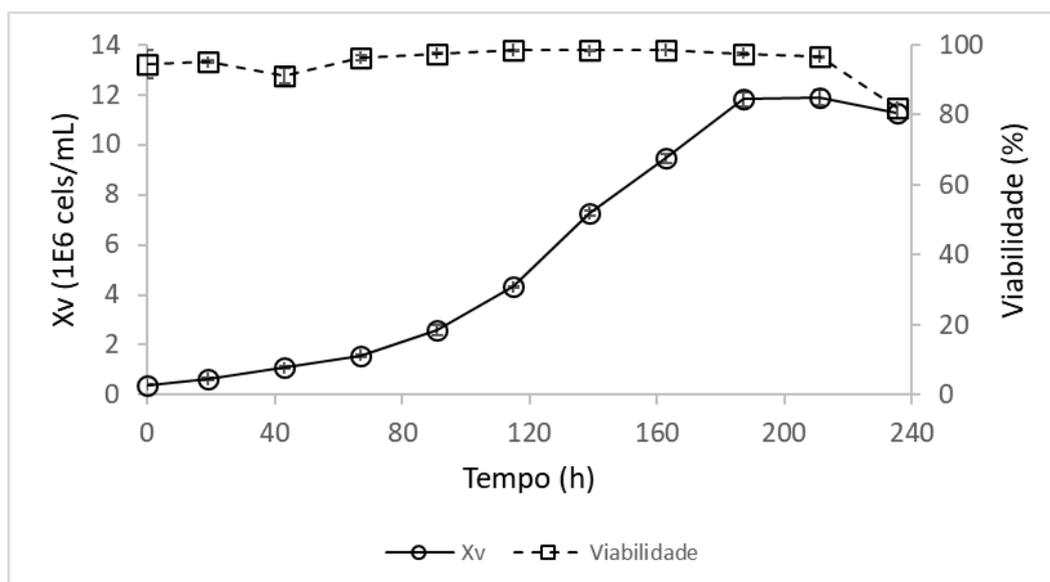


**FIGURA 13.** *Immunoblot* das amostras de sobrenadante obtidas por transfecção transiente em 48h pós-transfecção. ZIKV (C+) representa um controle positivo VLP do vírus Zika purificadas no LECC/COPPE/UFRJ. O anticorpo de detecção utilizado foi o anticorpo monoclonal pan-flavivírus 4G2, que se liga ao *loop* de fusão da proteína E, que é conservado em flavivírus.

Segundo HSIEH, *et al.* (2008) e SHANG, *et al.* (2012) a proteína E de DENV2 possui em sua porção C-terminal uma sequência de aminoácidos que é um sinal de retenção do retículo endoplasmático (RE), ou seja, as partículas produzidas não são secretadas para fora das células, conseqüentemente, observa-se uma menor produção. Não há estudos para DENV4.

### 5.1.2. Produção de VLPs de DENV1 por meio de células estáveis cultivadas em biorreator

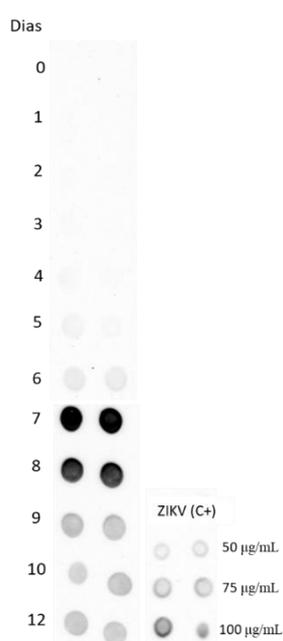
Células HEK293-3F6 transfectadas de forma estável para a produção de VLPs de DENV-1 e doravante denominadas HEK293-DENV1 foram cultivadas em biorreator do tipo tanque agitado para fins de caracterização quanto ao crescimento celular, viabilidade e produção de VLPs. O perfil cinético, apresentado na Figura 14, permite identificar três fases ao longo da curva de crescimento, uma fase lag de aproximadamente 43 h, fase exponencial de 43 h a 190h, uma fase estacionária de 24 h e o início da fase de morte celular é observado no 10º dia de cultivo. Foi determinado como ponto de parada para o cultivo o dia em que a viabilidade fosse menor que 85%.



**FIGURA 14.** Perfil cinético das células HEK293-DENV1 cultivadas em biorreator operado em modo batelada.

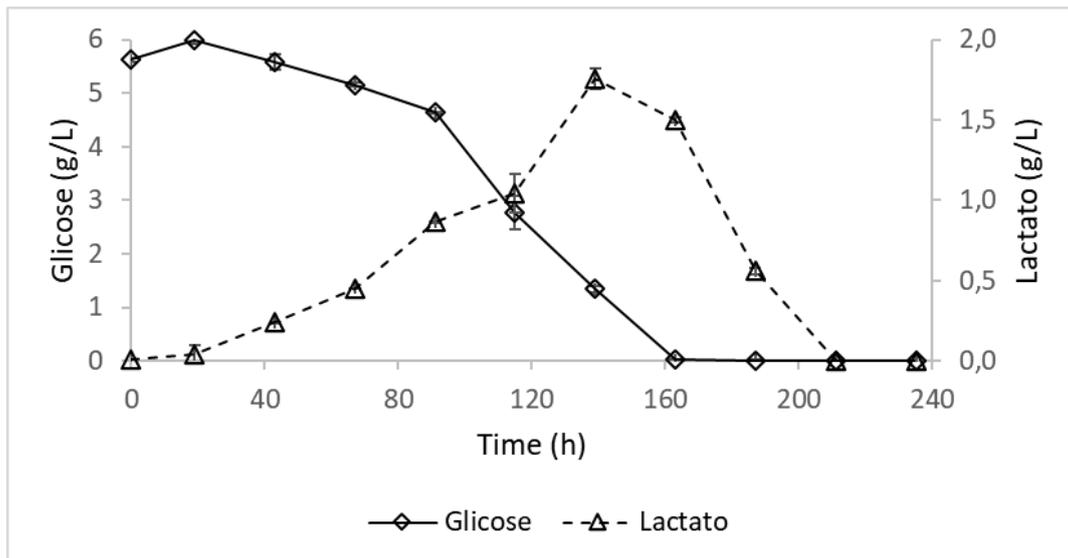
A taxa de crescimento exponencial ( $\mu_{exp}$ ) foi de aproximadamente  $0,02 \text{ h}^{-1}$ , que equivale a um tempo de duplicação ( $T_d$ ) de 34,7 h. Além disso, a concentração máxima de células viáveis, observada no 8º dia de cultivo, foi de  $11,8 \times 10^6 \text{ cels/mL}$ , com 97% de viabilidade. Conforme o *immunoblot* apresentado na Figura 15, a produção máxima de VLPs ocorreu nos dias 7 e 8 de cultivo.

BUFFIN, *et al.* (2019) expressaram transientemente VLPs de influenza em células HEK 293T, adaptadas ao cultivo em suspensão, utilizando biorreator Mobius® CellReady 3L (Merck Millipore) e obtiveram uma densidade de células viáveis entre  $2 - 4 \times 10^6 \text{ cels/mL}$  no 4º dia de cultivo, com viabilidade em torno de 70%.



**FIGURA 15.** *Immunoblot* das amostras de VLPs de DENV1/TE da cinética em biorreator operado em modo batelada. ZIKV (C+) representa um controle positivo de VLPs do vírus Zika purificadas no LECC/COPPE/UFRJ.

Através do perfil de consumo de glicose e produção de lactato das células apresentado na Figura 16, observa-se que toda a glicose disponível foi consumida até o 6º dia, e as células iniciaram um *shift* metabólico para consumo de lactato no 7º dia, mantendo as células vivas até o 10º dia. A taxa de consumo de glicose na fase exponencial ( $q_{glc, exp}$ ) foi de  $0,35 \text{ ng/(cel.h)}$  e a taxa de produção de lactato ( $q_{lac, exp}$ ) foi de  $0,11 \text{ ng/(cel.h)}$ .



**FIGURA 16.** Perfil de consumo de glicose e produção de lactato para a cinética de produção de VLPs de DENV1/TE em biorreator operado em modo batelada.

Não foi encontrado trabalhos descritos na literatura utilizando cultivo em biorreator em modo batelada com linhagens de células de mamíferos que expressem constitutivamente VLPs de DENV. Acredita-se que a expressão constitutiva de VLPs seria tóxica para células hospedeiras (ESPÓSITO, *et al.* 2015), então geralmente os métodos de expressão descritos são transientes. Além disso, com o crescente interesse no modo de cultivo contínuo em perfusão, os trabalhos vêm sendo desenvolvidos baseados nesse modo de operação.

## 5.2. Purificação de VLPs de DENV

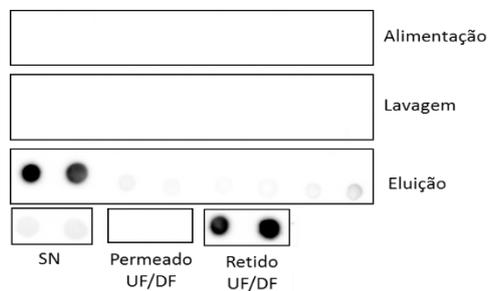
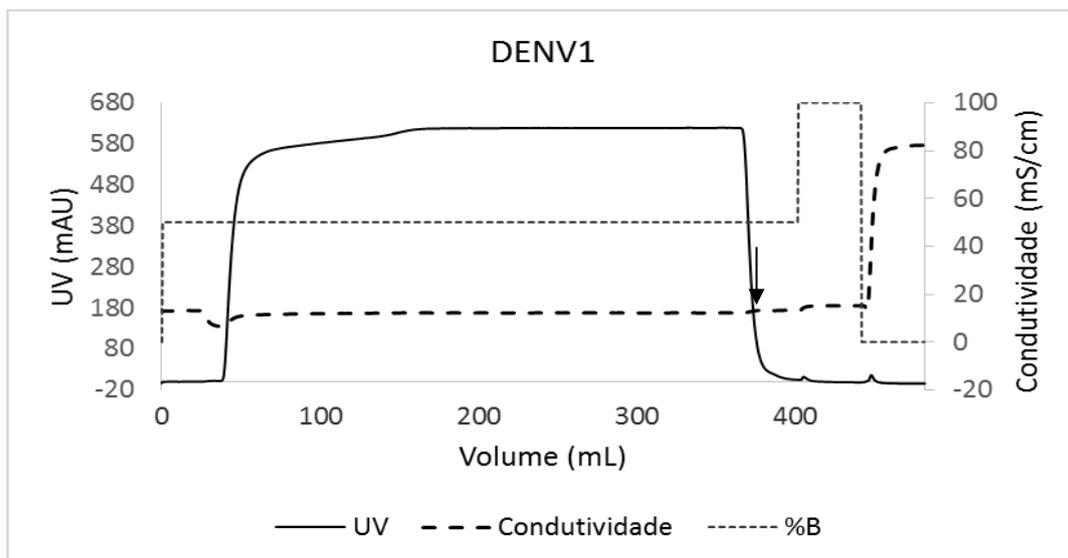
### 5.2.1. Investigação de um processo baseado em cromatografia de exclusão estérica (SXC) e ultrafiltração/diafiltração (UF/DF)

Para purificação das VLPs obtidas por transfecção transiente de DENV 1-4, foi investigado um processo adotando como 1ª etapa a técnica de SXC com PEG 8% (m/v) e uma membrana de troca catiônica forte onde os contaminantes de baixa massa molecular e carga positiva vão se ligar à membrana e as VLPs vão se associar para diminuir a área de contato entre elas e o solvente rico em PEG minimizando a desestabilização termodinâmica causada pelo mesmo. Os contaminantes de baixa massa molecular e carga negativa não irão se ligar à membrana e serão facilmente removidos durante o processo de alimentação. Embora não seja usual a utilização de fases estacionária carregadas, utilizou-se uma membrana de troca iônica, conforme

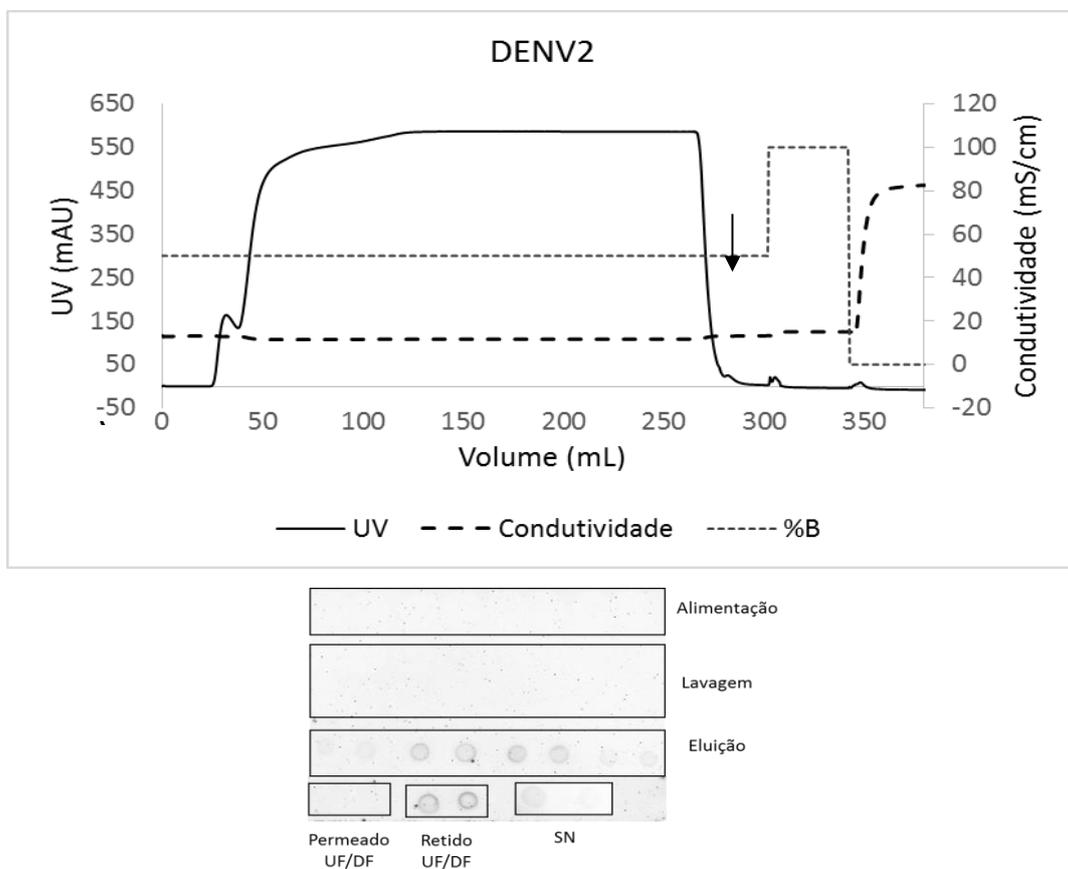
proposto em trabalho anterior de Túlio Lima (LECC/COPPE/UFERJ) para VLPs de febre amarela (ALVIM *et al.* 2021), visando à maximização da remoção de contaminantes por diferentes princípios de separação (tamanho e carga), resultando em uma cromatografia multimodal. GAGNON, *et al.* (1996) provaram que a adição de PEG na fase móvel durante o processo cromatográfico alterou o comportamento de adsorção e retenção de proteínas em IEX e aumentou a seletividade.

Utilizou-se para a eluição das VLPs o tampão PBS, por ser um tampão fisiológico, mantendo o processo mais simples e evitando a necessidade de troca de tampão para etapas subsequentes.

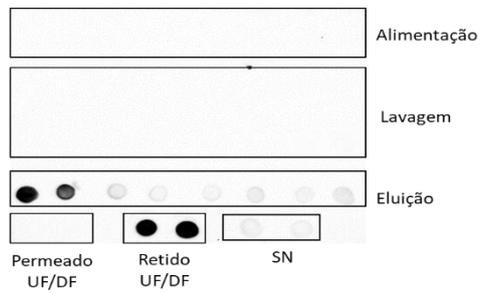
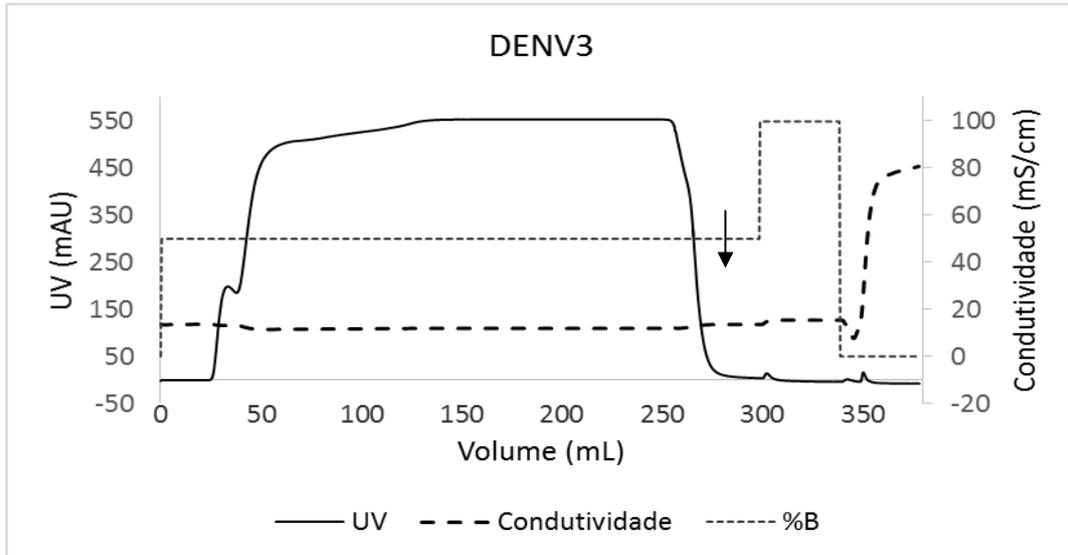
Cromatogramas típicos obtidos para SXC são apresentados nas Figuras 17-21 para as VLPs de DENV 1-4, respectivamente. Todo o volume da fração eluída foi coletado e analisado quanto à presença de VLPs. Conforme pode-se observar nestas Figuras, nas frações de alimentação e lavagem não foram observados sinais de VLPs por *Immunoblot*.



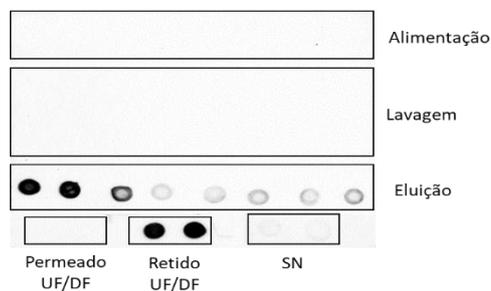
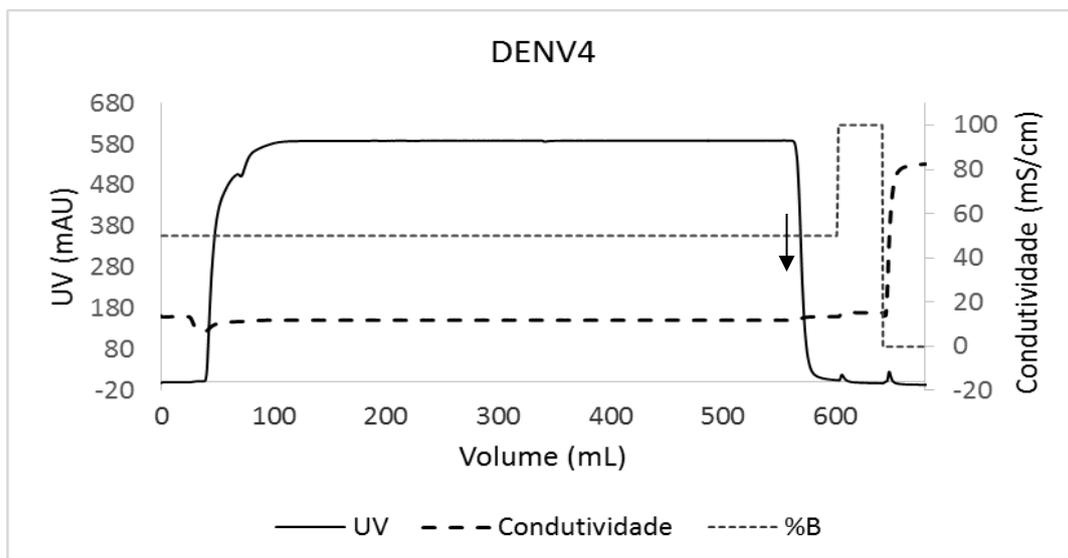
**FIGURA 17.** Cromatograma do processo de purificação por SXC utilizando membrana de troca catiônica e *Immunoblot* utilizando anticorpo primário 4G2 para detecção das VLPs nas frações da cromatográfica de SXC para DENV1.



**FIGURA 18.** Cromatograma do processo de purificação por SXC utilizando membrana de troca catiônica e *Immunoblot* utilizando anticorpo primário 4G2 para detecção das VLPs nas frações da cromatográfica de SXC DENV2.



**FIGURA 19.** Cromatograma do processo de purificação por SXC utilizando membrana de troca catiônica e *Immunoblot* utilizando anticorpo primário 4G2 para detecção das VLPs nas frações da cromatográfica de SXC DENV3.



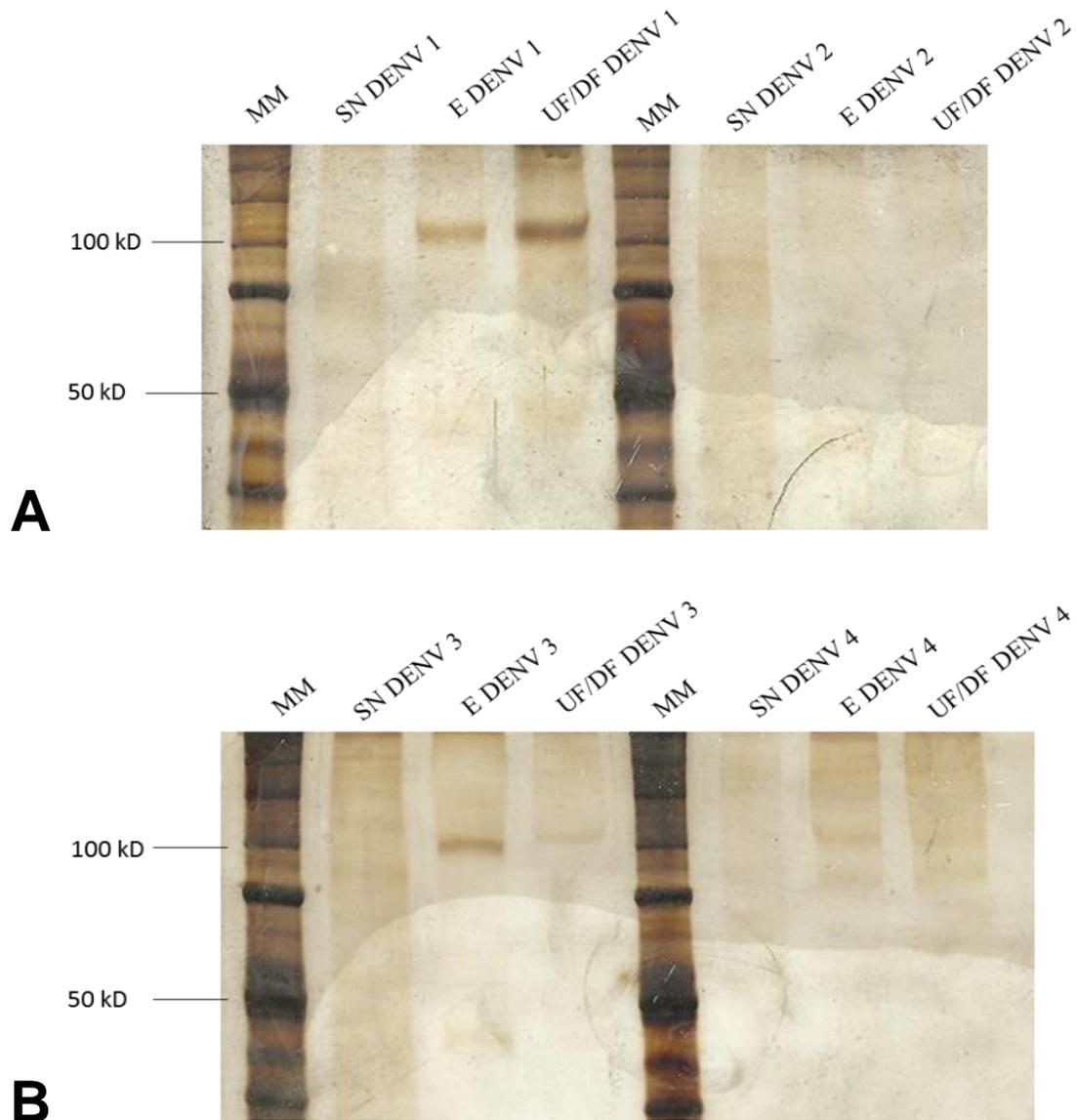
**FIGURA 20.** Cromatograma do processo de purificação por SXC utilizando membrana de troca catiônica e *Immunoblot* utilizando anticorpo primário 4G2 para detecção das VLPs nas frações da cromatográfica de SXC DENV4.

Conforme mostrado nos próximos sub-itens, um conjunto de técnicas analíticas foi utilizado para analisar as frações purificadas e, portanto, para permitir uma avaliação do desempenho do processo de purificação em uma etapa proposto.

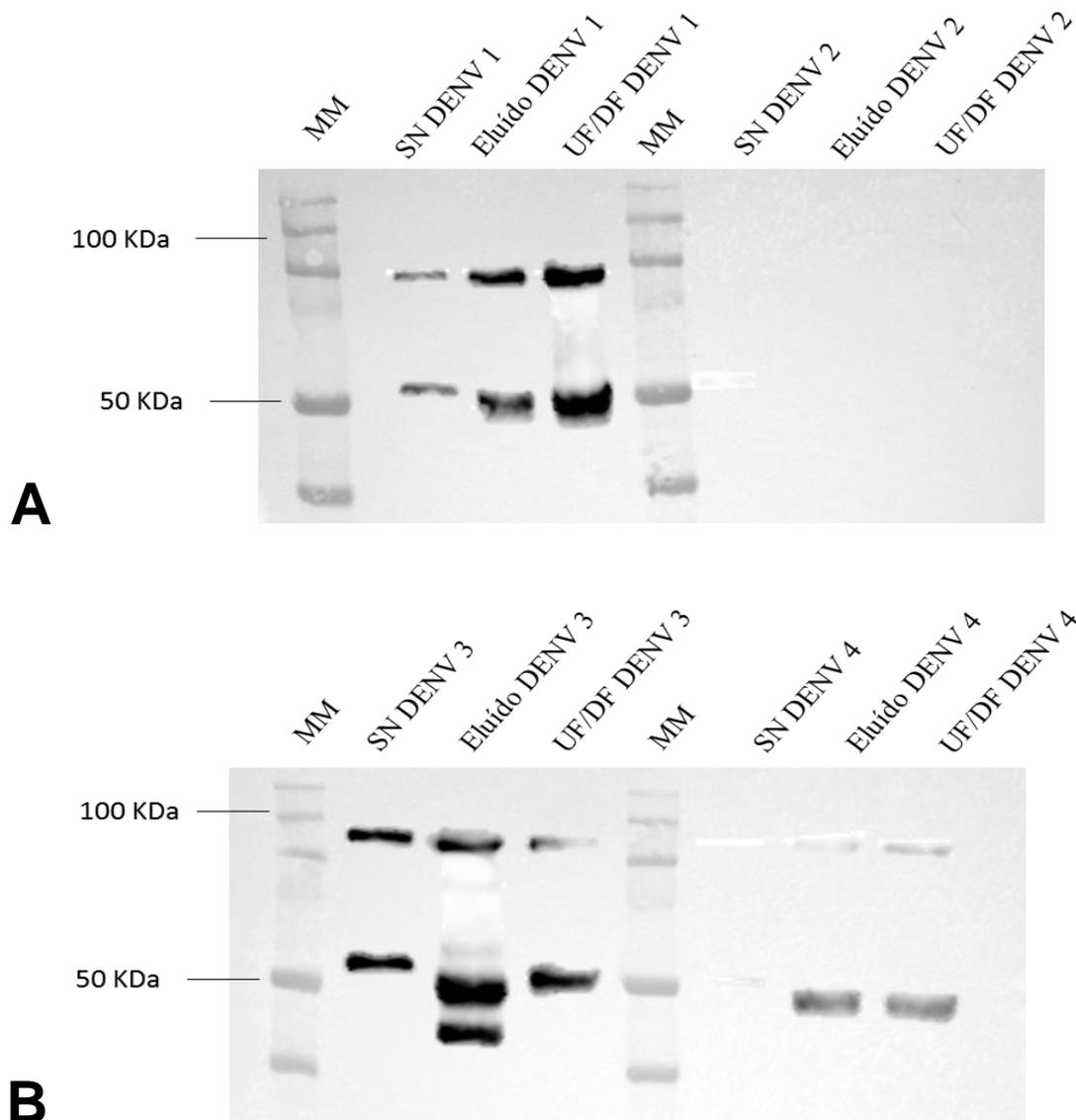
### 5.2.1.1. Avaliação da identidade e da presença de impurezas proteicas por SDS-PAGE e *Western blot*

A pureza e as propriedades antigênicas das VLPs foram avaliadas por SDS-PAGE e *Western blot*. A presença da proteína E de dengue foi confirmada com a massa molecular esperada (50-55 kDa) para as VLPs obtidas por transfecção transiente

conforme observado nas Figuras 21 (SDS-PAGE) e 22 (*Western blot*). Devido à concentração relativamente baixa, a detecção do sinal de proteína E é de difícil identificação nas análises de SDS-PAGE. No entanto, nas análises de *Western blot* bandas claras e específicas de proteína E de dengue foram detectadas, com exceção para DENV2.



**FIGURA 21.** SDS-PAGE das amostras de VLP antes e após purificação. A) DENV1 e DENV2. B) DENV3 e DENV4. Entende-se por MM, marcador de massa molecular, SN sobrenadante de cultivo celular, UF/DF ultrafiltração/diafiltração.



**FIGURA 22.** *Western blot* utilizando anticorpo primário 4G2 de amostras de VLP antes e após purificação. A) DENV1 e DENV2. B) DENV3 e DENV4. Entende-se por MM, marcado de massa molecular, SN sobrenadante, UF/DF ultrafiltração/diafiltração.

Além da banda característica entre 50-55 kDa, uma banda em cerca de 100 kDa também pode ser observada, exceto para DENV2, a qual poderia ser referente a uma forma dimérica da proteína E, como observado por LIMA, *et al.* (2019) para VLPs de zika. Essa banda a 100 kDa também foi observada nos ensaios realizados por METZ, *et al.* (2018b) para os quatro sorotipos do vírus da dengue, porém não foram identificadas. Para DENV3, foram observadas duas bandas em torno de 50 – 55 kDa na amostra purificada (Figura 22). Sugere-se que essas duas bandas estejam relacionadas a diferentes padrões de glicosilação da proteína E. METZ *et al.* (2018b) observaram uma diferença de massa molecular em amostras de VLPs de quatro sorotipos em

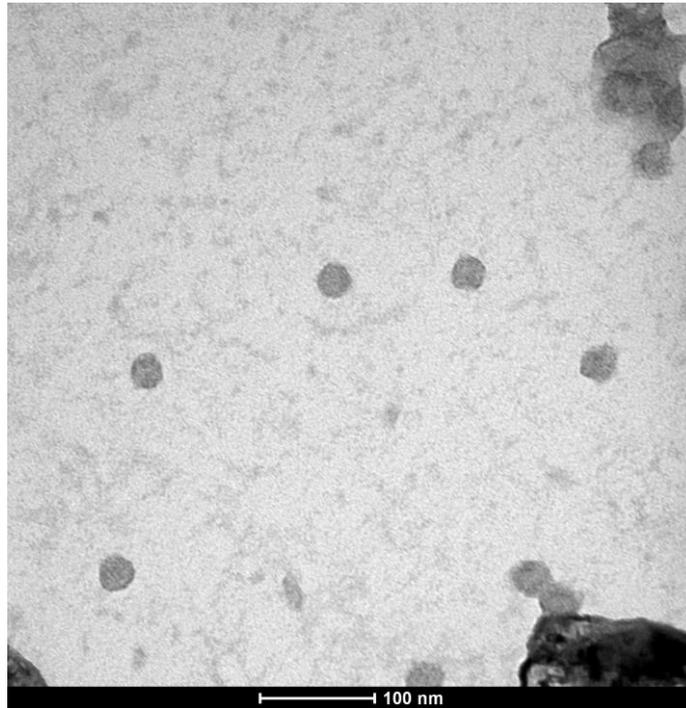
análises de SDS-PAGE e *Western blot* e atribuíram a diferentes números de glicanos entre os sorotipos. ESPINOSA, *et al.* (2018) também observaram diferenças para VLPs de zika produzidas em células HEK 293 e células de insetos, enquanto LIMA *et al.* (2019) observaram para VLPs de febre amarela produzidas em células HEK 293 a presença de duas bandas que, após digestão com a enzima PNGase F para remoção dos glicanos, convergiram para uma única banda.

A análise de *Western blot*, mostrada na Figura 22, confirmou que a proteína E pode ser reconhecida e detectada a partir de amostras purificadas de VLP de DENV1, 3 e 4, usando anticorpo primário pan-flavivírus 4G2. A não detecção de de VLPs de DENV2 provavelmente está relacionada à baixa concentração alcançada no sobrenadante de cultivo celular, que prejudicou o processo de purificação.

### **5.2.1.2. Avaliação da estrutura das VLPs por microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

O vírus da dengue é uma partícula esférica, de superfície relativamente lisa, com uma estrutura de aproximadamente 50 nm de diâmetro, formada pelas proteínas estruturais do capsídeo, pré-membrana e envelope.

A micrografia de MET com coloração negativa de VLPs de DENV1 confirmou a estrutura 3D das mesmas, conforme a Figura 24, porém com aproximadamente 30 nm de diâmetro. VLPs de DENV1-4 produzidas por transfecção transiente em células HEK293 por URAKAMI, *et al.* (2017) apresentaram diâmetro médio entre 35-50 nm e as produzidas por METZ, *et al.* (2018b) apresentaram diâmetro médio entre 25-40 nm, sendo que foi observado que VLPs de DENV1 tinham aproximadamente 30 nm. Portanto, as análises de MET realizadas neste trabalho estão de acordo com a literatura.



**FIGURA 24.** Imagem de MET de VLPs de DENV1/TE purificadas. Barra de escala: 100 nm.

Tanto neste trabalho quanto nos artigos de URAKAMI *et al.* (2017) e METZ *et al.* (2018b), as VLPs se mostraram menores em tamanho do que as partículas virais nativas (~ 50 nm). Estudos estruturais mais aprofundados são necessários para confirmar as diferenças observadas no diâmetro da VLP DENV1 e do vírus DENV1, incluindo avaliação de amostras de vírus purificado do mesmo sorotipo pela mesma metodologia e no mesmo aparelho.

### **5.2.1.3. Avaliação de pureza cromatográfica por SEC-HPLC**

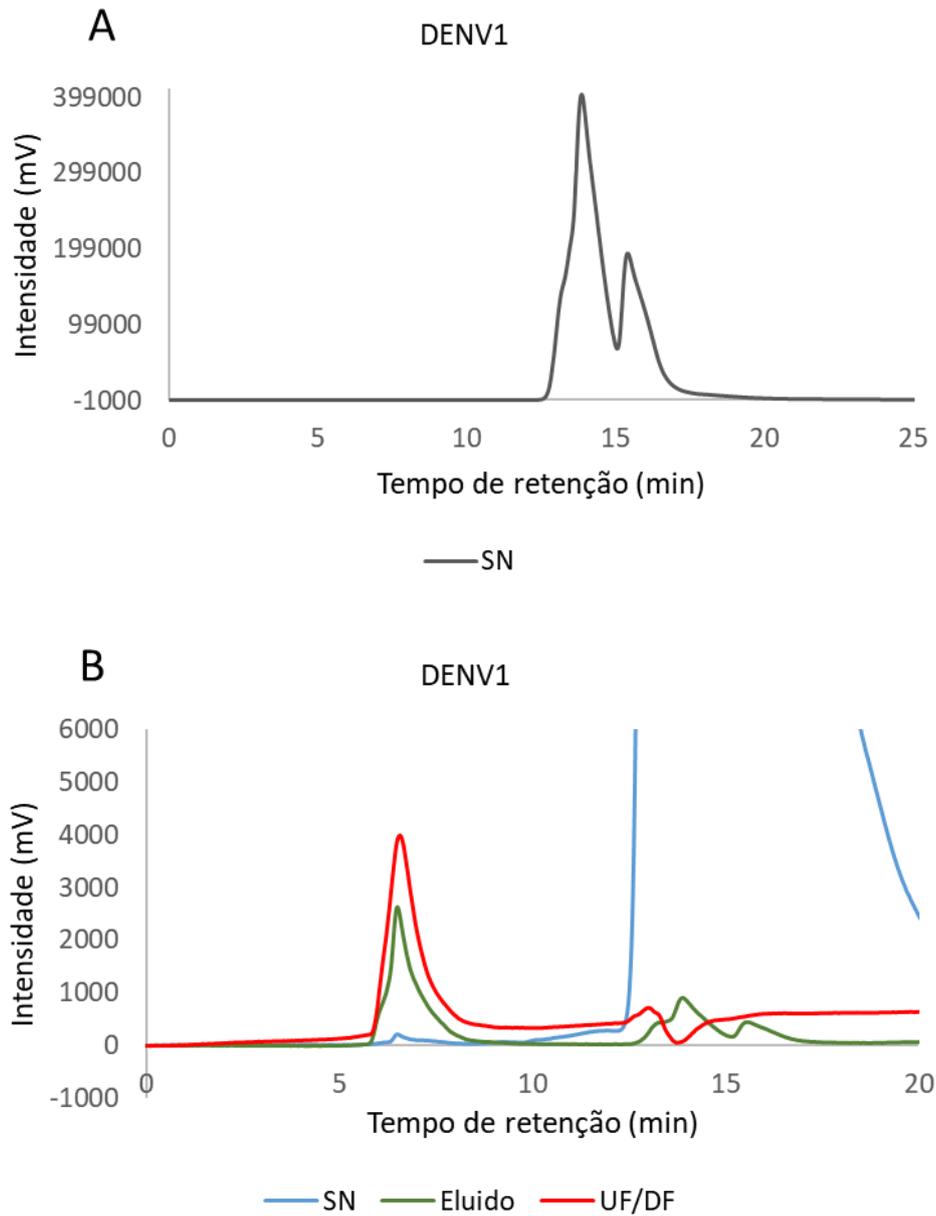
A técnica de SEC-HPLC permite separar proteínas em função de seu tamanho, sendo, portanto, útil para confirmar a presença de VLPs, de proteína E monomérica e de outras eventuais proteínas contaminantes. Através da quantificação relativa da área sob os picos, é possível determinar a pureza cromatográfica do pico de interesse.

Os cromatogramas obtidos para as amostras de VLPs de DENV1-4/TT são apresentados nas Figuras 25-28. Conforme estudos prévios realizados no LECC/PEQ/COPPE/UFRJ para VLPs de outros flavivírus, portanto de tamanho análogo,

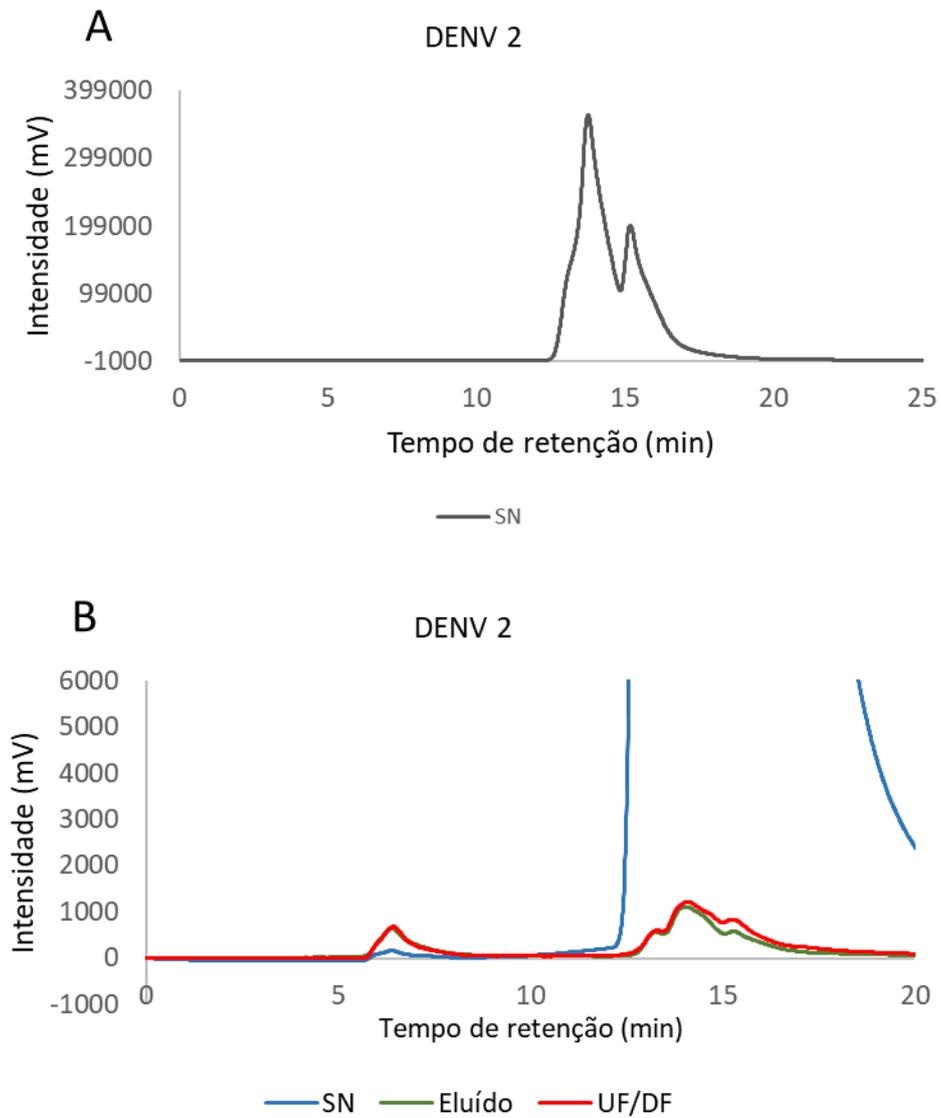
sabe-se que o tempo de retenção das VLPs, é de aproximadamente 7,5 min, enquanto as proteínas monoméricas apresentam tempo de retenção entre 10 e 20 min.

Para os cromatogramas dos sobrenadantes (Figuras 25A-28A), é possível observar que a intensidade dos picos de proteínas monoméricas é muito superior ao de VLPs, exigindo que um *zoom* seja feito no cromatograma para fins de visualização do pico das VLPs. As proteínas monoméricas são contaminantes comuns, podendo ser proteínas da célula hospedeira, proteínas prM ou E que não se incorporaram às VLPs ou VLPs degradadas.

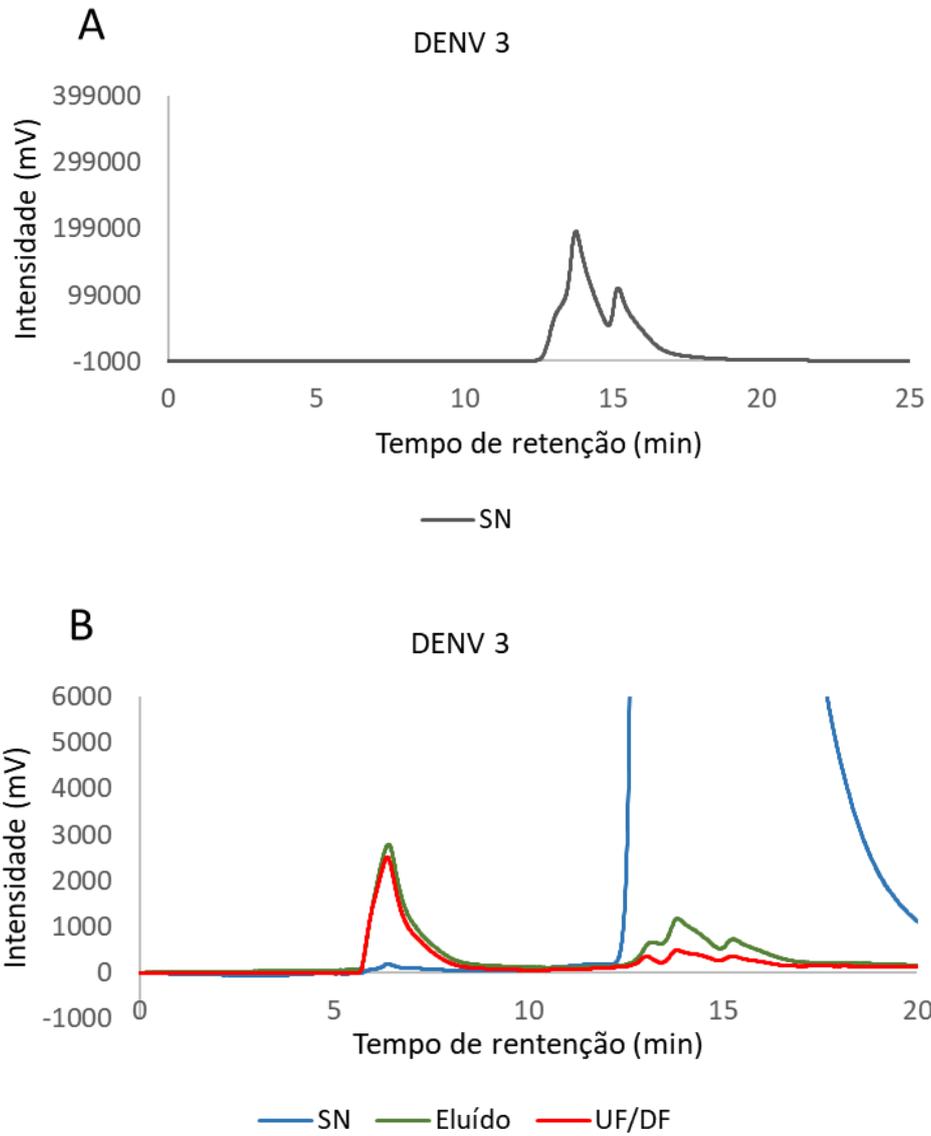
Já nos cromatogramas que representam as análises dos eluídos de SXC e retidos de UF/DF (Figuras 25B-28B), pode-se observar que o processo de purificação foi eficiente na remoção das proteínas monoméricas. No processo de UF/DF, esperava-se que as proteínas monoméricas ainda porventura presentes fossem permeadas pela membrana em todos os sorotipos, mas observou-se que isto ocorreu de forma eficiente apenas para DENV1 e DENV4, onde também ocorreu uma concentração das VLPs. Para DENV2 e DENV3 não foram observadas diferenças significativas entre o eluído de SXC e o retido de UF/DF, indicando que o processo de UF/DF deveria ser investigado mais a fundo.



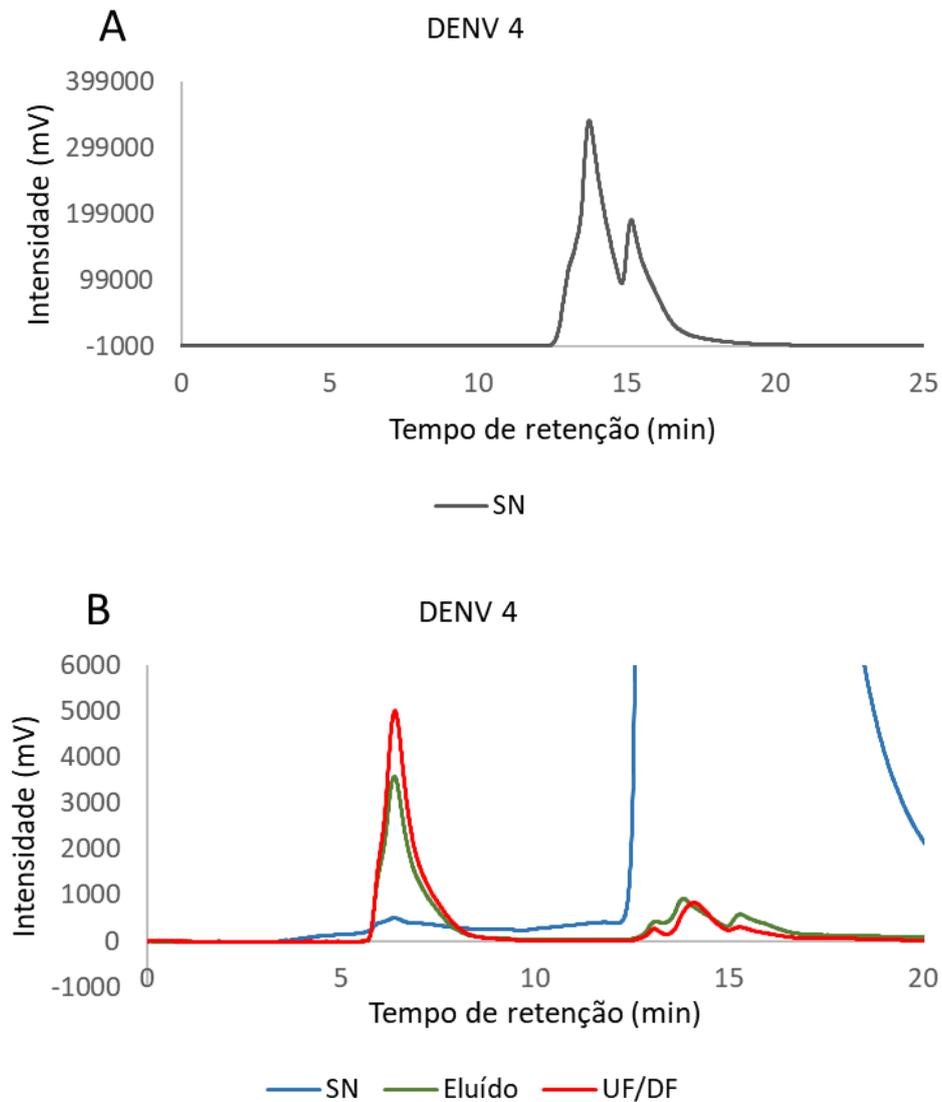
**FIGURA 25.** Cromatogramas obtidos por SEC-HPLC. A) SN de DENV1. B) comparação SN, eluído e retido UF/DF de DENV1.



**FIGURA 26.** Cromatogramas obtidos por SEC-HPLC. A) SN de DENV2. B) comparação SN, eluído e retido UF/DF de DENV2.



**FIGURA 27.** Cromatogramas obtidos por SEC-HPLC. A) SN de DENV3. B) comparação SN, eluído e retido UF/DF de DENV3.



**FIGURA 28.** Cromatogramas obtidos por SEC-HPLC. A) SN de DENV4. B) comparação SN, eluído e retido UF/DF de DENV4.

Utilizando-se VLPs de febre amarela purificadas no LECC/PEQ/COPPE/UFRJ de concentração conhecida, foram injetadas soluções contendo diferentes concentrações conhecidas de VLPs e foi elaborada uma curva padrão relacionado as áreas sob os picos de VLPs e os valores de concentração (ver apêndice – Figura A3). Com base nesta curva padrão, foram calculadas as concentrações de VLPs de DENV1-4 nos retidos de UF/DF, conforme apresentado na Tabela 5.

**TABELA 5.** Concentrações de VLPs de DENV1– 4 no retido de UF/DF, obtidas por SEC-HPLC.

<b>Sorotipo</b>	<b>Volume do retido (mL)</b>	<b>Concentração de VLP (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Massa total de VLP (<math>\mu\text{g}</math>)</b>
DENV 1	1,4	40,8	57,1
DENV 2	6,0	9,4	56,3
DENV 3	2,5	27,8	69,6
DENV 4	2,5	53,3	133,3

#### **5.2.1.4. Quantificação de proteínas totais**

A quantificação de proteínas totais foi realizada para o eluído da purificação e para as amostras do permeado da UF/DF. Através da regressão linear da curva padrão, apresentada no apêndice (Figura A1), foi possível determinar a concentração de proteínas totais nas amostras de DENV1-4 obtidas por transfecção transiente e apresentada na Tabela 4.

Para DENV1, observou-se um aumento da concentração do eluído para o retido, como esperado, pois, a etapa de UF/DF além de concentrar as amostras também eliminaria proteínas monoméricas. Para DENV2 não houve diferença nas concentrações, o que corrobora os dados obtidos por HPLC, apresentados na seção 5.2.1.3, onde a etapa de UF/DF não concentrou as VLPs e nem eliminou proteínas monoméricas. Para DENV3 houve uma diminuição da concentração, validando também os resultados de HPLC, a etapa de UF/DF não concentrou a amostra, porém eliminou um pouco de proteína monomérica, o que poderia explicar a diminuição na concentração de proteínas totais. Para DENV4 também observou-se uma diminuição da concentração, o que não corrobora com os resultados obtidos por HPLC, onde a amostra foi retida apresenta maior concentração de proteínas totais.

**TABELA 4.** Concentração de proteínas totais determinada nos eluídos de SXC e concentrados de UF/DF, das amostras de VLPs de DENV 1-4.

<b>Amostra</b>	<b>Volume (mL)</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>Massa de proteínas totais (µg)</b>
Eluído DENV1	4,5	35,9	161,5
Retido DENV1	1,4	51,6	72,24
Eluído DENV2	10,0	35,1	351,0
Retido DENV2	6,0	37,9	227,4
Eluído DENV3	3,8	41,6	157,2
Retido DENV3	2,5	31,6	79,0
Eluído DENV4	4,9	37,6	185,74
Retido DENV4	2,5	28,7	71,8

A quantificação de proteínas totais por BCA é um teste sensível, porém não é seletivo para VLPs, uma vez que esse método se baseia na redução de íons cobre quelados com proteínas, ou seja, todos os peptídeos contendo três ou mais resíduos de aminoácidos são quantificados.

### 5.2.1.5. Avaliação da presença de DNA residual como contaminante crítico derivado do processo

O DNA residual é considerado um contaminante crítico em produtos biofarmacêuticos. Portanto, nos processos de purificação, sua concentração deve ser reduzida aos níveis preconizados como seguros pelas agências reguladoras. No caso da Organização Mundial da Saúde (OMS), é preconizado que o nível de DNA residual seja menor ou igual a 10 ng/dose.

Através dos resultados apresentados na Tabela 6, é possível observar que obteve-se eficiência de remoção de DNA residual entre 88% e 94% para as amostras de DENV1-4 obtidas por transfeção transiente. Contudo, para avaliar se a concentração de DNA residual está dentro da faixa aceitável pelas agências regulatórias, será necessário primeiro determinar, por meio de ensaios em animais, a provável dose de VLPs que seria necessária para que se possa calcular a quantidade de DNA residual em ng/dose.

**TABELA 6.** Dados para a determinação da eficiência de remoção de DNA residual.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração de DNA (ng/mL)</b>	<b>Volume de amostra (mL)</b>	<b>Massa total de DNA (ng)</b>	<b>Eficiência de remoção (%)</b>
SN DENV1	117,4	170,0	19955,8	-
Eluído DENV1	505,2	4,5	2288,6	88,5
SN DENV2	103,5	280,0	28990,1	-
Eluído DENV2	177,9	10	1778,9	93,9
SN DENV3	193,3	120,0	23201,6	-
Eluído DENV3	741,2	3,78	2801,6	87,9
SN DENV4	133,9	270,0	36165,8	-
Eluído DENV4	744,8	4,94	3679,5	89,8

O conjunto de resultados apresentado, decorrente do conjunto de técnicas analíticas utilizado, indicou que a SXC sozinha não é suficiente para remover todos os contaminantes críticos e atingir o nível de pureza exigido para o uso das VLPs em vacinas. Além disso, conforme a literatura, o PEG poderia gerar instabilidade nas VLPs e resquícios que fiquem nas amostras poderiam ser nocivos aos usuários finais (HUHTI, *et al.* 2010, RUSSELL, *et al.* 2007). Por isto, decidiu-se investigar um processo composto por três etapas, sendo duas técnicas cromatográficas (troca iônica e exclusão estérica) e ultrafiltração/diafiltração.

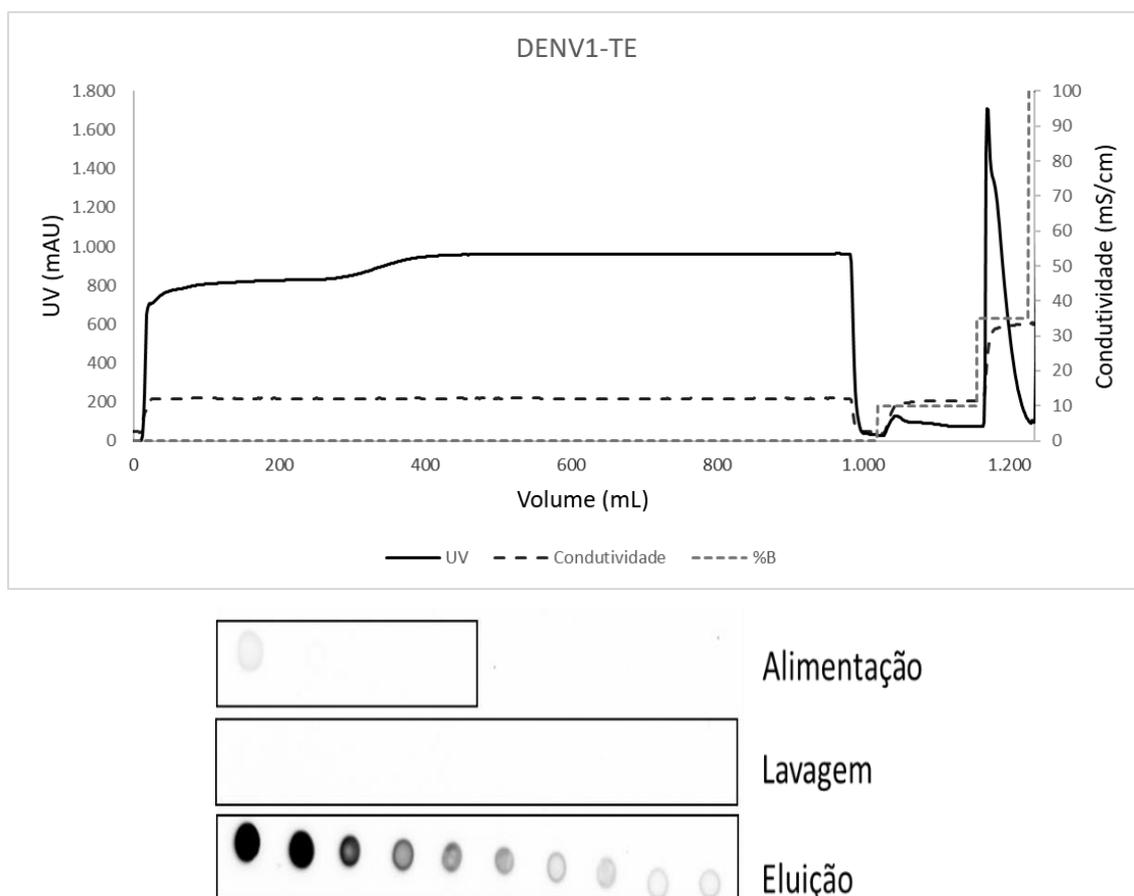
### **5.2.2. Investigação de um processo baseado em cromatografias de troca iônica e exclusão estérica e ultrafiltração/diafiltração**

Devido ao fato de que os sobrenadantes de cultivo celular de alguns sorotipos apresentam concentrações baixas de VLPs e devido ao fato de que SXC é reportada como uma metodologia adequada também à purificação de DNA, decidiu-se introduzir uma etapa de captura inicial baseada em troca aniônica, visto que, como mostrado para vírus da febre amarela por Pato *et al.* (2014, 2019) e para VLPs de zika e febre amarela por Lima *et al.* (2019), é possível concentrar as VLPs e reduzir de forma significativa os níveis de DNA residual utilizando membranas de troca aniônica contendo o ligante Q.

Por esta razão, passou-se a investigar o processo de purificação de VLPs obtidas por transfecção estável de DENV1 em duas etapas cromatográficas. A primeira etapa foi realizada por IEX com 3 membranas de troca aniônica com ligante Q, conectadas em série, operadas no modo bind-elute, onde as VLPs se ligam à membrana e os contaminantes de carga positiva são facilmente removidos durante o processo de alimentação. Para a eluição das VLPs é utilizado um aumento gradativo da concentração salina para propiciar a dessorção sequencial das moléculas carregadas negativamente no pH de alimentação, permitindo a separação das VLPs de outras moléculas (DNA e proteínas contaminantes). O tampão PBS foi utilizado por ser um tampão fisiológico, evitando a necessidade de troca para a etapa subsequente.

Frações de 2 mL foram recolhidas de todas as etapas e analisadas quanto à presença de VLPs. A fração eluída foi recolhida em seu volume total e armazenada para a próxima etapa cromatográfica. O cromatograma obtido, bem como as análises por

*immunoblot*, são apresentados na Figura 29. Nas frações de lavagem não foi detectado sinal de VLPs, enquanto nas frações eluídas foi detectado forte sinal, refletindo a capacidade da técnica de IEX de concentrar as VLPs.

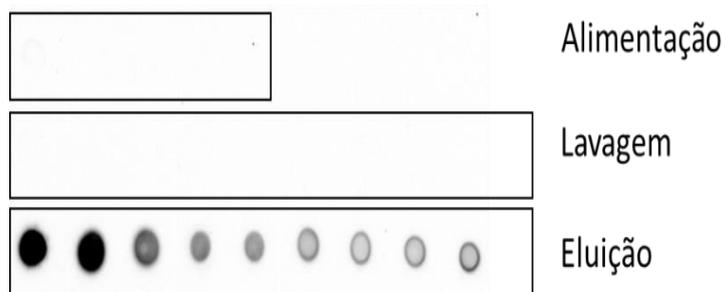
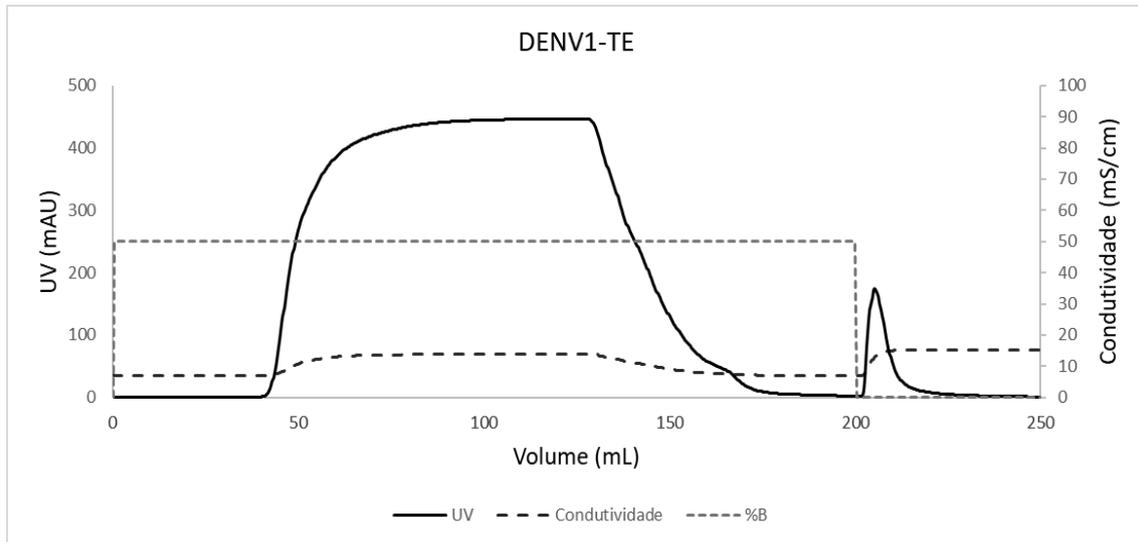


**FIGURA 29.** Cromatograma do processo purificação por IEX utilizando membrana de troca aniônica e *Immunoblot* utilizando anticorpo primário 4G2 das frações da cromatografia.

Como segunda etapa do processo de purificação, investigou-se o emprego de SXC, visto que a etapa anterior já teve como objetivo a remoção de DNA residual. Frações de 2 mL foram recolhidas de todas as etapas e analisadas quanto à presença de VLPs. A fração eluída foi recolhida em seu volume total e armazenada para a etapa subsequente de UF/DF. O cromatograma obtido bem como as análises por *immunoblot* são apresentados na Figura 30. Nas frações de alimentação e lavagem não foram observados sinais de VLPs por *Immunoblot*, indicando baixa perda de VLPs. O forte sinal detectado nas frações eluídas confirmou o potencial da técnica de SXC,

potencializado pelo uso de uma etapa anterior que permite concentrar as VLPs e remover contaminantes como DNA residual.

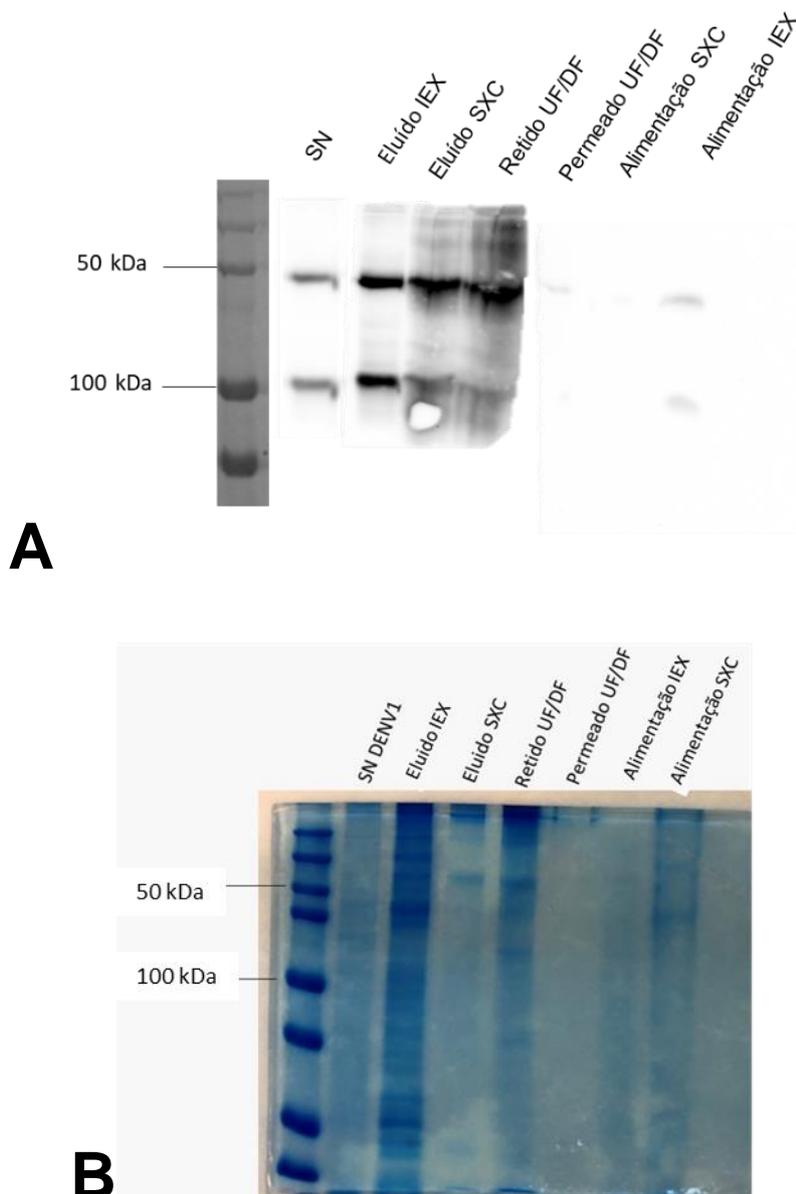
Em um artigo voltado para a purificação de VLPs de outro tipo de vírus (norovírus), um processo iniciando com precipitação com PEG seguida de IEX resultou na obtenção de VLPs com alta pureza (> 95%) (KOHO, *et al.* 2012).



**FIGURA 30.** Cromatograma do processo purificação por SXC utilizando membrana de troca aniônica e *Immunoblot* utilizando anticorpo primário 4G2 das frações da cromatografia.

### 5.2.2.1. Avaliação da identidade e da presença de impurezas proteicas por SDS-PAGE e *Western blot*

Conforme mostrado na Figura 31, e como observado anteriormente para as VLPs obtidas por transfecção transiente, a presença da proteína E de dengue foi confirmada com a massa molecular esperada, bem como a banda em cerca de 100 kDa.



**FIGURA 31.** *Western blot* (A) e SDS-PAGE (B) de amostras de VLP antes e após purificação para VLPs DENV1/TE. Entende-se por MM, marcado de massa molecular, SN sobrenadante, UF/DF ultrafiltração/diafiltração.

Além disso, na Figura 31 é possível observar a concentração da proteína E e a diminuição das impurezas ao longo das etapas de purificação. O arraste observado nos eluídos (IEX e SXC) e retido de UF/DF pode ser atribuído à alta concentração de proteína E nessas amostras.

A análise de *Western blot* (Figura 31A) confirmou que a proteína E pode ser reconhecida e detectada a partir de amostras purificadas de VLP de DENV1/TE usando anticorpo primário 4G2.

### 5.2.2.2. Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais foi realizada para o eluído da purificação e para as amostras do retido e do permeado da UF/DF. Através da regressão linear da curva padrão, apresentada no apêndice (Figura A2), foi possível determinar a concentração de proteínas totais nas amostras de DENV1-TE obtidas por transfecção estável, conforme apresentado na Tabela 7.

A massa de proteínas totais caiu de forma significativa da fração eluída de IEX para a fração eluída de SXC, confirmando que a SXC possui alto potencial de purificação, eliminando proteínas monoméricas (proteínas derivadas da célula hospedeira ou proteínas prM e E que não formaram VLPs) eventualmente ainda presentes após a etapa de IEX. Observou-se um aumento da concentração do eluído da SXC para o retido de UF/DF, o que pode ser atribuído à capacidade da etapa de UF/DF de concentrar as VLPs. Proteínas monoméricas restantes seriam eliminadas no permeado de UF/DF, porém após duas etapas cromatográficas a presença de proteínas monoméricas contaminantes é bastante reduzida.

Não foi possível quantificar as proteínas presentes no SN e na fração de alimentação do IEX, pois a alta concentração de proteínas ultrapassou o limite de detecção da técnica, as amostras deveriam ter sido diluídas.

O processo permitiu uma remoção global de proteínas totais de 95,8%, da primeira para a última etapa de purificação, para DENV1, mostrando-se um processo promissor e eficiente para remoção de contaminantes. Contudo, ressalta-se que a quantificação de proteínas totais por BCA é um teste sensível, porém não é seletivo para VLPs, uma vez que esse método se baseia na redução de íons cobre quelados com proteínas, ou seja, todos os peptídeos contendo três ou mais resíduos de aminoácidos serão

quantificados. E necessário o desenvolvimento de um ensaio quantitativo de ELISA para detectar de forma específica as VLPs.

**TABELA 7.** Concentração de proteínas totais determinada nas frações de SN, alimentação, eluídos de IEX e SXC, concentrados de UF/DF e permeado UF/DF, das amostras de VLPs de DENV 1/TE.

<b>Amostra</b>	<b>Volume da fração (mL)</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Massa de proteínas totais (mg)</b>
SN DENV1	1000	-	-
Alimentação IEX	2	-	-
Eluído IEX	50	573,6	28,70
Alimentação SXC	2	199,3	0,39
Eluído SXC	15	173,9	2,60
Retido UF/DF	2	597,8	1,20
Permeado UF/DF	15	15,8	0,24

## **6. Conclusões e Sugestões**

### **6.1. Conclusões**

Os vetores plasmidiais construídos foram produzidos e purificados de forma eficiente, sendo possível a produção de VLPs DENV1-4 de maneira transiente.

A cinética de produção de VLP DENV1/TE em biorreator demonstrou que os transfectomas possuem um tempo de duplicação de aproximadamente 35h, que o shift metabólico ocorre e permite a sobrevivência das células até o 10º dia de cultivo e que a concentração de VLPs alcança seu máximo nos dias 7º e 8º dias de corrida. Entretanto, estudos mais aprofundados e utilizando outros modos de operação são necessários para melhor avaliação.

O processo de purificação se mostrou uma técnica promissora para purificar VLPs DENV1-4. Porém, é necessário que seja utilizado mais técnicas para avaliar se o grau de pureza alcançado está dentro do preconizado pelas agências regulatórias. Além do desenvolvimento de uma análise quantitativa por ELISA.

Pelo MET foi possível confirmar a produção e purificação de VLPs DENV1 de maneira eficiente.

Compreender a estrutura das VLPs é essencial para definir seu potencial uso tanto como vacinas como reagente de diagnóstico, portanto faz-se necessário mais estudos para confirmação do potencial de uso dessas VLPs, bem como para aprimoramento do processo sugerido nesse trabalho.

### **6.2. Sugestões**

Para trabalhos futuros, sugerem-se os seguintes pontos para o aperfeiçoamento e continuação dessa linha de pesquisa:

- Obter populações estáveis para todos os sorotipos.
- Realizar a seleção de clones mais produtores das populações para todos os sorotipos por citometria de fluxo acoplada a sorter (FACS).
- Cultivar as populações em perfusão em biorreator de tanque agitado para verificar a expressão de VLPs sob altas concentrações celulares. E avaliar a

influência de outros dispositivos de retenção celular, aeração e agitação.

- Avaliar se o processo de purificação é eficiente para alcançar os níveis de pureza exigidos pelas agências regulatórias.
- Quantificar e caracterizar as VLPs com técnicas com especificidade para essas partículas.
- Realizar testes de imunogenicidade e antigenidades das partículas para confirmar o possível uso em vacinas ou testes diagnóstico.

## Referências Bibliográficas

- ADIKARI, T. N., GOMES, L., WICKRAMASINGHE, N., *et al.* "Dengue NS1 antigen contributes to disease severity by inducing interleukin (IL)-10 by monocytes", **Clinical and Experimental Immunology**, v. 184, n. 1, p. 90–100, 2016. DOI: 10.1111/cei.12747.
- AGUIAR, M., STOLLENWERK, N. "Dengvaxia: age as surrogate for serostatus", **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 245, 2018. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30752-1.
- AGUIAR, M., STOLLENWERK, N., HALSTEAD, S. B. "The risks behind Dengvaxia recommendation", **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 8, p. 882–883, 2016. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30168-2.
- ALTAMIRANO, C., BERRIOS, J., VERGARA, M., *et al.* "Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production", **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 3, 2013. DOI: 10.2225/vol16-issue3-fulltext-2.
- ALVIM, R. G. F., ITABAIANA, I., CASTILHO, L. R. "Zika virus-like particles (VLPs): Stable cell lines and continuous perfusion processes as a new potential vaccine manufacturing platform", **Vaccine**, v. 37, n. 47, p. 6970–6977, 2019. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.05.064.
- ALVIM, R. G. F., LIMA, T. M., SILVA, J. L. OLIVEIRA, G. A. P., CASTILHO, L. R. "Process intensification for the production of yellow fever virus-like particles as potential recombinant vaccine antigen", **Vaccine**, v. 118, n. 9, p. 3581-3592, 2021. DOI: 10.1002/bit.27864
- ARORA, U., TYAGI, P., SWAMINATHAN, S., *et al.* "Virus-like particles displaying envelope domain III of dengue virus type 2 induce virus-specific antibody response in mice", **Vaccine**, v. 31, n. 6, p. 873–878, 2013. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.12.016.
- AUNIŃŠ, J. G., "Viral Vaccine Production in Cell Culture". **Encyclopedia of Industrial Biotechnology**, Hoboken, NJ, USA, John Wiley & Sons, Inc., 2010. p. 1–35. DOI: 10.1002/9780470054581.eib582.

AUSTRALIAN GOVERNMENT DEPARTMENT OF HEALTH. **Immunisation**. [S.d.]. Disponível em: [https://www.health.gov.au/health-topics/immunisation?utm\\_source=immunise\\_australia\\_program&utm\\_medium=redirect&utm\\_campaign=digital\\_transformation#2-2-5](https://www.health.gov.au/health-topics/immunisation?utm_source=immunise_australia_program&utm_medium=redirect&utm_campaign=digital_transformation#2-2-5). Acesso em: 31 jul. 2019.

BAHADIR, O., "Ion-Exchange Chromatography and Its Applications". **Column Chromatography**, [S.l.], InTech, 2013. DOI: 10.5772/55744.

BAKSHIZADEH GASHTI, A., CHAHAL, P. S., GAILLET, B., *et al.* "Purification of recombinant vesicular stomatitis virus-based HIV vaccine candidate", **Vaccine**, v. 41, n. 13, p. 2198–2207, 2023. DOI: 10.1016/j.vaccine.2023.02.058.

BARRETO, M. L., TEIXEIRA, M. G. "Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa", **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p. 53, 2008. DOI: 10.1590/S0103-40142008000300005.

BAXTER, D. "Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing", **Occupational Medicine**, v. 57, n. 8, p. 552–556, 2007. DOI: 10.1093/occmed/kqm110.

BHATT, S., GETHING, P. W., BRADY, O. J., *et al.* "The global distribution and burden of dengue", **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013. DOI: 10.1038/nature12060.

BIOSCIENCES, A. K., "Ion Exchange Chromatography e Chromatofocusing – Chapter 2 – Ion exchange in practice", **Handbooks from Amersham Biosciences**. v. 11-0004-21, 2004.

BISWAL, S., BORJA-TABORA, C., MARTINEZ VARGAS, L., *et al.* "Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in healthy children aged 4–16 years: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial", **The Lancet**, v. 395, n. 10234, p. 1423–1433, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30414-1.

BRADY, O. J., GETHING, P. W., BHATT, S., *et al.* "Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus", **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, p. e1760, 2012. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001760.

- BRIGGS, C. M., SMITH, K. M., PIPER, A., *et al.* "Live Attenuated Tetravalent Dengue Virus Host Range Vaccine Is Immunogenic in African Green Monkeys following a Single Vaccination", **Journal of Virology**, v. 88, n. 12, p. 6729–6742, 2014. DOI: 10.1128/JVI.00541-14.
- BRUNE, K. D., LENEGHAN, D. B., BRIAN, I. J., *et al.* "Plug-and-Display: decoration of Virus-Like Particles via isopeptide bonds for modular immunization", **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 19234, 2016. DOI: 10.1038/srep19234.
- BUFFIN, S., PEUBEZ, I., BARRIÈRE, F., *et al.* "Influenza A and B virus-like particles produced in mammalian cells are highly immunogenic and induce functional antibodies", **Vaccine**, v. 37, n. 46, p. 6857–6867, 2019. DOI: 10.1016/J.VACCINE.2019.09.057.
- BURCHAM, C. L., FLORENCE, A. J., JOHNSON, M. D. "Continuous Manufacturing in Pharmaceutical Process Development and Manufacturing", **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 9, n. 1, p. 253–281, 2018. DOI: 10.1146/annurev-chembioeng-060817-084355.
- BÜSSOW, K. "Stable mammalian producer cell lines for structural biology", **Current Opinion in Structural Biology**, v. 32, p. 81–90, 2015. DOI: 10.1016/j.sbi.2015.03.002.
- CARSON, S., MILLER, H. B., WITHEROW, D. S., *et al.* "Transient Transfection of Mammalian Cells". **Molecular Biology Techniques**, [S.l.], Elsevier, 2019. p. 143–153. DOI: 10.1016/B978-0-12-815774-9.00019-8.
- CASTILHO, L. R., "Continuous Animal Cell Perfusion Processes: The First Step Toward Integrated Continuous Biomanufacturing". **Continuous Processing in Pharmaceutical Manufacturing**, 2014. p. 115–154. DOI: 10.1002/9783527673681.ch06.
- CASTILHO, L. R., MATTOS, N. R., ABREU, W. S., *et al.* "Virus-like Particles (VLPs) as Important Tools for Flavivirus Vaccine Development", **Biologics**, v. 2, n. 4, p. 226–242, 2022. DOI: 10.3390/biologics2040018.
- CHEW, M.-F., POH, K.-S., POH, C.-L. "Peptides as Therapeutic Agents for Dengue Virus", **International Journal of Medical Sciences**, v. 14, n. 13, p. 1342–1359, 2017. DOI: 10.7150/ijms.21875.

- COLLER, B.-A. G., CLEMENTS, D. E., BETT, A. J., *et al.* "The development of recombinant subunit envelope-based vaccines to protect against dengue virus induced disease", **Vaccine**, v. 29, n. 42, p. 7267–7275, 2011. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.07.021.
- DANKO, J. R., KOCHER, T., TENEZA-MORA, N., *et al.* "Safety and Immunogenicity of a Tetravalent Dengue DNA Vaccine Administered with a Cationic Lipid-Based Adjuvant in a Phase 1 Clinical Trial", **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 3, p. 849–856, 2018. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0416.
- DE LA GUARDIA, C., LLEONART, R. "Progress in the Identification of Dengue Virus Entry/Fusion Inhibitors", **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–13, 2014. DOI: 10.1155/2014/825039.
- DENG, S.-Q., YANG, X., WEI, Y., *et al.* "A Review on Dengue Vaccine Development", **Vaccines**, v. 8, n. 1, p. 63, 2020. DOI: 10.3390/vaccines8010063.
- DINIZ, M. de O., FERREIRA, L. C. de S. "Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas", **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 19–30, 2010. DOI: 10.1590/S0103-40142010000300003.
- EAGLE, H. "Amino acid metabolism in mammalian cell cultures.", **Science (New York, N.Y.)**, v. 130, n. 3373, p. 432–7, 1959. DOI: 10.1126/science.130.3373.432.
- EILTS, F., STEGER, M., PAGALLIES, F., *et al.* "Comparison of sample preparation techniques for the physicochemical characterization of Orf virus particles", **Journal of Virological Methods**, v. 310, p. 114614, 2022. DOI: 10.1016/j.jviromet.2022.114614.
- ESPINOSA, D., MENDY, J., MANAYANI, D., *et al.* "Passive Transfer of Immune Sera Induced by a Zika Virus-Like Particle Vaccine Protects AG129 Mice Against Lethal Zika Virus Challenge", **EBioMedicine**, v. 27, p. 61–70, 2018. DOI: 10.1016/J.EBIOM.2017.12.010.
- ESPÓSITO, D. L. A., NGUYEN, J. B., DEWITT, D. C., RHOADES, E., MODIS, Y. "Physico-chemical requirements and kinetics of membrane fusion of flavivirus-like particles", *Journal of General virology*, v. 96, n. 7, p. 1702-1711, 2015. DOI: 10.1099/vir.0.000113.

- FAHIMI, H., MOHAMMADIPOUR, M., HADDAD KASHANI, H., *et al.* "Dengue viruses and promising envelope protein domain III-based vaccines", **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 7, p. 2977–2996, 2018. DOI: 10.1007/s00253-018-8822-y.
- FEKETE, S., BECK, A., VEUTHEY, J.-L., *et al.* "Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals", **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113, p. 43–55, 2015. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.02.037.
- FIGUEREDO-CARDERO, A., MARTÍNEZ, E., CHICO, E., *et al.* "Rotating cylindrical filters used in perfusion cultures: CFD simulations and experiments", **Biotechnology Progress**, v. 30, n. 5, p. 1093–1102, 2014. DOI: 10.1002/btpr.1945.
- FISCHER, L. M., WOLFF, M. W., REICHL, U. "Purification of cell culture-derived influenza A virus via continuous anion exchange chromatography on monoliths", **Vaccine**, v. 36, n. 22, p. 3153–3160, 2018. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.06.086.
- FRIETZE, K. M., PEABODY, D. S., CHACKERIAN, B. "Engineering virus-like particles as vaccine platforms", **Current Opinion in Virology**, v. 18, p. 44–49, 2016. DOI: 10.1016/j.coviro.2016.03.001.
- FUENMAYOR, J., GÒDIA, F., CERVERA, L. "Production of virus-like particles for vaccines", **New Biotechnology**, v. 39, p. 174–180, 2017. DOI: 10.1016/j.nbt.2017.07.010.
- FUENMAYOR, Javier, CERVERA, L., GÒDIA, F., *et al.* "Extended gene expression for Gag VLP production achieved at bioreactor scale", **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 94, n. 1, p. 302–308, 2019. DOI: 10.1002/jctb.5777.
- FUENMAYOR, Javier, CERVERA, L., GUTIÉRREZ-GRANADOS, S., *et al.* "Transient gene expression optimization and expression vector comparison to improve HIV-1 VLP production in HEK293 cell lines", **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 1, p. 165–174, 2018. DOI: 10.1007/s00253-017-8605-x.

- GAGNON, P., GODFREY, B., LADD, D. "Method for obtaining unique selectivities in ion-exchange chromatography by addition of organic polymers to the mobile phase", **Journal of Chromatography A**, v. 743, n. 1, p. 51–55, 1996. DOI: 10.1016/0021-9673(96)00125-2.
- GARÇON, N., FRIEDE, M. "Evolution of Adjuvants Across the Centuries", **Plotkin's Vaccines**, p. 61- 74.e4, 1 jan. 2018. DOI: 10.1016/B978-0-323-35761-6.00006-7.
- GOMEZ, P. L., ROBINSON, J. M., "Vaccine Manufacturing". **Plotkin's Vaccines**, [S.I.], Elsevier, 2018. p. 51-60. DOI: 10.1016/B978-0-323-35761-6.00005-5.
- GRGACIC, E. V. L., ANDERSON, D. A. "Virus-like particles: Passport to immune recognition", **Methods**, v. 40, n. 1, p. 60–65, 2006. DOI: 10.1016/j.ymeth.2006.07.018.
- GUY, B., NORIEGA, F., OCHIAI, R. L., *et al.* "A recombinant live attenuated tetravalent vaccine for the prevention of dengue", **Expert Review of Vaccines**, v. 16, n. 7, p. 671–684, 2017. DOI: 10.1080/14760584.2017.1335201.
- HAGEL, L., JAGSCHIES, G., SOFER, G., *et al.* "Basic Properties of Peptides, Proteins, Nucleic Acids and Virus Particles", **Handbook of Process Chromatography**, p. 219–235, 2008a. DOI: 10.1016/B978-012374023-6.50011-7.
- HAGEL, L., JAGSCHIES, G., SOFER, G., *et al.* "Process Capability and Production Scenarios", **Handbook of Process Chromatography**, p. 23–39, 2008b. DOI: 10.1016/b978-012374023-6.50004-x.
- HANSSON, M., NYGREN, P.-Å., STÅHL, S. "Design and production of recombinant subunit vaccines", **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 95, 2000. DOI: 10.1042/BA20000034.
- HAYMAN, B., KUMAR SURI, R., DOWNHAM, M. "Sustainable vaccine manufacturing in low- and middle-Income countries", **Vaccine**, v. 40, n. 50, p. 7288–7304, 2022. DOI: 10.1016/j.vaccine.2022.10.044.
- HENCHAL, E. A., PUTNAK, J. R. "The dengue viruses", **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 4, p. 376–396, 1990. DOI: 10.1128/CMR.3.4.376.

- HENRY, O., DUROCHER, Y. "Engineering of the Human Cell Line HEK-293 to Enhance Recombinant Protein Production", **IFAC Proceedings Volumes**, v. 43, n. 6, p. 473–478, 2010. DOI: 10.3182/20100707-3-BE-2012.0110.
- HOU, Y., CHEN, M., BIAN, Y., *et al.* "Advanced subunit vaccine delivery technologies: from vaccine cascade obstacles to design strategies", **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 2023. DOI: 10.1016/j.apsb.2023.01.006
- HSIEH, S.-C., LIU, I.-J., KING, C.-C., *et al.* "A strong endoplasmic reticulum retention signal in the stem–anchor region of envelope glycoprotein of dengue virus type 2 affects the production of virus-like particles", **Virology**, v. 374, n. 2, p. 338–350, 2008. DOI: 10.1016/j.virol.2007.12.041.
- HUGHSON, M. D., CRUZ, T. A., CARVALHO, R. J., *et al.* "Development of a 3-step straight-through purification strategy combining membrane adsorbers and resins", **Biotechnology Progress**, v. 33, n. 4, p. 931–940, 2017. DOI: 10.1002/btpr.2501.
- HUHTI, L., BLAZEVIC, V., NURMINEN, K., *et al.* "A comparison of methods for purification and concentration of norovirus GII-4 capsid virus-like particles", **Archives of Virology**, v. 155, n. 11, p. 1855–1858, 2010. DOI: 10.1007/S00705-010-0768-Z/FIGURES/3.
- IYER, G., RAMASWAMY, S., ASHER, D., *et al.* "Reduced surface area chromatography for flow-through purification of viruses and virus like particles", **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 26, p. 3973–3981, 2011. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.04.086.
- JOHNSON, A. J., ROEHRIG, J. T. "New Mouse Model for Dengue Virus Vaccine Testing", **Journal of Virology**, v. 73, n. 1, p. 783–786, 1999. DOI: 10.1128/JVI.73.1.783-786.1999.
- JUNGBAUER, A., HAHN, R., "Chapter 22 Ion-Exchange Chromatography". **Methods in Enzymology**, [S.I.], Academic Press Inc., 2009. v. 463. p. 349–371. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)63022-6.
- KALBFUSS, B., WOLFF, M., GEISLER, L., *et al.* "Direct capture of influenza A virus from cell culture supernatant with Sartobind anion-exchange membrane adsorbers", **Journal of Membrane Science**, v. 299, n. 1–2, p. 251–260, 2007. DOI: 10.1016/j.memsci.2007.04.048.

- KALBFUSS, B., WOLFF, M., MORENWEISER, R., *et al.* "Purification of cell culture-derived human influenza A virus by size-exclusion and anion-exchange chromatography", **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 5, p. 932–944, 2007. DOI: 10.1002/bit.21109.
- KALLAS, E. G., PRECIOSO, A. R., PALACIOS, R., *et al.* "Safety and immunogenicity of the tetravalent, live-attenuated dengue vaccine Butantan-DV in adults in Brazil: a two-step, double-blind, randomised placebo-controlled phase 2 trial", **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 7, p. 839–850, 2020. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30023-2.
- KARST, D. J., SERRA, E., VILLIGER, T. K., *et al.* "Characterization and comparison of ATF and TFF in stirred bioreactors for continuous mammalian cell culture processes", **Biochemical Engineering Journal**, v. 110, p. 17–26, 2016. DOI: 10.1016/j.bej.2016.02.003.
- KAUTNER, I., ROBINSON, M. J., KUHNLE, U. "Dengue virus infection: Epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and prevention", **The Journal of Pediatrics**, v. 131, n. 4, p. 516–524, 1997. DOI: 10.1016/S0022-3476(97)70054-4.
- KEELAPANG, P., NITATPATTANA, N., SUPHATRAKUL, A., *et al.* "Generation and preclinical evaluation of a DENV-1/2 prM + E chimeric live attenuated vaccine candidate with enhanced prM cleavage", **Vaccine**, v. 31, n. 44, p. 5134–5140, 2013. DOI: 10.1016/J.VACCINE.2013.08.027.
- KHETARPAL, N., KHANNA, I. "Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies", **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1–14, 2016. DOI: 10.1155/2016/6803098.
- KIM, T. K., EBERWINE, J. H. "Mammalian cell transfection: the present and the future", **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 8, p. 3173–3178, 2010. DOI: 10.1007/s00216-010-3821-6.
- KIMIA, Z., HOSSEINI, S. N., ASHRAF TALESH, S. S., *et al.* "A novel application of ion exchange chromatography in recombinant hepatitis B vaccine downstream processing: Improving recombinant HBsAg homogeneity by removing associated aggregates", **Journal of Chromatography B**, v. 1113, p. 20–29, 2019. DOI: 10.1016/j.jchromb.2019.03.009.

- KOHO, T., MÄNTYLÄ, T., LAURINMÄKI, P., *et al.* "Purification of norovirus-like particles (VLPs) by ion exchange chromatography", **Journal of Virological Methods**, v. 181, n. 1, p. 6–11, 2012. DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2012.01.003.
- KROL, E., BRZUSKA, G., SZEWCZYK, B. "Production and Biomedical Application of Flavivirus-like Particles", **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 11, p. 1202–1216, 2019. DOI: 10.1016/j.tibtech.2019.03.013.
- LABISCH, J. J., KASSAR, M., BOLLMANN, F., *et al.* "Steric exclusion chromatography of lentiviral vectors using hydrophilic cellulose membranes", **Journal of Chromatography A**, v. 1674, p. 463, 2022. DOI: 10.1016/j.chroma.2022.463148.
- LEE, J., GAN, H. T., LATIFF, S. M. A., *et al.* "Principles and applications of steric exclusion chromatography", **Journal of Chromatography A**, v. 1270, p. 162–170, 2012. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.10.062.
- LESER, E. W., ASENJO, J. A. "Rational design of purification processes for recombinant proteins", **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 584, n. 1, p. 43–57, 1992. DOI: 10.1016/0378-4347(92)80008-E.
- LI, X.-F., DENG, Y.-Q., YANG, H.-Q., *et al.* "A Chimeric Dengue Virus Vaccine using Japanese Encephalitis Virus Vaccine Strain SA14-14-2 as Backbone Is Immunogenic and Protective against Either Parental Virus in Mice and Nonhuman Primates", **Journal of Virology**, v. 87, n. 24, p. 13694–13705, 2013. DOI: 10.1128/JVI.00931-13.
- LIMA, T. M., SOUZA, M. O., CASTILHO, L. R. "Purification of flavivirus VLPs by a two-step chromatographic process", **Vaccine**, v. 37, n. 47, p. 7061–7069, 2019. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.05.066.
- LISTE-CALLEJA, L., LECINA, M., SCHUCHT, R., *et al.* "Hek293 as a recombinant protein factory: three different approaches for protein production", **BMC Proceedings**, v. 9, n. S9, p. P74, 2015. DOI: 10.1186/1753-6561-9-S9-P74.
- LIU, Y., ZHOU, J., YU, Z., *et al.* "Tetravalent recombinant dengue virus-like particles as potential vaccine candidates: immunological properties", **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 233, 2014. DOI: 10.1186/s12866-014-0233-3.

- LUDWIG, C., WAGNER, R. "Virus-like particles—universal molecular toolboxes", **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 537–545, 2007. DOI: 10.1016/j.copbio.2007.10.013.
- MAIRUHU, A. T. A., WAGENAAR, J., BRANDJES, D. P. M., *et al.* "Dengue: an arthropod-borne disease of global importance", **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 23, n. 6, p. 425–433, 2004. DOI: 10.1007/s10096-004-1145-1.
- MALAVIGE, G. N., FERNANDO, S., FERNANDO, D. J., *et al.* "Dengue viral infections", **Postgraduate Medical Journal**, v. 80, n. 948, p. 588–601, 2004. DOI: 10.1136/pgmj.2004.019638.
- MAO, H. H., CHAO, S., "Advances in Vaccines". **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, [S.I.], 2019. v. 171. p. 155–188. DOI: 10.1007/10\_2019\_107.
- MARICHAL-GALLARDO, P., BÖRNER, K., PIELER, M. M., *et al.* "Single-Use Capture Purification of Adeno-Associated Viral Gene Transfer Vectors by Membrane-Based Steric Exclusion Chromatography.", **Human gene therapy**, v. 32, n. 17–18, p. 959–974, 2021. DOI: 10.1089/hum.2019.284.
- MARICHAL-GALLARDO, P., PIELER, M. M., WOLFF, M. W., *et al.* "Steric exclusion chromatography for purification of cell culture-derived influenza A virus using regenerated cellulose membranes and polyethylene glycol", **Journal of Chromatography A**, v. 1483, p. 110–119, 2017. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.12.076.
- MARTINEZ, D. R., METZ, S. W., BARIC, R. S. "Dengue Vaccines: The Promise and Pitfalls of Antibody-Mediated Protection", **Cell Host & Microbe**, v. 29, n. 1, p. 13–22, 13 2021. DOI: 10.1016/j.chom.2020.12.011.
- MAVES, R. C., ORÉ, R. M. C., PORTER, K. R., *et al.* "Immunogenicity and protective efficacy of a psoralen-inactivated dengue-1 virus vaccine candidate in *Aotus nancymaae* monkeys", **Vaccine**, v. 29, n. 15, p. 2691–2696, 2011. DOI: 10.1016/J.VACCINE.2011.01.077.
- METZ, S. W., THOMAS, A., BRACKBILL, A., *et al.* "Nanoparticle delivery of a tetravalent E protein subunit vaccine induces balanced, type-specific neutralizing

- antibodies to each dengue virus serotype", **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 9, 2018. DOI: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0006793.
- METZ, S. W., THOMAS, A., WHITE, L., *et al.* "Dengue virus-like particles mimic the antigenic properties of the infectious dengue virus envelope", **Virology Journal**, v. 15, 2018. DOI: 10.1186/S12985-018-0970-2.
- MOHANTY, L., PRABHU, M., KUMAR MISHRA, A., *et al.* "Safety and immunogenicity of a single dose, live-attenuated 'tetraivalent dengue vaccine' in healthy Indian adults; a randomized, double-blind, placebo-controlled phase I/II trial", **Vaccine: X**, v. 10, p. 100-142, 2022. DOI: 10.1016/j.jvacx.2022.100142.
- MORAES, A. M., MENDONÇA, R. Z., SUAZO, C. A. T. "Chapter 5 – Culture media for animal cells" – Encontrado em CASTILHO, L. R., MORAES, A. M., AUGUSTO, E. F. P., BUTLER, M. "**Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy**" - 2008. ISBN: 978-0-415-42304-5
- MORRISON, J., RATHORE, A. P. S., MANTRI, C. K., *et al.* "Transcriptional Profiling Confirms the Therapeutic Effects of Mast Cell Stabilization in a Dengue Disease Model", **Journal of Virology**, v. 91, n. 18, p. 617–634, 2017. DOI: 10.1128/JVI.00617-17.
- N.A. PARRIS, "Chapter 12 Steric exclusion chromatography". **Journal of Chromatography Library**, [S.l.], Elsevier, 1984. v. 27. p. 253–283. DOI: 10.1016/S0301-4770(08)60201-8.
- NESTOLA, P., PEIXOTO, C., SILVA, R. R. J. S., *et al.* "Improved virus purification processes for vaccines and gene therapy", **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 5, p. 843–857, 2015. DOI: 10.1002/bit.25545.
- NESTOLA, P., PEIXOTO, C., VILLAIN, L., *et al.* "Rational development of two flowthrough purification strategies for adenovirus type 5 and retro virus-like particles", **Journal of Chromatography A**, v. 1426, p. 91–101, 2015. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.11.037.
- NOAD, R., ROY, P. "Virus-like particles as immunogens", **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 438–444, 2003. DOI: 10.1016/S0966-842X(03)00208-7.

OZTURK, S. S., JORJANI, P., TATICEK, R., *et al.* "Kinetics of Glucose Metabolism and Utilization of Lactate in Mammalian Cell Cultures". **Animal Cell Technology**, 1997. p. 355–360. DOI: 10.1007/978-94-011-5404-8\_56

PAHO/WHO | **Description of the current epidemiological trends of dengue in the Americas.** [S.d.]. Disponível em: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=4494:2010-descripcion-situacion-epidemiologica-actual-dengue-americas&Itemid=40370&lang=en](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4494:2010-descripcion-situacion-epidemiologica-actual-dengue-americas&Itemid=40370&lang=en). Acesso em: 20 jun. 2019.

PATO, T. P., SOUZA, M. C. O., MATTOS, D. A., CARIDE, E., FERREIRA, D. F., FASPAR, L. P., FREIRE, M. S., CASTILHO, L. R. "Purification of yellow fever virus produced in Vero cells for inactivated vaccine manufacture", *Vaccine*, v. 37, n. 24, p. 3214-3220, 2019. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.04.077

PATO, T. P., SOUZA, M. C. O., SILVA, A. N. M. R., PEREIRA, R. C., SILVA, M. V., CARIDE, E., GASPAS, L. P., FREIRE, M. S., CASTILHO, L. R. "Development of a membrane adsorber based capture step for the purification of yellow fever virus", *Vaccine*, v. 32, n. 24, p. 2789-2793, 2014. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.02.036

PERERA, R., KUHN, R. J. "Structural proteomics of dengue virus", **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 369–377, 2008. DOI: 10.1016/j.mib.2008.06.004.

PITOSET, F., VAZQUEZ, T., BELLIER, B. "Enveloped virus-like particle platforms: vaccines of the future?", **Expert Review of Vaccines**, v. 14, n. 7, p. 913–915, 2015. DOI: 10.1586/14760584.2015.1046440.

PLOTKIN, S., ROBINSON, J. M., CUNNINGHAM, G., *et al.* "The complexity and cost of vaccine manufacturing - An overview.", **Vaccine**, v. 35, n. 33, p. 4064–4071, 2017. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.06.003.

PROMPETCHARA, E., KETLOY, C., KEELAPANG, P., *et al.* "Induction of Neutralizing Antibody Response against Four Dengue Viruses in Mice by Intramuscular Electroporation of Tetravalent DNA Vaccines", **PLOS ONE**, v. 9, n. 6, 2014. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0092643.

- PUJAR, H., LUNDGREN, M., "Modern Production Strategies in the Vaccine Industry". **Biopharmaceutical Processing**, [S.I.], Elsevier, 2018. p. 877–898. DOI: 10.1016/B978-0-08-100623-8.00040-2.
- RAMASAMY, V., ARORA, U., SHUKLA, R., *et al.* "A tetravalent virus-like particle vaccine designed to display domain III of dengue envelope proteins induces multi-serotype neutralizing antibodies in mice and macaques which confer protection against antibody dependent enhancement in AG129 mice", **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. e0006191, 2018a. DOI: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0006191.
- RAMASAMY, V., ARORA, U., SHUKLA, R., *et al.* "A tetravalent virus-like particle vaccine designed to display domain III of dengue envelope proteins induces multi-serotype neutralizing antibodies in mice and macaques which confer protection against antibody dependent enhancement in AG129 mice", **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. e0006191, 2018b. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006191.
- RATHORE, A. P. S., MANTRI, C. K., TAN, M. W., *et al.* "Immunological and Pathological Landscape of Dengue Serotypes 1-4 Infections in Immune-Competent Mice.", **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 681950, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.681950.
- RIGAU-PÉREZ, J. G., CLARK, G. G., GUBLER, D. J., *et al.* "Dengue and dengue haemorrhagic fever.", **Lancet (London, England)**, v. 352, n. 9132, p. 971–7, 1998. DOI: 10.1016/s0140-6736(97)12483-7
- RIVERA, L., BISWAL, S., SÁEZ-LLORENS, X., *et al.* "Three-year Efficacy and Safety of Takeda's Dengue Vaccine Candidate (TAK-003)", **Clinical Infectious Diseases**, v. 75, n. 1, p. 107–117, 2022. DOI: 10.1093/cid/ciab864.
- ROBINSON, J. M., "Vaccine Production: Main Steps and Considerations". **The Vaccine Book**, [S.I.], Elsevier, 2016. p. 77–96. DOI: 10.1016/B978-0-12-802174-3.00005-9.
- ROITT, I. M., DELVES, P. J., MARTIN, S. J., *et al.* "Capítulo 4 – Receptores de membrana para antígenos" – Encontrado em: **Fundamentos de Imunologia**. 12ª ed. [S.I.], Editora Guanabara Koogan LTDA., 2013.

- ROLDÃO, A., SILVA, A. C., MELLADO, M. C. M., *et al.* "Viruses and Virus-Like Particles in Biotechnology". **Comprehensive Biotechnology**, Second Edition. [S.I.], Elsevier, 2011. v. 1. p. 625–649. DOI: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00072-6.
- ROLDÃO, António, MELLADO, M. C. M., CASTILHO, L. R., *et al.* "Virus-like particles in vaccine development", **Expert Review of Vaccines**, v. 9, n. 10, p. 1149–1176, 2010. DOI: 10.1586/erv.10.115.
- RUSSELL, B. J., VELEZ, J. O., LAVEN, J. J., *et al.* "A comparison of concentration methods applied to non-infectious flavivirus recombinant antigens for use in diagnostic serological assays", **Journal of Virological Methods**, v. 145, n. 1, p. 62–70, 2007. DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2007.05.008.
- SAHA, G., SAUDAGAR, P., DUBEY, V. K., "Virus-like particles: nano-carriers in targeted therapeutics". **Encapsulation of Active Molecules and Their Delivery System**, [S.I.], Elsevier, 2020. p. 197–210. DOI: 10.1016/B978-0-12-819363-1.00012-0.
- SCHERWITZL, I., MONGKOLSAPAJA, J., SCRETON, G. "Recent advances in human flavivirus vaccines", **Current Opinion in Virology**, v. 23, p. 95–101, 2017. DOI: 10.1016/j.coviro.2017.04.002.
- SCHLAKE, T., THESS, A., FOTIN-MLECZEK, M., *et al.* "Developing mRNA-vaccine technologies", **RNA Biology**, v. 9, n. 11, p. 1319–1330, 2012. DOI: 10.4161/rna.22269.
- SCHMIDT, A. C., LIN, L., MARTINEZ, L. J., *et al.* "Phase 1 Randomized Study of a Tetravalent Dengue Purified Inactivated Vaccine in Healthy Adults in the United States", **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 6, p. 1325–1337, 2017. DOI: 10.4269/ajtmh.16-0634.
- SCHMITZ, J., NOLL, T., GRÜNBERGER, A. "Heterogeneity Studies of Mammalian Cells for Bioproduction: From Tools to Application", **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 6, p. 645–660, 2019. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.11.007.
- SCHWARZ, H., ZHANG, Y., ZHAN, C., *et al.* "Small-scale bioreactor supports high density HEK293 cell perfusion culture for the production of recombinant Erythropoietin", **Journal of Biotechnology**, v. 309, p. 44–52, 2020. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2019.12.017.

- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. "Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 51 de 2022", v. 53, n. 48, p. 1–35, 2022.
- SHANG, W., LIU, J., YANG, J., *et al.* "Dengue virus-like particles: construction and application", **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 1, p. 39–46, 2012. DOI: 10.1007/s00253-012-3958-7.
- STANLEY A. PLOTKIN. "Vaccines in the 21st Century", **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 15, n. 1, p. 307–327, 2001. DOI: 10.1016/S0891-5520(05)70280-4.
- STANLEY A. PLOTKIN, ROBINSON, J. M., CUNNINGHAM, G., *et al.* "The complexity and cost of vaccine manufacturing - An overview.", **Vaccine**, v. 35, n. 33, p. 4064–4071, 2017. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.06.003.
- SUPHATRAKUL, A., YASANGA, T., KEELAPANG, P., *et al.* "Generation and preclinical immunogenicity study of dengue type 2 virus-like particles derived from stably transfected mosquito cells", **Vaccine**, v. 33, n. 42, p. 5613–5622, 2015. DOI: 10.1016/J.VACCINE.2015.08.090.
- SUSAN L. PLOTKIN, STANLEY A. PLOTKIN, "A Short History of Vaccination". **Plotkin's Vaccines**, [S.l.], Elsevier, 2018. p. 1-15, e 8. DOI: 10.1016/B978-0-323-35761-6.00001-8.
- SWAMINATHAN, S., KHANNA, N. "Dengue vaccine development: Global and Indian scenarios", **International Journal of Infectious Diseases**, v. 84, p. S80–S86, 2019. DOI: 10.1016/j.ijid.2019.01.029.
- TAKADA, A., KAWAOKA, Y. "Antibody-dependent enhancement of viral infection: molecular mechanisms and in vivo implications", **Reviews in Medical Virology**, v. 13, n. 6, p. 387–398, 2003. DOI: 10.1002/rmv.405.
- TEIXEIRA, M. G., BARRETO, M. L., GUERRA, Z. "Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue", **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 4, p. 5–33, 1999. DOI: 10.5123/S0104-16731999000400002.
- TORRESI, J., EBERT, G., PELLEGRINI, M. "Vaccines licensed and in clinical trials for the prevention of dengue", **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 13, n. 5, p. 1059–1072, 2017. DOI: 10.1080/21645515.2016.1261770.

- UNO, N., ROSS, T. M. "Dengue virus and the host innate immune response", **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2018. DOI: 10.1038/s41426-018-0168-0.
- URAKAMI, A., NGWE TUN, M. M., MOI, M. L., *et al.* "An Envelope-Modified Tetravalent Dengue Virus-Like-Particle Vaccine Has Implications for Flavivirus Vaccine Design", **Journal of Virology**, v. 91, n. 23, p. e01181-17, 2017. DOI: 10.1128/JVI.01181-17.
- VICENTE, T., ROLDÃO, A., PEIXOTO, C., *et al.* "Large-scale production and purification of VLP-based vaccines", **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 107, p. S42–S48, 2011. DOI: 10.1016/j.jip.2011.05.004.
- VINK, T., OUDSHOORN-DICKMANN, M., ROZA, M., *et al.* "A simple, robust and highly efficient transient expression system for producing antibodies", **Methods**, v. 65, n. 1, p. 5–10, 2014. DOI: 10.1016/j.ymeth.2013.07.018.
- WANG, W.-H., URBINA, A. N., LIN, C.-Y., *et al.* "Targets and strategies for vaccine development against dengue viruses", **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 144, p. 112304, 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112304.
- WANG, Y., ZHANG, Z., LUO, J., *et al.* "mRNA vaccine: a potential therapeutic strategy", **Molecular Cancer**, v. 20, n. 1, p. 33, 2021. DOI: 10.1186/s12943-021-01311-z.
- "WHO | Dengue". **WHO**, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/denguecontrol/en/>. Acesso em: 20 ago. 2019.
- "WHO | Revised SAGE recommendation on use of dengue vaccine". **WHO**, 2018. Disponível em: [https://www.who.int/immunization/diseases/dengue/revised\\_SAGE\\_recommendations\\_dengue\\_vaccines\\_apr2018/en/](https://www.who.int/immunization/diseases/dengue/revised_SAGE_recommendations_dengue_vaccines_apr2018/en/). Acesso em: 20 ago. 2019.
- WICHMANN, O., VANNICE, K., ASTURIAS, E. J., *et al.* "Live-attenuated tetravalent dengue vaccines: The needs and challenges of post-licensure evaluation of vaccine safety and effectiveness", **Vaccine**, v. 35, n. 42, p. 5535–5542, 2017. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.08.066.

- WILDER-SMITH, A. "Dengue vaccine development: status and future", **Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz**, v. 63, n. 1, p. 40–44, 2020. DOI: 10.1007/s00103-019-03060-3.
- WILDER-SMITH, A., OOI, E.-E., HORSTICK, O., *et al.* "Dengue", **The Lancet**, v. 393, n. 10169, p. 350–363, 2019. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32560-1.
- WILLIAMS, A., FRASCA, V. **Ion-Exchange Chromatography - Conventional Chromatographic Separations**. [S.l: s.n.], 1999.
- WONG, S.-S., HAQSHENAS, G., GOWANS, E. J., *et al.* "The dengue virus M protein localises to the endoplasmic reticulum and forms oligomers", **FEBS Letters**, v. 586, n. 7, p. 1032–1037, 2012. DOI: 10.1016/j.febslet.2012.02.047.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Immunization**. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/facts-in-pictures/detail/immunization>. Acesso em: 19 jan. 2023.
- WURM, F. M. "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells", **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1393–1398, 2004. DOI: 10.1038/nbt1026.
- XU, S., YANG, K., LI, R., *et al.* "mRNA Vaccine Era—Mechanisms, Drug Platform and Clinical Prospection", **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, p. 6582, 2020. DOI: 10.3390/ijms21186582.
- YAO, T., ASAYAMA, Y. "Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues", **Reproductive Medicine and Biology**, v. 16, n. 2, p. 99–117, 2017. DOI: 10.1002/rmb2.12024.
- ZHANG, F., LUO, J., TENG, M., *et al.* "Purification of cell-derived Japanese encephalitis virus by dual-mode chromatography", **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 68, n. 3, p. 547–553, 2021. DOI: 10.1002/bab.1960.
- ZHANG, L., WANG, W., WANG, S. "Effect of vaccine administration modality on immunogenicity and efficacy", **Expert Review of Vaccines**, v. 14, n. 11, p. 1509–1523, 2015. DOI: 10.1586/14760584.2015.1081067.

- ZHANG, X., JIA, R., SHEN, H., *et al.* "Structures and Functions of the Envelope Glycoprotein in Flavivirus Infections", **Viruses**, v. 9, n. 11, p. 338, 2017. DOI: 10.3390/v9110338.
- ZHANG, Y., CORVER, J., CHIPMAN, P. R., *et al.* "Structures of immature flavivirus particles.", **The EMBO journal**, v. 22, n. 11, p. 2604–13, 2003. DOI: 10.1093/emboj/cdg270.
- ZHANG, Y., ZHANG, W., OGATA, S., *et al.* "Conformational Changes of the Flavivirus E Glycoprotein", **Structure**, v. 12, n. 9, p. 1607–1618, 2004. DOI: 10.1016/j.str.2004.06.019.
- ZHU, J. "Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production", **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1158–1170, 2012. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.022.

## Apêndices

### DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS EM AMOSTRAS DE TRANSFEÇÕES TRANSIENTES

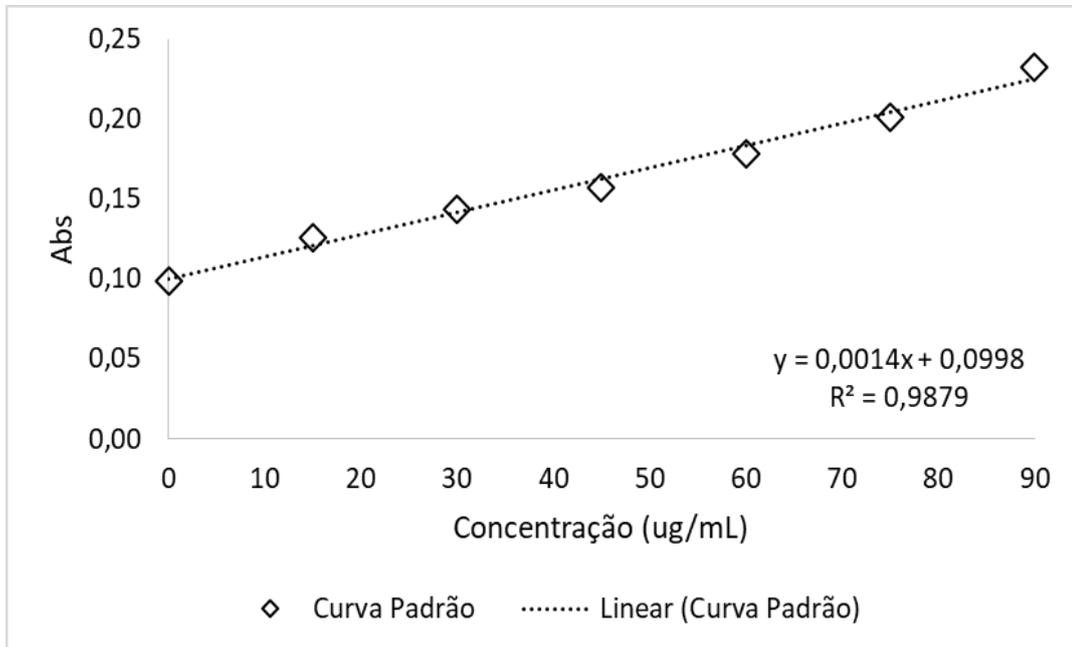


FIGURA A1. Curva padrão e regressão linear para determinação da concentração de proteínas totais de DENV 1-4/TT, utilizando BSA como padrão.

## DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS EM AMOSTRAS DE TRANSFEÇÃO ESTÁVEL

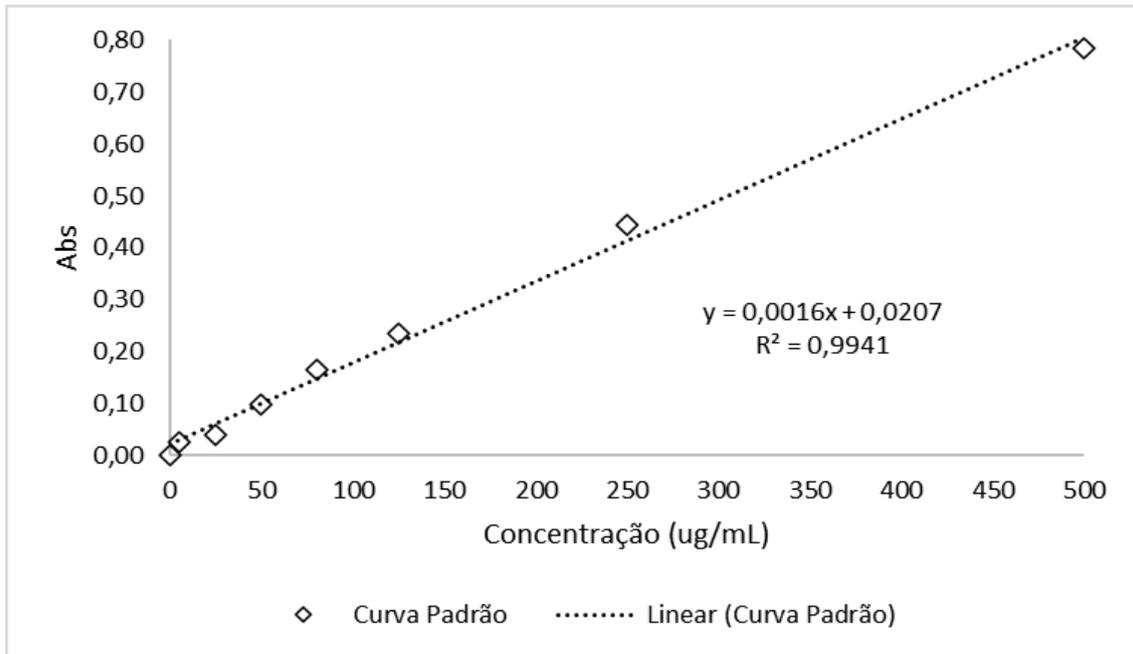


FIGURA A2. Curva padrão e regressão linear para determinação da concentração de proteínas totais de DENV1/TE, utilizando BSA como padrão.

**ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA A PARTIR  
DAS ÁREAS DOS PICOS EM ENSAIO DE SEC-HPLC**

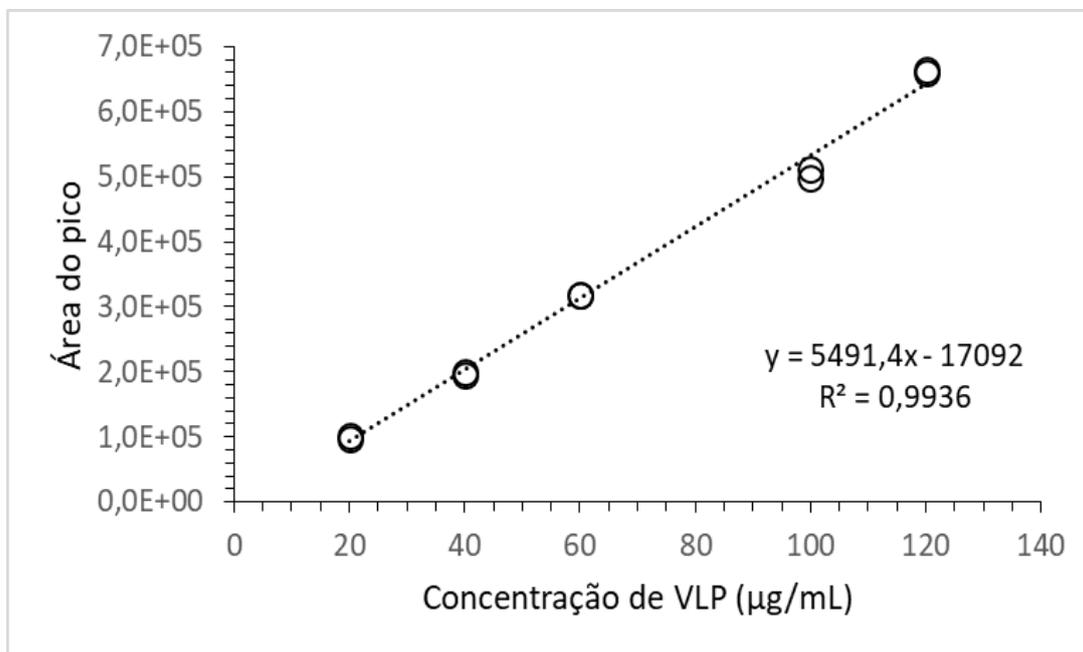


FIGURA A3. Curva padrão e regressão linear para determinação da concentração de proteínas totais de DENV1-4/TT, por SEC-HPLC.

## DETERMINAÇÃO DE DNA RESIDUAL DA CÉLULA HOSPEDEIRA

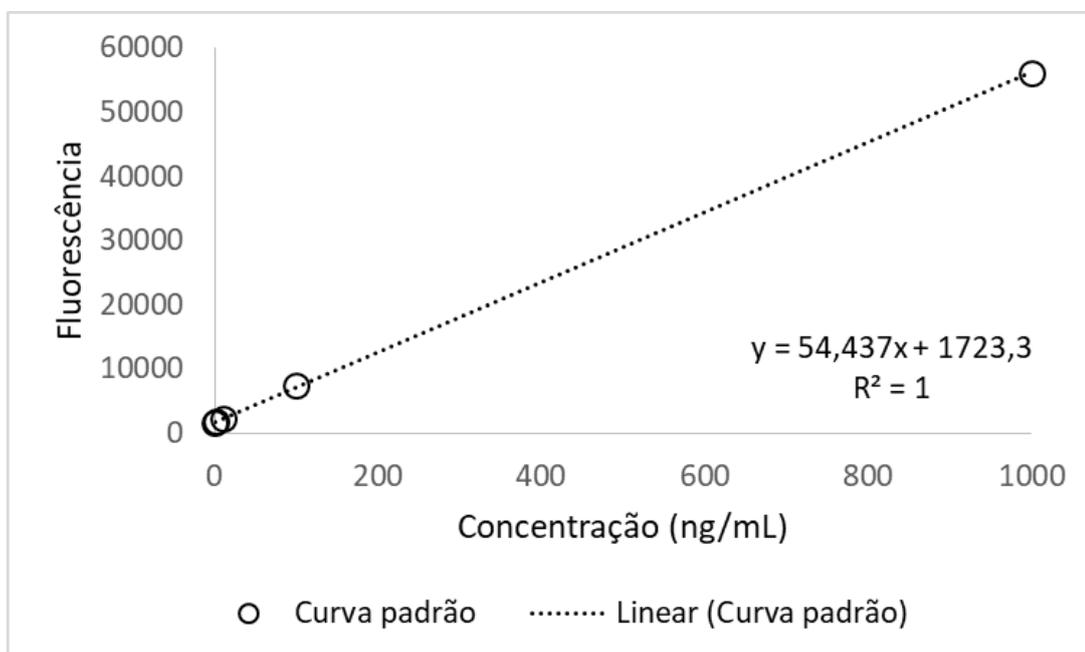


FIGURA A4. Curva padrão e regressão linear para determinação de DNA residual da célula hospedeira.