Universidade Federal do Rio de Janeiro
Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos – EQ/UFRJ

Renata Guimarães Ferreira Alvim

PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS PSEUDOVIRAIS DE ZIKA EM BIORREATORES DE TANQUE AGITADO

Orientador: Ivaldo Itabaiana Jr.
Coorientadora: Leda dos Reis Castilho

Dissertação de Mestrado

Rio de Janeiro
2019

PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS PSEUDOVIRAIS DE ZIKA EM BIORREATORES DE TANQUE AGITADO

Renata Guimarães Ferreira Alvim

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Rio de Janeiro, 29 de março de 2019.

Orientada por:

_____

Prof. Ivaldo Itabaiana Jr., D.Sc.

_____

Profa. Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing.

Aprovada por:

_____

Prof. Renato Sampaio Carvalho, D.Sc.

_____

Prof. Ricardo de Andrade Medronho, Ph.D.

Rio de Janeiro

2019

CIP - Catalogação na Publicação

G472p

Guimarães Ferreira Alvim, Renata
Produção de partículas pseudovirais de Zika em biorreatores de tanque agitado / Renata Guimarães Ferreira Alvim. -- Rio de Janeiro, 2019.
111 f.

Orientador: Ivaldo Itabaiana Jr..
Coorientadora: Leda dos Reis Castilho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2019.

1. Partículas pseudovirais. 2. Vírus Zika. 3. Células HEK293. 4. Expressão estável. 5. Processo de cultivo de células animais em perfusão. I. Itabaiana Jr., Ivaldo, orient. II. dos Reis Castilho, Leda, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Leda e Ivaldo, por todo o aprendizado e horas dedicadas a este trabalho. Em especial, gostaria de agradecer à Leda pelos anos de convivência e por confiar em mim como pessoa e profissional.

A todos do LECC, pelo companheirismo, dedicação e paciência. Ao longo de pouco mais de seis anos no laboratório, pude conviver com diferentes pessoas e aprender muito com todas elas. Um agradecimento especial ao Rimenys, por dividir os horários de almoço, as caronas, risadas e cervejas; ao Alexandre, Ioná, Matheus e Túlio, por dividir experimentos e ensinamentos comigo.

Aos amigos que fiz no JLABS, Nelda, Sahar, Stephanie e Yury, que conviveram comigo diariamente durante minha estadia nos Estados Unidos e me deram um apoio essencial. Nunca irei esquecer o que dividimos nesse tempo.

À Taís e Triciana do CENABIO/UFRJ, por toda ajuda com os experimentos de *sorting*.

Às minhas amigas Ana Luiza, Camilla e Marcela, que me acompanham a vida toda.

Aos meus pais, Sandra e Renauto, e ao meu irmão, Guilherme, por estarem ao meu lado incondicionalmente, pelo incentivo, puxões de orelha, suporte e por todas as formas de demonstração de amor que se pode imaginar. Vocês são meu alicerce e sem isso nada seria possível.

Resumo

PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS PSEUDOVIRAIS DE ZIKA EM BIORREATORES DE TANQUE AGITADO

Renata Guimarães Ferreira Alvim

Orientadores: Ivaldo Itabaiana Jr. e Leda dos Reis Castilho

O vírus Zika (ZIKV) foi identificado no Brasil pela primeira vez em 2015 e rapidamente se espalhou para mais de 90 países e territórios na África, Ásia e nas Américas. A infecção pelo vírus Zika foi correlacionada com casos de mal-formações congênitas em fetos de mães infectadas, assim como a síndrome de Guillain-Barré em adultos. Apesar de o número de pessoas infectadas ter diminuído nos países afetados, o desenvolvimento de uma vacina para ZIKV é de fundamental importância, de forma a evitar surtos periódicos do vírus em áreas endêmicas ou futura expansão para áreas que não são endêmicas nos dias atuais.

Dentre as diferentes plataformas para o desenvolvimento de vacinas em estudo atualmente, partículas pseudovirais (VLPs, do inglês *virus-like particles*) são uma alternativa promissora, visto que são partículas tridimensionais que mimetizam o vírus, mas que não contêm seu material genético. Por apresentarem o antígeno de forma repetitiva, VLPs têm potencial para elicitar respostas imunes robustas.

Neste trabalho, foram desenvolvidas linhagens recombinantes de células HEK293 expressando de forma estável e constitutiva partículas pseudovirais de Zika, cultivadas em suspensão em meio de cultivo isento de componentes de origem animal. Estudos iniciais em frascos agitados em pequena escala, usando uma população celular enriquecida com auxílio de citometria de fluxo acoplada a um *sorter* (FACS), mostraram que a operação em modo pseudoperfusão com retenção de células aumenta consideravelmente a concentração de células viáveis e a produção de partículas virais quando comparada a cultivos em modo batelada. Melhorias adicionais foram alcançadas por meio de cultivos contínuos em perfusão utilizando um sistema de biorreator de tanque agitado controlado acoplado a um equipamento de filtração tangencial alternada (XCell™ ATF-2). Apesar da operação contínua do biorreator e da constante troca de meio, a concentração máxima de produto obtida (90 µg/mL) foi maior do que a alcançada em pequena escala, seja em batelada simples (22 µg/mL) ou em pseudoperfusão (89 µg/mL), indicando que processos contínuos em perfusão representam uma alternativa promissora para a obtenção de VLPs de Zika vírus.

Palavras-chave: Partículas pseudovirais, Vírus Zika, Células HEK293, Expressão estável, Processo de cultivo de células animais.

Abstract

PRODUCTION OF ZIKA VIRUS-LIKE PARTICLES IN STIRRED-TANK BIOREACTORS

Renata Guimarães Ferreira Alvim

Advisors: Ivaldo Itabaiana Jr. and Leda dos Reis Castilho

Zika virus (ZIKV) was first identified in Brazil in 2015 and then rapidly spread to more than 90 countries and territories in Africa, Asia and the Americas. ZIKV infection was correlated with severe congenital malformations in fetuses from infected mothers, as well as Guillain-Barré syndrome in adults. Although the number of infected people has declined in the affected countries, the development of a vaccine for ZIKV is of great importance to avoid periodic outbreaks of the virus in endemic areas or the future spread to currently non-endemic regions.

Among many different platforms for the development of vaccines currently under study, virus-like particles (VLPs) are a promising alternative, since they are tridimensional and mimic the virus, but lack its genome. Since VLPs present the antigen in a repetitive way, they have the potential to elicit robust immune responses.

In this work, recombinant HEK293 cell lines expressing Zika VLPs in a stable and constitutive manner were developed, under cultivation in suspension in animal component-free medium. Initial studies in shaken flasks in small scale, using a cell pool enriched by cell sorting based on Flow Cytometry (FACS) showed that the operation in pseudoperfusion with cell retention can considerably enhance the viable cell density and VLP production when compared to batch cultures. Further enhancements were achieved through continuous cultivation in perfusion using a controlled stirred-tank bioreactor coupled to an alternating tangential filtration equipment (XCell™ ATF-2). In spite of the continuous operation of the bioreactor and of the constant medium exchange, maximum titer (90 µg/mL) was higher than in small scale, either in simple batch (22 µg/mL) or in pseudoperfusion (89 µg/mL), indicating that continuous perfusion systems represent a promising alternative for the obtention of Zika VLPs.

Key words: Virus-like particles, Zika virus, HEK293 cell line, Stable expression, Animal cell cultivation in perfusion mode.

Sumário

Lista de Figuras.....viii
Lista de Tabelas.....xi
1. INTRODUÇÃO.....1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....3
2.1 Vacinas.....3
2.1.1 Tipos de vacinas.....4
2.1.2 Aspectos mercadológicos.....5
2.2. O vírus Zika.....7
2.2.1. Histórico.....7
2.2.2. Características do vírus Zika.....8
2.2.3. Uso de partículas pseudovirais como plataforma vacinal.....10
2.3. Produção de vacinas recombinantes e partículas virais.....12
2.3.1. Uso de células de mamíferos.....12
2.3.1.1. O metabolismo de células de mamíferos e os meios de cultivo.....13
2.3.2. Geração de linhagens celulares recombinantes.....14
2.3.3. Otimização das condições de cultivo e produção em biorreatores.....17
3. OBJETIVOS.....23
3.1. Objetivo geral.....23
3.2. Objetivos específicos.....23
4. METODOLOGIA.....24
4.1. Linhagens celulares e condições de cultivo.....24
4.1.1. Criopreservação e descongelamento de células.....25
4.2. Geração das linhagens recombinantes produtoras de VLPs de Zika.....25
4.2.1. Construções gênicas.....25
4.2.2. Avaliação inicial da produção de VLPs por transfecção transiente.....26
4.2.3. Definição do protocolo de transfecção.....27
4.2.4. Geração de populações produtoras de partículas pseudovirais de forma estável.....28
4.3. Enriquecimento de populações estáveis produzindo VLPs de Zika.....29
4.4. Avaliação das populações recombinantes em frascos agitados.....30
4.4.1. Estudos cinéticos: batelada e pseudoperfusão.....31
4.4.2. Avaliação da estabilidade da produção de VLPs por populações estáveis.....31
4.5. Produção de partículas pseudovirais de Zika em biorreator do tipo tanque agitado.....32

4.6. Ensaios analíticos.....33
4.6.1. Quantificação de células viáveis e totais.....33
4.6.2. Quantificação de glicose e lactato.....34
4.6.3. Análise da produção de partículas pseudovirais de Zika.....34
4.7. Cálculos utilizados nos experimentos.....35
4.7.1. Batelada.....35
4.7.1. Perfusão.....36
5. RESULTADOS.....38
5.1. Avaliação de diferentes linhagens celulares hospedeiras para expressão de partículas pseudovirais de Zika e definição do protocolo de transfecção.....38
5.2. Geração de linhagens celulares estáveis produtoras e avaliação da produção de VLPs até seis semanas após a transfecção.....42
5.3. Avaliação do comportamento celular das populações produtoras em frascos agitados 30 dias após a transfecção.....46
5.4 Seleção de subpopulações com maior produção de VLPs por meio do uso de FACS.....49
5.5. Investigação do uso de linhagens estáveis para desenvolver estudos de produção em modo contínuo: avaliação em pequena escala.....52
5.6. Corrida em biorreator operado perfusão para produção de VLPs.....56
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....62
ANEXO A: Artigo submetido à revista Vaccine "Zika virus-like particles (VLPs): stable cell lines and continuous perfusion processes as a new potential vaccine manufacturing platform".....72

Lista de Figuras

Figura 1: Áreas do mundo com risco de infecção por Zika. Adaptado de CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2018).....8

Figura 2: (A) RNA de fita simples e polaridade positiva do ZIKV codifica poliproteína contendo três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). (B) Partícula de ZIKV envelopada contendo proteínas M (laranja) e E (amarelo) dispostas em sua superfície em forma icosaédrica e RNA genômico envolto por proteínas do capsídeo (verde). Adaptado de VIRALZONE – SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS (2016).....9

Figura 3: Esquema do procedimento de transfecção por lipofecção. De forma resumida, o DNA plasmidial é incubado com o reagente de lipofecção e, após isso, é transferido para o frasco agitado contendo a suspensão de células parentais. Após 48-72h, é possível coletar material proveniente de tal cultivo celular e avaliar a presença do produto de interesse. Adaptado de OZ BIOSCIENCES (2019).....16

Figura 4: Esquema resumido do fluxograma referente às etapas de geração da linhagem celular, seleção e isolamento de populações produtoras/clones, escalonamento e preparo de bancos celulares e otimização do processo produtivo. Adaptado de BANDARANAYAKE e ALMO (2014).....18

Figura 5: Configuração de biorreatores operados em diferentes modos de operação: batelada, batelada alimentada e contínuo com reciclo celular (perfusão). Adaptado de CHICO et al. (2008).....20

Figura 6: Construções de ZIKV baseadas nas proteínas estruturais prM e E. O peptídeo sinal (SP, sigla do inglês signal peptide) do vírus da encefalite japonesa (JEV) e outros peptídeos sinal desenhados pelo grupo do Laboratório de Cultivo de Engenharia Celulares (COPPE/UFRJ) foram avaliados. As sequências de proteína E avaliadas foram quiméricas, onde 20% da porção C-terminal do vírus Zika foi substituída por 20% da parte C-terminal de JEV ou do vírus da encefalite de Murray Valley (MVE) (lecc1-3) ou baseadas na sequência selvagem da cepa BeH819966 do ZIKV (lecc5-10). A sequência de proteína E da construção leccmut também foi baseada na cepa BeH819966, com exceção dos aminoácidos 106 e 107 presentes no loop de fusão, os quais foram substituídos por um resíduo de asparagina. A construção lecc4 também é de origem quimérica, considerando que os aminoácidos da região âncora da proteína E de Zika foi substituída pela respectiva sequência do MVE.....26

Figura 7: Desenho esquemático simplificado do sistema utilizado para a produção de VLPs de Zika em biorreator de tanque agitado. Além do vaso principal contendo os sensores necessários (não mostrados no esquema), o sistema conta com bombas peristálticas utilizadas para injeção de meio de cultivo para alimentação, coleta de sobrenadante após recirculação pelo equipamento de retenção celular (XCell™ ATF-2) e para remoção controlada de células (cell bleed). Além disso, o esquema mostra os frascos necessários às operações de alimentação, coleta e remoção de células Adaptado de CHICO et al. (2008) e NIKOLAY et al. (2018b).....33

Figura 8: *Spot blot* em membrana de nitrocelulose para avaliação da secreção de partículas pseudovirais de Zika por células HEK293-3F6, utilizando o anticorpo monoclonal 4G2 como anticorpo primário. Como controle positivo, utilizou-se proteína E de Dengue na concentração de 100 µg/mL. Transfecção transiente com células HEK293-3F6 em tubos agitados, utilizando a mistura DNA-Lipofectamina 3000 na proporção 0,5 µg de DNA para 1 µL de lipídeo por mililitro de suspensão transfectada.....39

Figura 9: Detecção por *spot blot* da secreção transiente de VLPs por células CHO.K1 quando cultivadas em diferentes meios de cultivo. Setas indicam o fraco sinal detectado para a condição onde as células foram cultivadas e transfectadas em HEK TF e assim mantidas até o fim do experimento. Como controle positivo, utilizou-se proteína E de Dengue na concentração de 100 µg/mL. O anticorpo monoclonal 4G2 foi utilizado como anticorpo primário.....40

Figura 10: Detecção por *spot blot* da produção de VLPs de Zika por células BHK-21. Ambas as condições foram transfectadas em meio HEK TF, sendo que em um dos casos as células foram ressuspendidas no meio de crescimento 6h após a transfecção (resultado do lado direito, canto inferior). Como controle positivo, utilizou-se proteína E de Dengue na concentração de 100 µg/mL. O anticorpo monoclonal 4G2 foi utilizado como anticorpo primário.....40

Figura 11: Confirmação por *spot blot* da produção de VLPs de Zika por células HEK293-3F6 utilizando os reagentes de transfecção Lipofectamina 3000 (1) e (2), TransIT®-2020 (3) e jetPEI® (4). Na condição 2, adicionou-se HEK FS 4h após a transfecção. Como controle positivo, utilizou-se proteína E de Dengue na concentração de 100 µg/mL. O anticorpo monoclonal 4G2 foi utilizado como anticorpo primário.....41

Figura 12: Imunoensaio do tipo *spot blot* para avaliação da secreção de diferentes construções de VLPs por células HEK293-3F6. Proteína E de Dengue foi utilizada como controle positivo (25 µg/mL). Soro de camundongos imunizados com plasmídeo contendo prME de ZIKV como anticorpo primário (diluição 1:50).....43

Figura 13: Seleção de populações de células HEK293-3F6 estáveis produtoras de VLPs de Zika. Concentração de células viáveis (círculos) e viabilidade celular (quadrados) de pools transfectados com as construções lecc3 e 5-7 (A) e lecc8-10 e leccmut (B). (C) Expressão de VLPs das construções lecc3, lecc5-10 e leccmut entre 1 e 6 semanas pós-transfecção (p.t.). Proteína E de Dengue foi utilizada como controle positivo (25 µg/mL). Soro de camundongos imunizados com plasmídeo contendo prME de ZIKV como anticorpo primário (diluição 1:50).....44

Figura 14: Perfil cinético do cultivo das populações estáveis produtoras de VLPs de Zika em frascos agitados no modo batelada. (A) Concentração de células viáveis (círculos não preenchidos) e viabilidade celular (quadrados preenchidos) das populações estáveis. (B) Concentração de glicose (Glc) (círculos não preenchidos) e lactato (Lac) (quadrados preenchidos).....47

Figura 15: Detecção por *spot blot* de VLPs expressas por diferentes populações estáveis cultivadas em modo batelada. Utilizou-se o 4G2 como anticorpo primário para detecção das populações, com exceção das amostras referentes à população HEK293-leccmut, para a qual a análise por imunoensaio foi realizada utilizando soro de camundongos imunizados com plasmídeo contendo prME de ZIKV como anticorpo primário (diluição 1:50).....49

Figura 16: Imunoensaio do tipo dot blot confirmando aumento da produção de VLPs por células que passaram pelo procedimento de enriquecimento por FACS. O anticorpo monoclonal 4G2 foi utilizado como anticorpo primário nos ensaios. (A) Células HEK293-lecc3 foram mantidas em cultivo por mais de 20 semanas após a transfecção e pode ser observada produção de VLPs similar para amostras coletadas 6 e 21 semanas p.t. Parte da suspensão celular foi mantida na ausência do agente de seleção (G418) a partir da semana 16 p.t. e, novamente, observou-se expressão de VLPs similar às amostras de 6 e 21 semanas p.t., ambas na presença de G418 sulfato. (B) Expressão de VLPs obtida por células HEK293-lecc9 que passaram ou não pelo enriquecimento. (C) Avaliação da estabilidade da expressão de VLPs pela população HEK293-lecc9 (não-enriquecida) na presença do agente de seleção (retângulo com linha contínua). Células mantidas na ausência do agente de seleção a partir da semana 11 também mostram estabilidade na produção de VLPs (retângulo com linha pontilhada). Como controle positivo, utilizou-se proteína E de Dengue em diferentes concentrações.....51

Figura 17: Produção de VLPs por células HEK293-lecc3 (enriquecidas) cultivadas em tubos agitados nos modos de operação batelada e pseudoperfusão. (A) Concentração de células viáveis e viabilidade durante o cultivo das células nas diferentes condições. (B) Concentração de glicose (Glc) e proporção de meio trocado em volume de meio fresco adicionado por volume de trabalho por dia (vvd). As estratégias de alimentação foram iniciadas no dia 4 e amostras foram retiradas diariamente antes e após a realização da troca de meio de cultivo. (C) *Spot blot* das amostras de sobrenadante coletadas entre os dias 0 e 13 do cultivo, realizado com o anticorpo primário 4G2. (D) Concentração de VLPs obtida para células cultivadas em batelada ou em pseudoperfusão, determinada por meio de análise de imagem e densitometria do spot blot mostrado em (D).....54

Figura 18: Produção de partículas pseudovirais de Zika por células HEK293-lecc3 (enriquecidas) em perfusão. (A) Concentração de células viáveis (círculos) e viabilidade durante o cultivo em biorreator. (B) Concentrações de glicose (círculo preto) e lactato (quadrado cinza) e taxa de perfusão (vvd) durante a corrida em perfusão, dada em volume de meio fresco por volume de vaso por dia. (C) Concentração de VLPs medidas no biorreator (quadrados) e na coleta (círculos) em termos de proteína E. Os resultados confirmam a retenção do produto no interior do biorreator devido ao uso do sistema XCell™ ATF-2.....57

Lista de Tabelas

Tabela 1: Tipos de vacinas disponíveis no mercado ou em desenvolvimento e seus patógenos alvo.....6

Tabela 2: Exemplos de vacinas virais recombinantes aprovadas para uso humano.....12

Tabela 3: Exemplos de equipamentos de retenção celular e seus princípios de separação.....21

Tabela 4: Linhagens celulares utilizadas na etapa de otimização do processo de transfecção. As células foram mantidas em condições controladas, sendo diluídas a cada 3-4 dias.....24

Tabela 5: Linhagens celulares, reagentes de transfecção e meios de cultivo utilizados para definição do protocolo de transfecção. As linhagens foram cultivadas em seus respectivos meios até o início do processo de transfecção, quando foram centrifugadas e ressuspendidas no meio a ser avaliado.....28

Tabela 6: Concentração máxima de células viáveis ($X_{v_{máx}}$), taxa específica de crescimento na fase exponencial (μ_{exp}) e tempo de duplicação para cada população estável no experimento de cultivo em batelada, de acordo com as equações 2 e 3.....48

Tabela 7: Comparação da concentração máxima de células viáveis ($X_{v_{(máx)}}$), concentração máxima de produto obtida ($P_{máx}$) e produtividade volumétrica máxima (P_v) obtidas a partir do cultivo de células HEK2l3-lecc3 (enriquecidas) em batelada, pseudoperfusão e perfusão.....59

1. INTRODUÇÃO

Desde o final do século XVIII, o desenvolvimento de vacinas tem mostrado fundamental importância para diminuir ou evitar o contágio de pessoas com patógenos. Os experimentos realizados no final do século XVIII por Edward Jenner foram um marco na história da vacinologia e serviram como pontapé inicial para a elaboração de diversos produtos, os quais foram capazes de erradicar doenças letais como a varíola (RIEDEL, 2005).

Atualmente, estão disponíveis no mercado vacinas para prevenção de mais de 25 doenças infecciosas, como cólera, sarampo, hepatite B, influenza, rubéola, caxumba, tuberculose e febre amarela (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019a) e estima-se que o valor anual de venda destes produtos vá ultrapassar 40 bilhões de dólares em 2024 (EVALUATE LTD, 2018). Entretanto, apesar de esforços da comunidade científica para desenvolver novas vacinas, doenças causadas por patógenos como o vírus Zika ainda não possuem produto aprovado para uso humano.

O vírus Zika (ZIKV), até então conhecido por causar epidemias isoladas em 2007, na Ilha de Yap, e em 2013, na Polinésia Francesa, ganhou notoriedade em 2015, quando um grande surto foi reportado no Brasil. Evidências científicas, que relacionaram a infecção pelo ZIKV a casos de Síndrome de Guillain-Barré em adultos e à ocorrência de mal-formações congênitas em fetos de mães infectadas, levaram a Organização Mundial de Saúde (do inglês *World Health Organization*) a declarar em fevereiro de 2016 que o vírus representava uma Emergência de Saúde Pública de Preocupação Internacional (CAO-LORMEAU et al., 2016; DUFFY et al., 2009; LANCIOTTI et al., 2008; OEHLER et al., 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a).

Nos dias atuais, há risco de transmissão de ZIKV em mais de 90 países, territórios ou áreas subnacionais (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2018) e mais de 40 candidatos à plataforma vacinal estão sob investigação (LIN et al., 2018; MORABITO e GRAHAM, 2017; WILDER-SMITH et al., 2018).

Partículas pseudovirais (do inglês *virus-like particles*, VLPs) são estruturas tridimensionais constituídas por proteínas pertencentes à estrutura do vírus, expressas na forma recombinante. VLPs não contêm o genoma viral e são, em geral, altamente imunogênicas, pois apresentam em sua superfície o antígeno de forma repetitiva, desencadeando uma resposta imune (CHACKERIAN, 2007; FUENMAYOR et al., 2017; ROLDÃO et al., 2010). Dois

diferentes trabalhos demonstraram que a imunização de camundongos com diferentes construções de VLPs de Zika levaram à indução eficaz de anticorpos neutralizantes, revelando o potencial desta plataforma como candidata vacinal. Em ambos os trabalhos, as partículas pseudovirais são formadas por proteínas estruturais do vírus (BOIGARD et al., 2017; ESPINOSA et al., 2017). Contudo, nestes trabalhos as VLPs foram produzidas por transfecção transiente, sendo pouco provável seu uso como plataforma para produção em larga escala.

A possibilidade de desenvolver linhagens celulares recombinantes estáveis produtoras de VLPs representa uma possível plataforma para a produção de uma vacina com preço acessível, já que reduziria de forma considerável os altos custos relacionados ao DNA (do inglês *deoxyribonucleic acid*) e aos reagentes de transfecção necessários à produção em larga escala de proteínas recombinantes e VLPs por meio de transfecção transiente. Além disso, a expressão estável possibilita o uso de processos de cultivo celular contínuos com reciclo celular (perfusão), os quais permitem a operação em altas densidades celulares e em estado estacionário. Desta forma, as células são mantidas em condições ambientais adequadas estáveis, implicando em melhorias na produtividade do processo, na redução de custos e em alta qualidade do produto (CASTILHO, 2015; GOUDAR et al., 2015; GUTIÉRREZ-GRANADOS et al., 2018).

Neste trabalho, uma plataforma para a produção de VLPs de Zika foi proposta, sendo baseada no desenvolvimento de linhagens recombinantes de células HEK293-3F6 estáveis que expressam constitutivamente estas partículas. Além disso, subpopulações enriquecidas destas células, selecionadas com auxílio de FACS (do inglês *Fluorescence Activated Cell Sorting*), foram obtidas e empregadas na produção de partículas pseudovirais de Zika. Inicialmente, tais estudos foram desenvolvidos em frascos agitados em pequena escala e, posteriormente, em biorreator de tanque agitado operado em modo perfusão, utilizando o como equipamento de retenção celular o filtro tangencial alternado XCell™ ATF-2.

Embora outras plataformas estejam sendo propostas para desenvolvimento de vacinas para o vírus Zika, tais como vacinas de vírus inteiro ou de DNA, acredita-se que VLPs sejam uma plataforma promissora e que esta seja a primeira a mostrar a expressão estável de VLPs de Zika e, ainda, sua produção utilizando biorreator operado em perfusão. Ambas as estratégias de expressão estável e intensificação de processos por operação em perfusão são ferramentas efetivas para aumentar a produtividade volumétrica e melhorar o custo-benefício desta plataforma, adicionando vantagens àquelas já conhecidas para vacinas baseadas em VLPs, como sua segurança e imunogenicidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Vacinas

O desenvolvimento de vacinas teve início no final do século XVIII, a partir de experimentos realizados por Edward Jenner. Após inocular o material da ferida de pessoas contaminadas por varíola bovina em uma criança saudável, Jenner observou o desenvolvimento de uma forma branda da doença e, em exposições posteriores, o contato com material biológico contaminado pelo patógeno humano não levou o menino a adquirir os sintomas característicos da varíola (RIEDEL, 2005; STEWART e DEVLIN, 2006).

Quase um século após tal estudo, Louis Pasteur desenvolveu uma antitoxina para raiva, considerada por ele na época como uma vacina, e definiu o termo vacina como uma suspensão de microrganismos vivos, atenuados ou inativados ou de suas frações, administrados para induzir a imunidade e prevenir doenças infecciosas e suas sequelas (STERN e MARKEL, 2005).

Vacinas consistem tipicamente de uma formulação que contém estruturas semelhantes ao seu agente causador, e é composta por formas inativas ou atenuadas do microrganismo, suas toxinas ou proteínas da superfície do mesmo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019b).

Por estimularem a defesa do hospedeiro contra um patógeno específico e gerarem memória imunológica, protegendo os indivíduos imunizados em caso de possível futuro contato com o patógeno, as vacinas previnem as doenças, evitando internações, tratamentos e mortes (CUNNINGHAM et al., 2016). Portanto, as vacinas são vistas atualmente como uma das ferramentas de melhor relação custo-benefício para a saúde pública (DI PASQUALE et al., 2016).

Desde o desenvolvimento da primeira vacina, diversos avanços na área de vacinologia foram alcançados, permitindo um desenvolvimento racional em contraposição ao empirismo empregado inicialmente, quando ensaios em humanos foram realizados antes de qualquer estudo de segurança ou eficácia de candidatos vacinais (PLOTKIN, 2014).

2.1.1. Tipos de vacina

As primeiras vacinas basearam-se no uso da partícula viral inteira, inativada ou atenuada, sendo a última uma forma menos virulenta do organismo que poderia gerar uma resposta imune sem deflagrar a doença propriamente dita ou deflagrando uma forma mais branda da mesma. De fato, o vírus inteiro é altamente imunogênico e estimula resposta similar à que ocorre durante a infecção natural, mas é preciso confirmar a eficácia (que a imunidade confira efetivamente proteção) e a segurança (que não haja efeitos adversos graves e nem que uma resposta imune exacerbada seja desencadeada no indivíduo) (CUNNINGHAM et al., 2016).

O avanço da tecnologia e do conhecimento permitiram, ao longo do tempo, o desenvolvimento de antígenos específicos, capazes de estimular respostas imunes eficazes e persistentes e minimizar reações adversas, como no caso de vacinas formadas por subunidades ou toxóides, vacinas conjugadas ou recombinantes (CUNNINGHAM et al., 2016). Esforços têm sido feitos para desenvolver vacinas de DNA e baseadas em vetores virais, mas até o momento não existem produtos destes tipos aprovados para uso humano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019b). A Tabela 1 exemplifica as diferentes plataformas vacinais possíveis e exemplos de vacinas aprovadas para uso humano ou em fase avançada de testes clínicos.

De acordo com MOSER e LEO (2010), é essencial para uma vacina que a administração da mesma gere memória imunológica e que a resposta imune, caso haja um novo contato com o patógeno, seja amplificada. Em geral, observa-se que vacinas modernas são formadas por componentes subcelulares provenientes do patógeno ou por suas respectivas proteínas recombinantes, representando formulações antigênicas mais seguras e com bom custo-benefício.

No desenvolvimento de vacinas, deve-se considerar as características do antígeno e como o sistema imune reage ao mesmo, a população alvo a ser vacinada e a melhor tecnologia para produção da vacina (NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES, 2012).

Tabela 1: Tipos de vacinas disponíveis no mercado ou em desenvolvimento e seus patógenos alvo.

Tipo de vacina	Exemplo de vacina aprovada para uso humano (ou em fase avançada de testes)
Patógeno inteiro: atenuada	Febre amarela
	Influenza
	Tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola)
Patógeno inteiro: inativada	Hepatite A
	Influenza
	Vírus da Raiva
Subunidade	Hepatite B
Toxóide	Difteria
	Tétano
Conjugada	Haemophilus influenzae tipo b (Hib)
Vacina de DNA	Zika (fase IIb de estudo clínico)
Vacina de mRNA	Zika (fase II de estudo clínico)
Recombinante	HPV (vírus do papiloma humano)

Fonte: NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES (2012); U.S. DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES (2017); NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (2019).

2.1.2. Aspectos mercadológicos

Pelo fato de vacinas serem administradas em um grande número de indivíduos saudáveis, estas formulações são um dos produtos médicos mais sensíveis ao preço, dependendo de fatores como a população alvo, a demanda e a plataforma de produção. Desta forma, é importante que a tecnologia envolvida no processo seja economicamente viável, e que o produto seja seguro e eficaz (CUNNINGHAM et al., 2016).

O mercado de vacinas pode ser considerado concentrado, visto que mais de 70% das vendas mundiais são dominadas pelas empresas Pfizer, Merck, Sanofi e GlaxoSmithKline (LA

VIGNE, 2016). Dados mostram que as vacinas representam a quarta maior área da indústria farmacêutica em termos de vendas, tendo atingido valor mundial de 27,7 bilhões de dólares em 2017. A previsão é que tal valor ultrapasse 40 bilhões de dólares em 2024 (EVALUATE LTD, 2018). Ressalta-se, ainda, que o segundo produto vacinal mais vendido atualmente no mundo é o Gardasil (Merck), o qual é utilizado para prevenção de HPV e tem origem recombinante, sendo constituído por partículas pseudovirais. O valor de vendas mundial deste produto atingiu 2,4 bilhões de dólares em 2017 e a projeção é que este valor ultrapasse 3,2 bilhões de dólares em 2024 (EVALUATE LTD, 2018), o que confirma o potencial do uso de VLPs como plataforma vacinal.

Apesar de o mercado ser dominado por fabricantes situados em países desenvolvidos, há diversas razões para que países em desenvolvimento se preocupem em estabelecer capacidade de produção, visto que o controle da produção pode garantir o controle de custos, de oferta e garantir que o calendário de vacinação seja cumprido. Entretanto, o alto custo de produção, o tempo e a capacidade técnica requeridos para obtenção de tais produtos são fatores limitantes para o estabelecimento da produção em países com menor nível de desenvolvimento sócio-econômico (PLOTKIN et al., 2017). Atualmente, o Brasil distribui 25 tipos de vacina e exporta doses para mais de 70 países, principalmente da África. A produção brasileira é realizada pela Fundação Oswaldo Cruz e pelo Instituto Butantan e, considera-se o país autossuficiente na produção de imunobiológicos (GOVERNO DO BRASIL, 2017)

Mesmo com a estimativa de crescimento no valor global de vendas, pode-se dizer que existem barreiras econômicas para o desenvolvimento e produção de vacinas em mercados de diversos países, sendo este cenário mais agravado quando se trata de países em desenvolvimento. Os riscos relacionados à obtenção de financiamento, à demanda e ao baixo preço de venda unitário de vacinas, além dos motivos técnicos citados anteriormente, criam tais barreiras econômicas e diminuem a inovação existente na área (BATSON, 2005).

Entretanto, em vista do aumento do risco de infecção por novos patógenos ou ressurgimento de casos causados por microrganismos já conhecidos, é essencial que novas plataformas vacinais sejam desenvolvidas e que países em desenvolvimento se envolvam neste esforço.

2.2. O vírus Zika

2.2.1. Histórico

O vírus Zika pertence ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae* e foi isolado pela primeira vez de macacos *Rhesus* em 1947 em Uganda, África (DICK et al., 1952). Apesar de estudos sorológicos terem detectado casos isolados de infecção na África e no sudeste da Ásia, o primeiro surto provocado por Zika foi reportado em abril de 2007 nas Ilhas Yap, Estados Federados da Micronésia. Os principais sintomas observados apresentavam semelhança com uma infecção por influenza, sendo caracterizados por conjuntivite, febre, dores no corpo, cansaço e erupções cutâneas (DUFFY et al., 2009; LANCIOTTI et al., 2008).

Posteriormente, em 2013, uma nova epidemia, de maior porte, foi reportada na Polinésia Francesa e, pela primeira vez, sintomas mais graves foram detectados, sendo sugerida a relação entre a infecção por Zika e a ocorrência da síndrome de Guillain-Barré em adultos (CAO-LORMEAU et al., 2016; OEHLER et al., 2014). Em 2015, uma epidemia ainda maior teve início no Brasil, sendo provado que a infecção pelo vírus em mulheres grávidas pode levar à microcefalia em fetos, retardamento do crescimento intrauterino, outros tipos de mal-formação congênita e até mesmo morte fetal (ABBINK et al., 2016; CALVET et al., 2016; HEUKELBACH et al., 2016).

O vírus Zika pode ser transmitido pela picada de mosquitos do gênero *Aedes* infectados, principalmente pelas espécies *Aedes africanus* e *Aedes aegypti* (LANCIOTTI et al., 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Adicionalmente, há evidências que indicam a transmissão de ZIKV pela via sexual, por transfusões sanguíneas e transplante de órgãos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). A longa persistência do vírus em fluidos corporais implica em aumento do risco de infecção em países não endêmicos, considerando-se a grande mobilidade de pessoas no mundo nos dias atuais (D'ORTENZIO et al., 2016; HILLS et al., 2016; McCARTHY, 2016).

Devido às graves complicações que o vírus Zika pode gerar, a *World Health Organization* (WHO – Organização Mundial de Saúde) declarou que o vírus representa uma Emergência de Saúde Pública de Preocupação Internacional em fevereiro de 2016 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a). Após isso, a comunidade científica passou a priorizar o desenvolvimento de plataformas para profilaxia, tratamento e diagnóstico da infecção por Zika (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016b) e, em pouco tempo, mais de 40 candidatos à

vacina chegaram a estudos não-clínicos e clínicos (MORABITO e GRAHAM, 2017; WILDER-SMITH et al., 2018). Atualmente, ainda há risco de transmissão de ZIKV em 90 países, territórios ou áreas subnacionais (Figura 1) (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2018).

Figura 1: Áreas do mundo com risco de infecção por Zika. Adaptado de CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2018).

De acordo com BARRETT (2018), quatro tipos de vacinas encontram-se em estudos clínicos, a citar-se três formulações baseadas em DNA, uma baseada em RNA modificado, quatro formuladas a partir do vírus purificado inativado e uma baseada no uso do vírus do sarampo como vetor. Dentre estas, duas vacinas de DNA e uma baseada no vírus inativado mostraram segurança e foram capazes de induzir anticorpos neutralizantes em humanos (GAUDINSKI et al., 2018; MODJARRAD et al., 2017).

2.2.2. Características do vírus Zika

ZIKV é um vírus envelopado, de morfologia icosaédrica, com aproximadamente 50 nm de tamanho, e possui genoma de fita simples positiva de RNA (do inglês *ribonucleic acid*) com cerca de 11000 nucleotídeos. Em todos os flavivírus, o genoma codifica uma poliproteína que é clivada por proteases do vírus e do hospedeiro em três proteínas estruturais e sete proteínas não-estruturais (Figura 2A) (CASALE et al., 2018; HADDOW et al., 2012).

A parte N-terminal da poliproteína é formada pelas proteínas estruturais capsídeo (C), pré-membrana/membrana (prM/M) e envelope (E). A montagem da partícula viral envolve a interação entre prM e E, levando à formação de heterodímeros no retículo endoplasmático, com concomitante encapsulamento do RNA pela proteína C. Posteriormente, a bicamada lipídica da célula hospedeira contendo prM e E envolve o capsídeo contendo o RNA e forma vírions imaturos. A clivagem de prM em M por furinas intracelulares promove a maturação da partícula viral e sinaliza para a liberação da mesma para o meio extracelular (Figura 2B) (LIN et al., 2018; HADDOW et al., 2012).

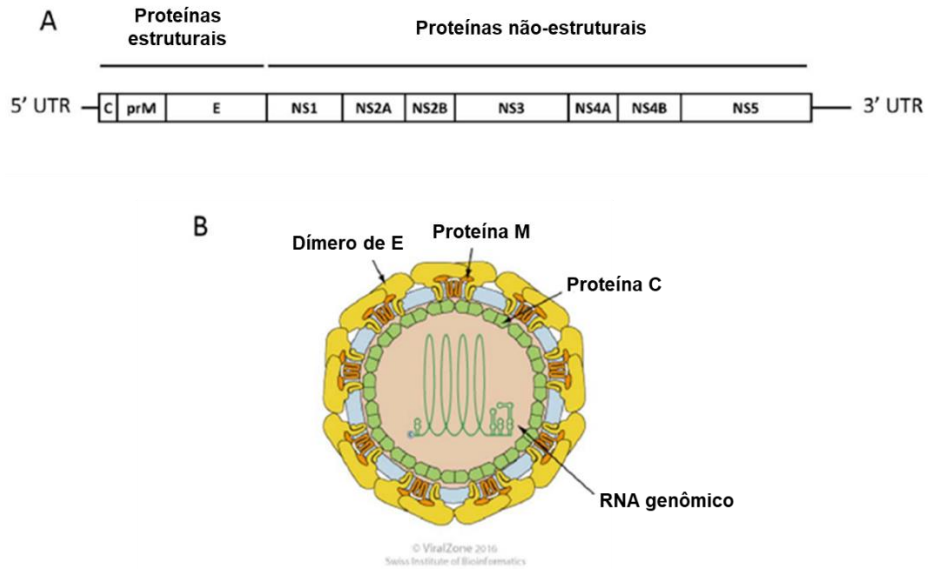


Figura 2: (A) RNA de fita simples e polaridade positiva do ZIKV codifica poliproteína contendo três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). (B) Partícula de ZIKV envelopada contendo proteínas M (laranja) e E (amarelo) dispostas em sua superfície em forma icosaédrica e RNA genômico envolto por proteínas do capsídeo (verde). Adaptado de VIRALZONE – SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS (2016).

A proteína E é a principal estrutura relacionada à ligação e fusão do vírus com a célula hospedeira e apresenta três domínios, sendo o domínio III um importante epítopo alvo de anticorpos neutralizantes. Já o domínio II contém o loop de fusão, o qual é altamente conservado entre os diferentes flavivírus, podendo ser o epítopo reconhecido por anticorpos gerados contra diferentes espécies de tal gênero, causando reatividade cruzada entre flavivírus (LIN et al., 2018; MORABITO e GRAHAM, 2017).

A porção C-terminal da poliproteína contém sete proteínas não estruturais que atuam na replicação viral. NS1 é uma proteína envolvida com a evasão da imunidade inata e se associa a complexos de replicação. Já NS3 e seu cofator, NS2B, codificam a protease responsável por processar a porção não estrutural da poliproteína, tendo ainda função de helicase e nucleosídeo

trifosfatase. Assim como NS1, NS4B também auxilia na evasão da resposta imune. NS5 atua como uma RNA polimerase dependente de RNA e ainda atua antagonizando a resposta por interferon tipo I, envolvida na degradação proteossomal (LIN et al., 2018).

2.2.3. Uso de partículas pseudovirais como plataforma vacinal

Partículas pseudovirais ou VLPs são estruturas tridimensionais constituídas por proteínas recombinantes da estrutura do vírus e não contém o material genético viral. Pelo fato de serem tridimensionais e apresentarem em sua superfície proteínas dispostas de forma repetitiva, as VLPs são capazes de estimular respostas imunes celulares e humorais eficazes, além de serem antigenicamente indistinguíveis do vírus nativo (CHACKERIAN, 2007; FUENMAYOR et al., 2017; ROLDÃO et al., 2010).

O uso de VLPs como plataforma vacinal pode ser considerado atrativo, visto que apresentam a segurança necessária para administração em populações com características diversas, incluindo mulheres grávidas, e podem ser produzidas em laboratórios com baixo nível de biossegurança, visto que são partículas não infecciosas (WILDER-SMITH et al., 2018).

Como dito anteriormente, grande parte das vacinas disponíveis são baseadas em formulações constituídas pelo vírus inteiro, atenuado ou inativado, e induzem resposta imune eficaz, mas sua administração pode levar a graves reações adversas ou mesmo à reversão do estado atenuado dos vírus para a forma mais virulenta, o que traz preocupações quanto à sua segurança, como ocorrido nos casos de poliomielite associados à administração da vacina (TEIXEIRA-ROCHA et al., 2005). Adicionalmente, a produção de vírus *in vitro* pode ser um desafio frente às dificuldades de escalonamento, controle de qualidade e processamento do material produzido (CHACKERIAN, 2007). Já as vacinas de segunda geração, como toxóides e vacinas de subunidades, representam opções mais seguras por não serem formadas pelo patógeno inteiro, mas em geral resultam em resposta imune menos eficaz em comparação às vacinas clássicas (CIMICA e GALARZA, 2017).

Pode-se dizer que o uso de VLPs como plataforma vacinal combina as vantagens de utilizar partículas virais inteiras, desencadeando uma resposta imune robusta, e de vacinas de subunidades, as quais são constituídas por antígenos que podem ser produzidos de forma recombinante (CHACKERIAN, 2007; NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES, 2012).

A tecnologia do DNA recombinante permitiu a produção *in vitro* de diversas proteínas recombinantes que estão atualmente disponíveis no mercado para uso humano e, dentre estas, pode-se citar as vacinas virais aprovadas para uso humano (Tabela 2) (CIMICA e GALARZA, 2017; WALSH, 2018). A possibilidade de produzir as proteínas estruturais do vírus de forma recombinante permite ainda inserir modificações pontuais, de forma a melhorar sua estabilidade, maximixar sua imunogenicidade e melhorar a interação com células mediadoras da imunidade, por exemplo (FRIETZE et al., 2016). Adicionalmente, mutações podem ser introduzidas para modificar epítopos que são conservados em diferentes vírus.

Tabela 2: Exemplos de vacinas virais recombinantes aprovadas para uso humano.

Alvo	**Sistema de expressão**	**Nome comercial**
HPV	Baculovírus	Cervarix (GSK)
	Levedura	Gardasil (Merck)
Hepatite B	Levedura	Engerix-B (GSK)
	Levedura	Recombivax HB (Merck)
	Célula de mamífero	GenHevac B (Pasteur)
	Levedura	Fendrix (GSK)
	Levedura	Heplisav-B (Dynavax Technologies)
Hepatite E	Bactéria	Hecolin (Xiamen Innovax Biotech)
Influenza	Célula de inseto	FluBlok (Protein Science)

Adaptado de CIMICA e GALARZA (2017) e WALSH (2018).

Além das vacinas virais recombinantes já aprovadas para uso humano descritas na Tabela 2, há outras em estudos pré-clínicos ou clínicos. Dentre elas, dois diferentes trabalhos mostraram que a administração de diferentes construções de VLPs de Zika em camundongos levou à indução eficiente de anticorpos neutralizantes, corroborando o potencial de VLPs como plataforma vacinal para vírus Zika (BOIGARD et al., 2017; ESPINOSA et al., 2017).

Visto que já foi demonstrado que a expressão das proteínas prM e E é suficiente para formar VLPs de diferentes flavivírus *in vitro* e que os epítopos reconhecidos por anticorpos

neutralizantes encontram-se principalmente na proteína E (PIERSON et al., 2008; PIJLMAN, 2015), escolheu-se tais proteínas para compor VLPs de Zika no presente trabalho.

Diferentemente das VLPs expressas por BOIGARD e colaboradores, o desenho das VLPs prM-E desenvolvidas no Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares não contém a proteína do capsídeo. Apesar de tal proteína ter papel na estabilidade da partícula pseudoviral, é possível que sua co-expressão com as outras proteínas estruturais leve à internalização de RNA da célula hospedeira durante a formação das VLPs *in vitro* (PAUL e BARTENSCHLAGER, 2013), o que poderia ser um aspecto negativo do ponto de vista regulatório.

2.3. Produção de vacinas recombinantes e partículas virais

2.3.1. Uso de células de mamíferos

A tecnologia do cultivo de células animais teve origem no final do século XIX e evoluiu consideravelmente até seu uso comercial para fins de obtenção de produtos biofarmacêuticos nas últimas décadas. Inicialmente, esta tecnologia foi usada como ferramenta para investigação do comportamento de diferentes células e tecidos *in vitro*, sendo posteriormente utilizada no desenvolvimento de processos para produção de vacinas (OZTURK, 2005).

A aceitação de linhagens celulares contínuas por parte das agências regulatórias foi um marco, já que o uso destas células traz vantagens para a elaboração de processos produtivos robustos e eficientes. Características como a capacidade de se multiplicar *in vitro* por longos períodos sem alterações genéticas e morfológicas que comprometam o produto final, além da possibilidade do cultivo em suspensão tornam o escalonamento em biorreatores mais atrativo (OZTURK, 2005).

Nos últimos anos, a investigação do uso de células de mamíferos como plataforma para produção de vacinas tem aumentado (PETIOT et al., 2015). Estas células têm capacidade de expressar proteínas com o correto enovelamento e modificações pós-traducionais, que são críticos para sua estabilidade e eficácia (WURM, 2004). Em geral, sistemas de expressão mais simples como bactérias e leveduras são utilizados para produção de proteínas menores e de baixa complexidade.

Tem sido reportado na literatura o uso das linhagens celulares de mamíferos BHK-21 (sigla do inglês *Baby Hamster Kidney*), HEK293 (sigla do inglês *Human Embryonic Kidney*),

MDCK (sigla do inglês *Madin-Darby Canine Kidney*) e Vero (células do rim de macaco verde africano) para a produção de partículas virais a serem empregadas como vacinas ou como vetores virais, a citar-se a produção dos vírus da influenza em células HEK293 e MDCK (PETIOT et al., 2011; TAPIA et al., 2014) e Zika em BHK-21 e Vero (NIKOLAY et al., 2018b); de VLPs de influenza (VENEREO-SANCHEZ et al., 2017), de VLPs de HIV (sigla do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) (FUENMAYOR et al., 2018) e VLPs do vírus da raiva (FONTANA et al., 2015) e de vetores virais baseados em lentivírus (ANSORGE et al., 2009; MANCEUR et al., 2017) e em adenovírus (HENRY et al., 2004; LESCH et al., 2015).

O uso de células HEK293, provenientes de rim humano embrionário, tem sido reportado há mais de 30 anos como sistema hospedeiro para produção de vírus, partículas pseudovirais e vetores virais (PETIOT et al., 2015). No caso da produção de VLPs, células HEK293 se comportam de forma eficiente para expressar e secretar as partículas em tamanho e morfologia similar aos respectivos vírus nativos (ZELTINS, 2013).

Adicionalmente, o uso de uma linhagem celular humana para a produção de VLPs de Zika pode ser vantajoso, visto que as mesmas são envelopadas e a membrana lipídica da célula hospedeira é usada durante a montagem e secreção das partículas (LUA et al, 2014).

2.3.1.1. O metabolismo de células de mamíferos e os meios de cultivo

O metabolismo de células de mamíferos quando cultivadas *in vitro* é considerado alterado em relação ao observado *in vivo*, caracterizado pelo consumo elevado e ineficiente de fontes de carbono, nitrogênio e energia, em especial de glicose e glutamina. Isto leva à produção de metabólitos indesejados como lactato, amônio, alanina, aspartato e glicina. O acúmulo de lactato e amônio pode limitar o crescimento celular, ativar processos apoptóticos e levar à perda da qualidade da proteína recombinante produzida (ALTAMIRANO et al., 2013).

Quando *in vivo*, células animais recebem os nutrientes por meio de fluidos fisiológicos e, por isso, as primeiras tentativas de cultivo basearam-se na utilização de fluidos biológicos como plasma, linfa e soro (MORAES et al., 2008). Ao passar dos anos, soro e outras substâncias provenientes de animais foram retirados da formulação dos meios de cultivo e teve início o uso de linhagens celulares contínuas, as quais apresentam requerimentos nutricionais menos complexos (OZTURK, 2005).

O desenvolvimento de meios livres de soro foi impulsionado pelo risco elevado de transmissão de patógenos, como vírus e príons, encontrados em material sanguíneo, como o soro de animais. No início, as formulações dos meios livres de soro incluíam hidrolisados de planta, como peptona de soja, além de extratos de levedura para melhores resultados de crescimento celular. Após extensivos estudos foram desenvolvidos meios de cultivo quimicamente definidos contendo proteínas recombinantes ou totalmente isentos de proteínas, aos quais não era necessária a adição de quaisquer extratos (YAO e ASAYAMA, 2017). Além de diminuir os riscos de contaminação por patógenos, o uso de meios quimicamente definidos permitiu a simplificação dos processos de purificação e recuperação de biomoléculas, reduzindo os custos e a complexidade do processo produtivo (BANDARANAYAKE e ALMO, 2014).

Os meios quimicamente definidos são compostos por nutrientes necessários para realização do metabolismo celular. Entretanto, comumente é feita a adição de suplementos que atuam melhorando o crescimento celular e a qualidade do produto de interesse, além de promover aumento na produtividade específica. Adicionalmente, diferentes estratégias de alimentação são estudadas a fim de otimizar o crescimento celular. (MORAES et al., 2008).

2.3.2. Geração de linhagens celulares recombinantes

Partículas pseudovirais são produzidas a partir da transfecção de células com o DNA plasmidial contendo a sequência dos genes que codificam as proteínas de interesse. A maquinaria celular é utilizada para a produção proteica a partir da transcrição do material genético transfectado, que pode ou não ser integrado ao DNA cromossomal da célula hospedeira (FUENMAYOR et al., 2017).

Quando se utiliza a metodologia de transfecção transiente, o DNA exógeno chega ao núcleo celular e o produto de interesse é expresso por alguns dias ou semanas após a transfecção, sendo considerado um processo rápido. (CERVERA et al., 2013). Como apenas uma pequena proporção das células incorpora o DNA exógeno, variações negativas na expressão relacionadas ao sítio de integração no genoma são minimizadas e, assim, maiores concentrações de produto podem ser obtidas por transfecção transiente em comparação à transfecção estável (BOLLATI-FOGOLÍN e COMINI, 2008).

Este processo se torna atrativo quando é necessário realizar uma caracterização inicial de diferentes construções gênicas, para gerar produto a ser utilizado em estudos pré-clínicos ou quando tal expressão é citotóxica para a célula, dificultando a geração de linhagens celulares estáveis (CERVERA et al., 2013). Além disso, pode-se utilizar esta metodologia para casos onde o antígeno de interesse sofre constantes mutações em sua forma selvagem, requerendo frequente alteração na composição da VLP produzida (FUENMAYOR et al., 2017). Entretanto, a transfecção transiente apresenta pontos negativos, como a grande quantidade de DNA plasmidial e de reagente de transfecção necessários (BANDARANAYAKE e ALMO, 2014).

Alternativamente, na expressão estável ocorre a integração dos genes de interesse no genoma da célula hospedeira, e os níveis de expressão passam a ser influenciados por fatores como a eficiência de transfecção, a frequência e a posição de integração no genoma e o método de seleção de células produtoras. Neste sistema, existe a necessidade de identificar e selecionar células onde houve integração no genoma e isso pode ser feito, por exemplo, por meio da expressão de uma sequência que codifica um ou mais genes marcadores. Uma variedade de sistemas está disponível para seleção de células transfectadas, incluindo a resistência a antibióticos como neomicina, higromicina e puromicina. (WURM, 2004).

Dependendo da linhagem celular, do produto recombinante e do tipo de sistema de seleção usado, os níveis de expressão do produto e a produtividade específica inicial podem não ser ótimos, mas a exposição das células a diferentes concentrações do agente de seleção pode promover aumento destes parâmetros. Deve ser feita a seleção de populações ou clones que apresentem maior produtividade e, após isso, o comportamento de candidatos mais promissores é avaliado, verificando-se neste momento outros parâmetros além da produtividade, como a qualidade do produto e a estabilidade da linhagem. A identificação de células altamente produtoras pode ser um processo longo e trabalhoso e, por isso, é interessante que o processo de seleção seja estringente. Além da produção, é importante avaliar o crescimento celular, visto que a combinação de alta produtividade específica e crescimento rápido pode tornar uma linhagem celular adequada para escalonamento e produção. Por fim, o clone escolhido para a plataforma de produção deve passar por extensiva caracterização e bancos celulares devem ser preparados (LE *et al*., 2015; SHEN *et al.*, 2005; WURM, 2004).

De forma a facilitar a seleção de células com o fenótipo desejado, o uso de técnicas de enriquecimento de células produtoras por citometria de fluxo acoplada a *sorter* tem ganhado importância, pois permite a análise de milhões de células por minuto de forma eficaz, diminuindo o tempo necessário e o trabalho requerido em tal etapa (PRIOLA et al., 2016).

Após definida a sequência do gene de interesse a ser introduzida na célula hospedeira, deve-se escolher o método de transfecção a ser utilizado. Atualmente, dispõe-se de métodos químicos, como uso de policátions ou co-precipitação com fosfato de cálcio; físicos, como eletroporação e vibração molecular induzida por campo elétrico; e biológicos, como lipofecção e transdução viral (BOLLATI-FOGOLÍN e COMINI, 2008; KAESTNER et al., 2015). A escolha do sistema de expressão, da linhagem hospedeira e do método de transfecção tem influência direta na eficiência e no custo do processo de desenvolvimento de linhagens celulares (PRIOLA et al., 2016)

A lipofecção é um método aplicado na área de biologia celular e é baseada no uso de lipídeos catiônicos, os quais têm a cabeça polar carregada positivamente ligada a uma ou duas cadeias de hidrocarbonetos. A cabeça polar interage eletrostaticamente com a região do DNA carregada negativamente, formando uma estrutura lipossomal compacta em soluções aquosas. A interação com a membrana celular é mediada pela carga positiva do lipossomo e, a partir disso, o complexo é endocitado pela célula hospedeira. Diversos lipídeos catiônicos estão disponíveis comercialmente, incluindo lipídeos catiônicos mono ou polivalentes, derivados do colesterol ou compostos contendo guanidina. A lipofecção é considerada um processo simples e com alta reprodutibilidade, sendo aplicável nas etapas de produção de proteínas recombinantes por transfecção estável e transiente (BOLLATI-FOGOLÍN e COMINI, 2008; JÄGER et al., 2014; KAESTNER et al., 2015). Um esquema simplificado do processo de transfecção por lipofecção pode ser observado na Figura 3.

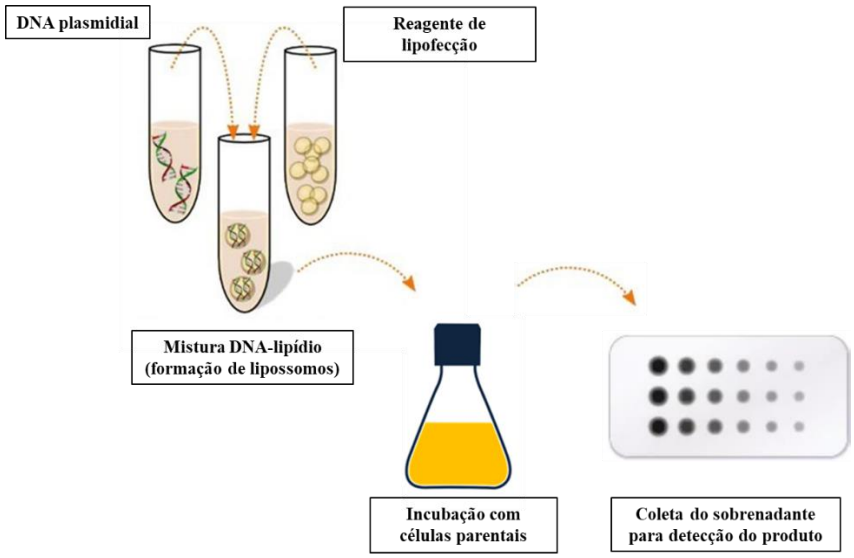


Figura 3: Esquema do procedimento de transfecção por lipofecção. De forma resumida, o DNA plasmidial é incubado com o reagente de lipofecção e, após isso, é transferido para o frasco agitado contendo a suspensão de células parentais. Após 48-72h, é possível coletar material proveniente de tal cultivo celular e avaliar a presença do produto de interesse. Adaptado de OZ BIOSCIENCES (2019).

Idealmente, após a definição da sequência gênica das proteínas a serem expressas, escolha do sistema de expressão e da metodologia de transfecção, procede-se com a transfecção propriamente dita, seleção de populações produtoras e isolamento de clones com melhor crescimento e produtividade específica. De forma a maximizar a produtividade, estratégias de otimização do meio de cultivo e dos parâmetros de produção podem ser realizados (Figura 4) (BANDARANAYAKE e ALMO, 2014).

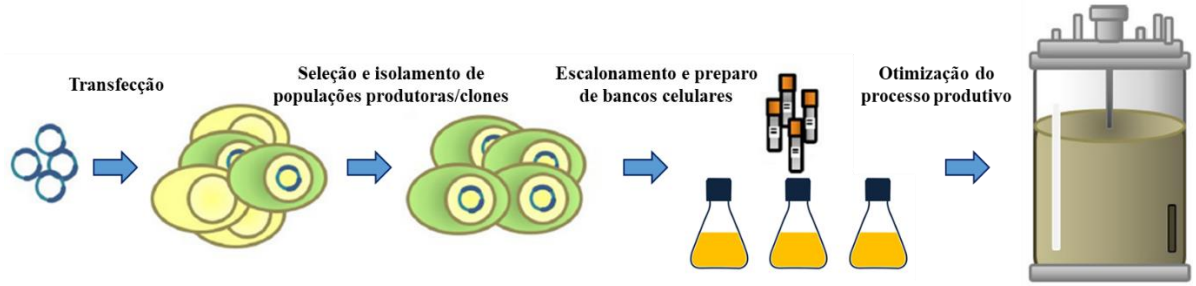


Figura 4: Esquema resumido do fluxograma referente às etapas de geração da linhagem celular, seleção e isolamento de populações produtoras/clones, escalonamento e preparo de bancos celulares e otimização do processo produtivo. Adaptado de BANDARANAYAKE e ALMO (2014).

2.3.3. Otimização das condições de cultivo e produção em biorreatores

Após a etapa de geração da linhagem recombinante e seleção da população/clone a ser utilizado, é interessante que as características celulares sejam avaliadas e que se otimizem as condições de cultivo, de forma a aumentar a produtividade (WURM, 2004). Estudos em frascos podem ser utilizados como ferramentas em pequena escala para suportar o desenvolvimento de processos e auxiliar na operação de processos produtivos para investigação de parâmetros ou resolução de problemas encontrados durante tal etapa (BIELSER et al., 2018).

Adicionalmente, tais estudos podem auxiliar na definição do tipo de biorreator mais adequado para o cultivo da linhagem celular de escolha, dependendo de suas características e requerimentos nutricionais. Nos biorreatores, condições ambientais como pH, teor de oxigênio dissolvido (dO_2), temperatura e agitação podem ser controlados, provendo assim um ambiente otimizado para o crescimento celular e expressão do produto de interesse (CHICO et al., 2008).

Para células cultivadas em suspensão, os biorreatores do tipo tanque agitado são os mais utilizados em processos industriais, visto que são capazes de propiciar um ambiente físico-químico homogêneo para todas as células e apresentam características que facilitam o cultivo de células animais, como boa transferência de gases, fácil monitoramento e operação. Estes

sistemas podem ser operados em qualquer um dos modos de operação discutidos a seguir (WARNOCK e AL-RUBEAI, 2006).

Os modos de operação de um processo de cultivo celular podem ser classificados em descontínuo (batelada), descontínuo alimentado (batelada alimentada) e contínuo com ou sem retenção de células dentro do biorreator (Figura 5). Fatores como a estabilidade da linhagem celular e do produto e demanda do mercado devem ser considerados ao escolher o modo de operação (CHICO et al., 2008).

No modo batelada, a operação é descontínua e realiza-se a inoculação das células em determinado volume de meio, sem qualquer adição ou retirada de substratos durante o cultivo. Nesse caso, a concentração celular aumenta enquanto houver substrato disponível e enquanto os metabólitos secundários não atingirem níveis citotóxicos, e o produto se acumula e é coletado ao final da corrida. A variação da concentração de células é descrita pela Equação 1. Na batelada alimentada, o cultivo também é descontínuo e diferencia-se do processo em batelada simples pela adição de nutrientes específicos ou meio de cultivo concentrado ao longo do tempo, em geral levando a variações do volume de cultivo, que levam ao aumento da produtividade e da concentração celular obtida. A variação da concentração de células é descrita pela Equação 2. Em ambos os modos de operação, o tempo de residência do produto dentro do biorreator é longo, há acúmulo de metabólitos secundários e a produtividade é limitada, mas são sistemas que apresentam complexidade operacional moderada (CHICO et al., 2008; WARNOCK e AL-RUBEAI, 2006).

$$\frac{dX_v}{dt} = \mu X_v \qquad (1)$$

$$\frac{dX_v}{dt} = \mu X_v - \frac{F}{V} X_v \qquad (2)$$

Onde:

X_v: concentração de células viáveis

t: tempo

μ: taxa específica de crescimento

F: vazão da corrente de alimentação

V: volume de trabalho no biorreator

O modo de operação contínuo é operado com adição constante de meio de cultivo fresco e remoção do meio do interior do biorreator, contendo produto, metabólitos secundários, células e componentes do meio de cultivo não consumidos. Como a taxa específica de crescimento (μ) de células animais é baixa, o cultivo operado em modo contínuo sem retenção celular tem que ser operado a vazões de alimentação/remoção de meio de cultivo relativamente baixas, com concentração de células limitada, pois uma taxa de diluição (Equação 3) maior que μ causaria a lavagem do reator. Através de uma pequena remoção controlada de células (*cell bleed*), a qual é independente da vazão de alimentação do biorreator, torna-se possível operar o biorreator sob condições ambientais constantes, em estado estacionário. O modo contínuo com retenção celular, na área de cultivo de células animais, é conhecido como perfusão. Por isto, é importante que se utilizem equipamentos para reter as células dentro do biorreator, de maneira que possa se estabelecer e manter uma elevada concentração celular, mantida pela alimentação de meio de cultivo em altas vazões. A variação da concentração celular neste sistema é descrita pela Equação 4 (CHICO et al., 2008).

A perfusão traz diversas vantagens, como menor tempo de residência do produto no biorreator, remoção contínua de metabólitos tóxicos e maior produtividade volumétrica, mas é considerado um sistema mais complexo tecnologicamente e operacionalmente que os modos descritos anteriormente. Quando comparada à operação nos modos batelada e batelada alimentada, um processo em perfusão é capaz de suportar maiores concentrações celulares por períodos mais longos, gerando maior produtividade volumétrica e permitindo que dada produção seja alcançada utilizando biorreatores em uma escala menor. (CASTILHO, 2015; CHICO et al., 2008).

$$D = \frac{F}{V} \qquad (3)$$

$$\frac{dX_v}{dt} = \mu X_v - \alpha D X_v \qquad (4)$$

Onde:

D: taxa de diluição no biorreator = número de trocas de volume do biorreator por um período de tempo

α: fator de perda de células = concentração celular no perfundido/concentração celular no biorreator

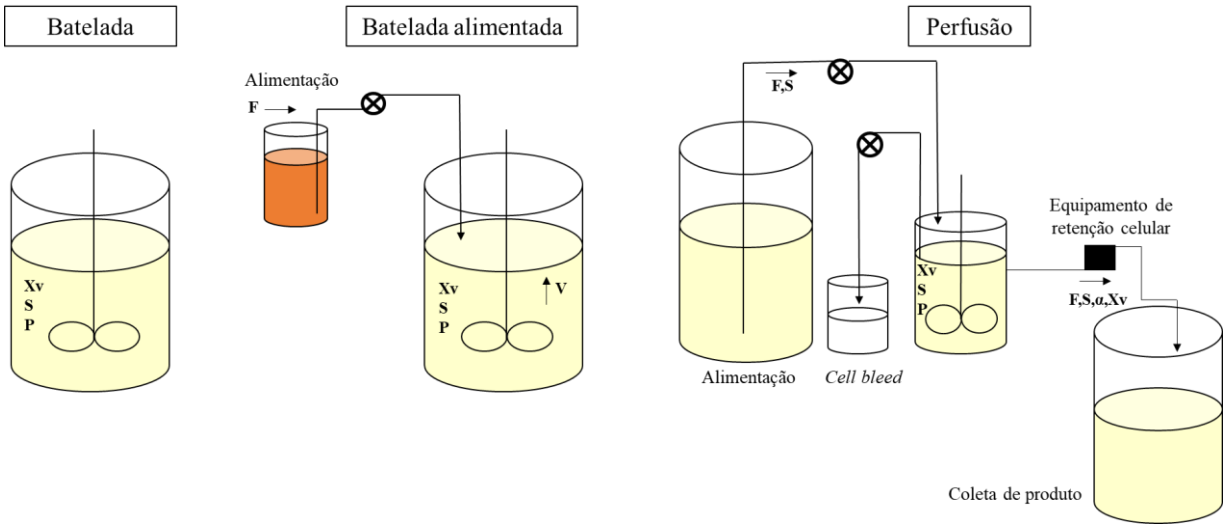


Figura 5: Configuração de biorreatores operados em diferentes modos de operação: batelada, batelada alimentada e contínuo com reciclo celular (perfusão). Adaptado de CHICO et al. (2008).

No fim do século XX, quando teve início o estudo da produção de produtos biofarmacêuticos em biorreatores, a demanda era consideravelmente menor e os produtos eram protegidos por patentes, o que limitou o desenvolvimento de processos na indústria biofarmacêutica. Assim, para encurtar o tempo de desenvolvimento e usar processos menos complexos, optou-se por plataformas de produção operadas em batelada ou batelada alimentada. Entretanto, pelo fato de tais processos apresentarem produtividades limitadas, buscou-se por alternativas mais eficientes e com menor custo e, assim, processos em perfusão ganharam destaque na última década (CASTILHO, 2015; HENRY et al., 2008; WARNOCK e AL-RUBEAI, 2006).

Para que um processo possa ser operado em perfusão, equipamentos de separação adequados são requeridos para reter as células no biorreator enquanto o produto é coletado (CASTILHO, 2015; WARNOCK e AL-RUBEAI, 2006). Como células de mamíferos são sensíveis a tensões de cisalhamento e é importante que sejam mantidas viáveis durante o processo de separação, a escolha do equipamento de retenção celular mais adequado para a

linhagem celular em questão tem grande relevância. Fatores levados em consideração incluem a eficiência de separação, o efeito no crescimento e viabilidade celular e a possibilidade de operação por longos períodos sem queda de desempenho (CASTILHO, 2015).

Atualmente, diversos equipamentos de retenção celular estão disponíveis (Tabela 3) e seus princípios de separação são baseados em sedimentação em campo centrífugo ou gravitacional, agregação sob estímulo de ondas ultrassônicas ou filtração (tangencial, tangencial alternada, com uso de filtros rotatórios ou *spin filters*, dentre outras estratégias de operação) (CASTILHO, 2015).

Tabela 3: Exemplos de equipamentos de retenção celular e seus princípios de separação.

Princípio de separação	**Equipamento**	**Fornecedor**
Sedimentação gravitacional	Sedimentador lamelado	Sudhin Biopharma, Technology Services
Sedimentação em campo centrífugo	Hidrociclone	-
	Centrífugas (ex: Centritech®)	PneumaticScaleAngelus
Agregação por ondas ultrassônicas	Separador acústico (Biosep®)	Applikon Biotechnology
Filtração	Tangencial	Diversos fabricantes
	Tangencial Alternada (XCell™ ATF®)	Repligen
	Com filtros de malha rotatório	Diversos fabricantes

Adaptado de CARVALHO e CASTILHO (2017).

Dentre os equipamentos de retenção celular, aqueles que têm o método de separação baseado em membranas representam uma alternativa interessante, apresentando alta eficiência de retenção. Neste tipo de sistema, a suspensão celular é bombeada para o módulo de filtração e a fase líquida permeia através da membrana, de modo que as células retornem ao biorreator. Membranas de diferentes configurações, polímeros e com tamanhos de poro diversos estão disponíveis no mercado.

A diminuição progressiva do fluxo permeado através da membrana pode ocorrer devido ao entupimento progressivo das membranas em decorrência de altas concentrações celulares,

debris celulares e acúmulo de proteínas e DNA, levando à retenção de produto no interior do biorreator e à necessidade de troca do dispositivo de retenção ou até interrupção do processo. Tal desvantagem pode ser parcialmente contornada pelo uso de filtração tangencial alternada (do inglês *alternating tangential filtration* – ATF), a qual promove inversão sequencial da direção do escoamento tangencial à membrana, reduzindo os problemas de entupimento progressivo da membrana e consequente retenção do produto no biorreator (CASTILHO, 2015; WANG et al., 2017).

Atualmente, o uso do ATF como equipamento de retenção celular tem ganhado importância para produção de partículas virais (GUTIÉRREZ-GRANADOS et al., 2018). Dados da literatura reportam o desenvolvimento de sistemas em perfusão utilizando o ATF como equipamento de retenção celular para produção dos vírus Zika (NIKOLAY et al., 2018b) e influenza (GENZEL et al., 2014). Conforme descrito anteriormente, partículas pseudovirais se assemelham ao vírus nativo em tamanho e morfologia e, assim, é possível que processos semelhantes possam ser desenvolvidos para a produção de VLPs.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver a produção de partículas pseudovirais (VLPs) de Zika, por meio do estabelecimento de linhagens celulares recombinantes expressando as VLPs de forma estável e constitutiva e do desenvolvimento de tecnologia eficiente para o cultivo das mesmas.

3.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- Avaliar a linhagem celular hospedeira mais adequada para a expressão de VLPs de Zika;
- Gerar linhagens celulares recombinantes capazes de expressar VLPs de Zika de forma constitutiva e estável;
- Analisar a estabilidade da produção das linhagens produtoras;
- Isolar populações enriquecidas em células produtoras de VLPs com auxílio de citometria de fluxo acoplada a *sorter* (FACS);
- Avaliar o crescimento das linhagens celulares estáveis e a produção de VLPs em frascos agitados;
- Avaliar a influência de estratégias de alimentação em frascos agitados operados em modo pseudoperfusão;
- Estudar o comportamento celular em biorreator de tanque agitado operando em modo de operação contínuo com retenção celular (perfusão), avaliando o sistema XCell™ ATF-2 como equipamento de retenção celular.

4. METODOLOGIA

4.1. Linhagens celulares e condições de cultivo

Diferentes linhagens celulares foram avaliadas durante a etapa inicial deste trabalho, a qual se refere à otimização do processo de transfecção com as construções gênicas a serem descritas na seção 4.2.1. Para isso, foram cultivadas células BHK-21, CHO.K1 (sigla do inglês *Chinese Hamster Ovary*) e HEK293-3F6 em seus respectivos meios de cultivo (Tabela 4), todas previamente adaptadas à suspensão. Para células CHO.K1, foi feito cultivo em dois diferentes meios de cultivo, de forma a determinar o melhor deles para manutenção e transfecção de tal linhagem.

As linhagens celulares parentais foram cultivadas em frascos do tipo *erlenmeyer* (Corning, EUA) ou *spin tube* (TPP AG, Suíça), agitados a 180 rpm (órbita de 2,5 ou 5 cm) e mantidas em incubadora a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2. A diluição das células foi feita a cada 3-4 dias, quando foi feito ajuste da concentração de células viáveis e adição de meio fresco.

Tabela 4: Linhagens celulares utilizadas na etapa de otimização do processo de transfecção. As células foram mantidas em condições controladas, sendo diluídas a cada 3-4 dias.

Linhagem celular	Meio de cultivo	Suplemento
BHK-21	TC-32A [a]	8 mM L-glutamina [c]
CHO.K1	TC-LECC [a]	8 mM L-glutamina [c]
CHO.K1	HEK TF [a]	8 mM L-glutamina [c]
HEK293-3F6	SFM4Transfx [b]	4 mM L-glutamina [c]

a: Xell AG, Alemanha, b: GE Healthcare, EUA, c: Sigma-Aldrich, EUA.

Após definição do protocolo de transfecção, a ser descrito na seção 4.2, células HEK293-3F6 foram adaptadas do meio de cultivo SFM4Transfx para o meio de cultivo HEK TF e, a partir deste momento, todos os experimentos foram realizados neste meio de cultivo e com esta linhagem celular parental.

A adaptação ao meio HEK TF foi feita de forma gradual, visto que, a cada diluição, ajustou-se a concentração celular para 1 x 10^6 células viáveis/mL e substituiu-se 25% do meio condicionado por HEK TF. Desta forma, a porcentagem do meio de cultivo original, SFM4Transfx, foi diminuindo gradualmente, com adaptação progressiva das células HEK293-

3F6 ao meio HEK TF. Considerou-se que as células estavam adaptadas após 14 dias sendo cultivadas em 100% de meio HEK TF.

4.1.1. Criopreservação e descongelamento de células

O procedimento foi iniciado com a centrifugação da suspensão celular (200 x *g*, 5 minutos, temperatura ambiente). Após isso, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas no respectivo meio de cultivo adicionado de 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, EUA), o qual atua como agente crioprotetor. A ressuspensão de células foi feita de forma que a concentração final em cada criotubo (Corning, EUA) fosse de, aproximadamente, 10^7 células viáveis/mL. Posteriormente, os criotubos foram mantidos por 24h em ultrafreezer a -80 ºC em recipiente contendo isopropanol e, finalmente, foram transferidos para tanques contendo nitrogênio líquido, onde foram armazenados na fase de vapor (-135 °C) até o momento de descongelamento, ou foram mantidos em ultrafreezer.

Para o descongelamento, retirou-se o criotubo do nitrogênio líquido ou do ultrafreezer e colocou-se o mesmo em banho termostático a 37 ºC, mantendo-o nesta temperatura até que ocorresse completo descongelamento da suspensão celular. Feito isto, a suspensão foi transferida para um tubo falcon contendo 5 mL de meio de cultivo previamente aquecido a 37 ºC e foi feita centrifugação para remoção do DMSO. O sobrenadante foi descartado e ressuspendeu-se as células em meio fresco a 37 ºC, de forma que a concentração final fosse de, aproximadamente, 0,5 x 10^6 células viáveis/mL.

4.2. Geração das linhagens recombinantes produtoras de VLPs de Zika

4.2.1. Construções gênicas

Baseando-se na sequência genômica da cepa do vírus Zika (ZIKV) isolada no Brasil em 2015 (cepa BeH819966, GenBank #KU365779), diferentes construções gênicas relacionadas às proteínas estruturais pré-membrana (prM) e envelope (E) foram desenhadas. As construções prM-E continham a sequência selvagem de prM e variantes da sequência de proteína E (selvagem, com mutação ou na forma quimérica), sendo flanqueadas por diferentes peptídeos sinal (Figura 6). Todas as construções foram sintetizadas na empresa GenScript (Estados Unidos) e clonadas no vetor de expressão pCIneo (Promega, Estados Unidos), o qual contém o

promotor do citomegalovírus e um cassete de seleção de transfectantes estáveis baseado no gene da neomicina fosfotransferase, que confere resistência ao antibiótico G418 sulfato.

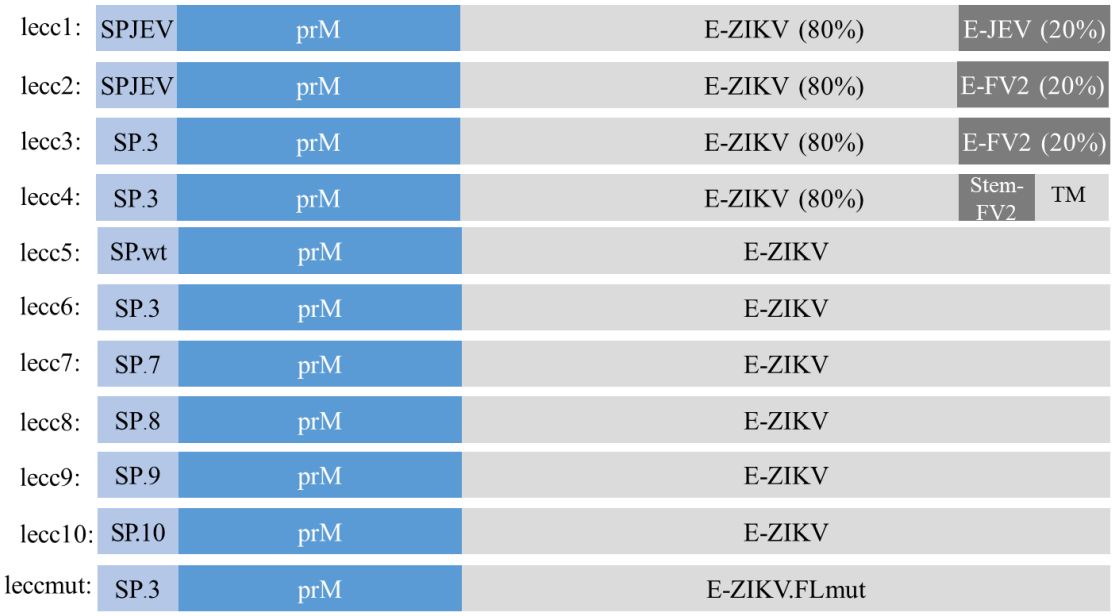


Figura 6: Construções de ZIKV baseadas nas proteínas estruturais prM e E. O peptídeo sinal (SP, sigla do inglês *signal peptide*) do vírus da encefalite japonesa (JEV) e outros peptídeos sinal desenhados pelo grupo do Laboratório de Cultivo de Engenharia Celulares (COPPE/UFRJ) foram avaliados. As sequências de proteína E avaliadas foram quiméricas, onde 20% da porção C-terminal do vírus Zika foi substituída por 20% da parte C-terminal de JEV ou do vírus da encefalite de Murray Valley (MVE) (lecc1-3) ou baseadas na sequência selvagem da cepa BeH819966 do ZIKV (lecc5-10). A sequência de proteína E da construção leccmut também foi baseada na cepa BeH819966, com exceção dos aminoácidos 106 e 107 presentes no *loop* de fusão, os quais foram substituídos por um resíduo de asparagina. A construção lecc4 também é de origem quimérica, considerando que os aminoácidos da região âncora da proteína E de Zika foi substituída pela respectiva sequência do MVE.

4.2.2. Avaliação inicial da produção de VLPs por transfecção transiente

De forma a avaliar inicialmente a produção de partículas pseudovirais, transfectaram-se células HEK293-3F6 com o DNA plasmidial referente às construções lecc1-lecc4. Para isso, centrifugou-se a suspensão celular (200 x *g*, 5 minutos, temperatura ambiente) e ressuspendeu-se no meio de cultivo SFM4Transfx, ajustando-se a concentração celular para 1×10^6 células/mL. Após isso, transfectou-se a suspensão celular em frascos do tipo *spin tube*. Para cada mililitro de suspensão, utilizou-se 0,5 µg de DNA e 1µL de Lipofectamina 3000, conforme as recomendações do fabricante. Aproximadamente 48h após a transfecção, amostras do sobrenadante celular foram retiradas para avaliação da produção transiente de partículas pseudovirais. As amostras foram centrifugadas (200 x *g*, 5 minutos, temperatura ambiente) e analisadas posteriormente por imunoensaio do tipo *spot blot* (a ser descrito na seção 4.6.3).

Como controle negativo da transfecção, utilizou-se protocolo semelhante ao descrito anteriormente, com exceção de que substituiu-se a adição de DNA plasmidial por água ultrapura estéril. Todas as condições foram avaliadas em duplicata biológica.

4.2.3. Definição do protocolo de transfecção

A produção de partículas pseudovirais foi avaliada em diferentes linhagens celulares hospedeiras e, para isso, transfectaram-se células BHK-21, CHO.K1 e HEK293-3F6 com a construção gênica lecc3. Além de investigar a expressão de partículas por tais linhagens, avaliou-se o uso de diferentes combinações de meios de cultivo, de forma a definir o protocolo de transfecção mais adequado (Tabela 5).

Tabela 5: Linhagens celulares, reagentes de transfecção e meios de cultivo utilizados para definição do protocolo de transfecção. As linhagens foram cultivadas em seus respectivos meios até o início do processo de transfecção, quando foram centrifugadas e ressuspendidas no meio a ser avaliado.

Linhagem celular hospedeira	**Reagente de transfecção**	**Meio de cultivo utilizado na transfecção**
BHK-21	Lipofectamina 3000	HEK TF
	Lipofectamina 3000	HEK TF (TC-32A)
CHO.K1	Lipofectamina 3000	HEK TF
	Lipofectamina 3000	HEK TF (TC-LECC)
HEK293-3F6	Lipofectamina 3000	SFM4Transfx
	Lipofectamina 3000	SFM4Transfx (+ HEK FS)
	TransIT®-2020	SFM4Transfx
	jetPEI®	SFM4Transfx

Antes do início do protocolo de transfecção propriamente dito, células BHK-21, cultivadas em TC-32A, foram centrifugadas e ressuspendidas em meio HEK TF, ajustando-se a concentração celular para 1×10^6 células/mL. Em uma das condições, manteve-se as células em HEK TF após a transfecção e na segunda condição foi realizada troca de meio, centrifugando-se e ressuspendendo-se a suspensão celular em TC-32A 6h após a transfecção.

No que se refere a células CHO.K1, cultivadas nos meios TC-LECC e HEK TF, ambas foram transfectadas em HEK TF. No caso de células CHO.K1 mantidas em TC-LECC, foi necessária centrifugação inicial para trocar o meio original por HEK TF e, 6h após a transfecção, nova centrifugação para transferência para TC-LECC. Células cultivadas em HEK TF também foram centrifugadas e ressuspendidas em meio fresco antes do início da transfecção.

A linhagem HEK293-3F6, originalmente cultivada em SFM4Transfx, foi transfectada neste meio de cultivo. Utilizou-se Lipofectamina 3000 como reagente de transfecção em todas as condições avaliadas até este momento. Posteriormente, a transfecção de células HEK293 foi avaliada quando utilizados outros reagentes de transfecção: TransIT®-2020 (Mirus Bio, EUA) e jetPEI® (Polyplus-transfection SA, França), ambos utilizados conforme recomendações dos fabricantes. Investigou-se, ainda, a adição do suplemento nutricional HEK FS (Xell AG), de acordo com as recomendações do fabricante, 4h após a transfecção.

Para iniciar o protocolo de transfecção, realizou-se procedimento semelhante ao descrito na seção 4.2.2. A suspensão celular foi centrifugada e ressuspendida no meio de cultivo a ser avaliado, como citado acima. Após isso, fez-se ajuste da concentração celular para 1×10^6 células/mL e transferiu-se para placas de 24 poços profundos (*deep well plates*, DWP) (Porvair Sciences, Reino Unido) ou tubos agitados (*spin tubes*). Em todas as condições avaliadas, utilizou-se 0,5 µg de DNA por mililitro de transfecção. A proporção DNA/reagente de transfecção variou conforme o reagente utilizado, respeitando-se as recomendações do fabricante.

Para confirmar a produção de partículas pseudovirais secretadas, analisou-se amostras de sobrenadante centrifugadas por *spot blot*. Todas as condições foram avaliadas em duplicata biológica.

4.2.4. Geração de populações produtoras de partículas pseudovirais de forma estável

Utilizando-se o protocolo definido em ensaios anteriores, baseado no uso do reagente de transfecção TransIT®-2020, transfectaram-se células HEK293-3F6 com as construções gênicas lecc3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e mut em placas de 24 poços profundos (DWP). Neste momento, as células HEK293 já haviam sido adaptadas ao meio HEK TF e a transfecção e cultivo foram realizados neste meio. Aproximadamente 48h após a transfecção, realizou-se contagem de

células e transferiu-se a suspensão celular para tubos agitados. Em seguida, diluiu-se a suspensão celular em meio fresco, de forma que a concentração final fosse ajustada para 1×10^6 células/mL. Além disso, adicionou-se 100 µg/mL de G418 sulfato (Gibco, EUA) para promover a seleção de células que haviam incorporado os genes heterólogos em seu genoma.

As populações celulares geradas foram mantidas em cultivo por cerca de 6 semanas na presença do agente de seleção (G418 sulfato). Para isso, as células foram mantidas em frascos do tipo *spin tube* e diluídas a cada 3-4 dias, ajustando-se a concentração celular para $0{,}8 \times 10^6$ células/mL e fazendo-se a adição de meio de cultivo fresco e do antibiótico de seleção.

Amostras do sobrenadante foram coletadas periodicamente, centrifugadas e armazenadas a 4 °C para posterior confirmação da produção de partículas pseudovirais por imunoensaio do tipo *spot blot*. Bancos celulares foram preparados 30 dias após a transfecção. Estudos cinéticos para comparação das diferentes populações geradas foram realizados (seção 4.4).

4.3. Enriquecimento de populações estáveis produzindo VLPs de Zika

De forma a enriquecer as populações estáveis em subpopulações com níveis de produção mais elevados, aproximadamente 200×10^6 células viáveis foram marcadas com o anticorpo monoclonal 4G2 (MAB10216, Merck, EUA), biotinilado *in house* com o *kit* EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin (Thermo Scientific, EUA), e com o fluoróforo *streptavidin, R-phycoerythrin* (SA-PE) (Invitrogen, EUA). O anticorpo 4G2 foi escolhido para ser utilizado neste ensaio pois reconhece uma região conservada presente na proteína E de diferente flavivírus, incluindo o vírus Zika.

Para iniciar o protocolo, realizou-se contagem de células e transferiu-se o volume de suspensão celular suficiente para se obter 200×10^6 células viáveis para tubo falcon de 50 mL. A suspensão foi então centrifugada (400 x *g*, 5 minutos, temperatura ambiente) três vezes, lavando-se a suspensão com tampão fosfato salino (PBS) contendo 2% (m/v) de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, EUA) após cada centrifugação. Após a última lavagem, ressuspenderam-se as células em 1 mL de solução de lavagem e transferiu-se 10% do volume para tubo falcon de 15 mL, onde adicionou-se 10 mL de meio HEK TF para diluição das células e armazenou-se em banho de gelo (controle negativo). O restante da suspensão (aproximadamente 900 µL) foi incubada com 4G2 biotinilado (1:100) por 20 minutos em banho de gelo. Após isso, lavou-se a suspensão celular três vezes com solução de lavagem,

centrifugando a suspensão celular a cada lavagem. Em seguida, realizou-se incubação com as-PE (1:300, concentração final de 3 µg/mL) por 15 minutos em banho de gelo, protegido da luz. Ao fim da incubação, lavou-se a suspensão celular três vezes com solução de lavagem e ressuspendeu-se as células em meio HEK TF com solução de penicilina/estreptomicina (Hyclone, EUA), de forma que a concentração celular final fosse de, aproximadamente, 10^7 células/mL. A suspensão foi mantida em banho de gelo até início da análise por FACS, sendo esta etapa realizada no CENABIO/UFRJ.

No que se refere ao isolamento de células produtoras, utilizou-se o citômetro de fluxo FACSAria™ IIu (BD Biosciences, Estados Unidos) e iniciou-se o procedimento utilizando células não marcadas (controle negativo) para configurar o equipamento, definindo-se os *gates* para que apenas células viáveis, não grumadas (*singlets*) e com nível de fluorescência acima do controle negativo fossem coletadas. Após isso, células marcadas foram utilizadas para isolar aquelas que apresentaram sinal de fluorescência mais elevado (cerca de 0,3% da população total), as quais foram coletadas em tubos falcon de 15 mL contendo 5 mL de HEK TF, solução de penicilina/estreptomicina e 1% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, EUA). Em seguida à coleta, centrifugou-se a suspensão e ressuspendeu-se em meio HEK TF suplementado com 0,5% (v/v) de SFB e penicilina/estreptomicina, de forma a obter concentração final de, ao menos, $0,3 \times 10^6$ células/mL. Diluiu-se a suspensão celular a cada 3-4 dias, até que se obtivessem células suficientes para preparo de banco celular.

A adição de SFB e penicilina/estreptomicina ao meio utilizado na diluição das células (HEK TF) foi interrompida uma semana após o procedimento de enriquecimento. Sobrenadantes de células produtoras não enriquecidas e enriquecidas foram avaliados por imunoensaio do tipo *spot blot* para comparar a produção de partículas pseudovirais. Além disso, estudos cinéticos para investigar o crescimento celular e a produção de partículas pseudovirais foram realizados em frascos agitados.

4.4. Avaliação das populações recombinantes em frascos agitados

Com o objetivo de avaliar o desempenho e a estabilidade das linhagens celulares estáveis produtoras de partículas pseudovirais de Zika, experimentos em frascos agitados foram realizados.

4.4.1. Estudos cinéticos: batelada e pseudoperfusão

Ensaios em batelada e pseudoperfusão (PP) foram realizados para avaliar o comportamento celular das diferentes populações transfectadas em tubos agitados, com volume inicial de 15 mL. As populações produtoras das construções lecc3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e mut foram avaliadas em modo batelada. A população lecc3 enriquecida teve seu crescimento investigado nos modos batelada e semi-contínuo (pseudoperfusão).

Foram inoculados frascos com $0,5 \times 10^6$ células/mL em meio HEK TF e amostras foram retiradas diariamente para avaliar crescimento celular, viabilidade, consumo de glicose, concentração de lactato e para determinar a concentração de partículas pseudovirais ao longo do experimento. Todas as condições foram avaliadas em duplicata biológica.

No caso da pseudoperfusão, duas estratégias de alimentação diferentes foram aplicadas, ambas com início no dia 4 do experimento, quando o volume dos frascos foi ajustado para 10 mL. A partir do dia 4, a suspensão celular foi centrifugada diariamente (200 x *g*, 5 minutos, temperatura ambiente) para promover a retenção celular, e então foi feita a troca de meio. Na primeira estratégia de pseudoperfusão, uma alimentação em degraus foi aplicada de acordo com a demanda celular por glicose: 0,5 vvd quando a concentração de glicose no momento da amostragem era maior que 2 g/L; 0,75 vvd para concentração entre 1 e 2 g/L; e 1 vvd quando menor que 1 g/L. A segunda estratégia de pseudoperfusão baseou-se na troca constante de 1 vvd de meio a partir do dia 4.

4.4.2. Avaliação da estabilidade da produção de VLPs por populações estáveis

De forma a avaliar a estabilidade da produção, as populações transfectadas previamente (protocolo descrito na seção 4.2.4) foram mantidas em cultivo na presença do agente de seleção de 48h até 6 (construções lecc5, 6, 7, 10 e mut), 14 (construção lecc9) ou 20 semanas (construção lecc3 e lecc3 enriquecida) após a transfecção.

Durante este período, os cultivos celulares foram diluídos a cada 3-4 dias, quando fez-se ajuste da concentração celular para $0,8 \times 10^6$ células/mL e troca do meio condicionado por meio fresco contendo 100 µg/mL de G418 sulfato. Para a população HEK293-lecc9, a partir da décima primeira semana após a transfecção, uma parte das células foi mantida na presença do agente de seleção e outra parte na ausência deste composto. Para células HEK293-lecc3, foi

feita a retirada do agente de seleção a partir da semana 16. Para isso, a suspensão celular foi separada em diferentes frascos nas semanas 11 e 16 para as populações referentes às construções lecc9 e lecc3, respectivamente, e, a partir de então, células diluídas foram cultivadas em HEK TF com e sem adição de G418 sulfato.

Semanalmente, fez-se a retirada de amostras de sobrenadante celular, as quais foram centrifugadas e armazenadas a 4 °C para posterior análise por imunoensaio do tipo *spot blot*.

4.5. Produção de partículas pseudovirais de Zika em biorreator do tipo tanque agitado

Após avaliação de células HEK293-lecc3 (enriquecida) em pseudoperfusão, realizou-se ensaio em biorreator de tanque agitado operado em modo perfusão, utilizando o sistema XCell™ ATF-2 (Repligen, EUA) como equipamento de retenção (Figura 7).

O biorreator (ez-Control, Applikon Biotechnology, Holanda) foi inoculado com $0,5 \times 10^6$ 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_2 foi feito por meio da injeção de ar no início da corrida por um aerador macroporoso do tipo L (*drilled hole sparger*), até que as células atingissem $2\text{-}3 \times 10^6$ células/mL, e então iniciou-se a injeção de oxigênio puro, a uma vazão máxima de 0,25 L/min. A partir deste momento, além da injeção de oxigênio pelo aerador, foi iniciada a injeção de ar pelo *headspace*. 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 entre 0,9 e 1,1 L. O pH foi controlado por meio da injeção de CO_2 pelo aerador a uma vazão máxima de 0,02 L/min e pela adição de carbonato de sódio 1M.

O equipamento de retenção celular utilizado, XCell™ ATF-2, teve seu funcionamento iniciado no dia 2 de cultivo, um dia antes do início da perfusão, quando ajustou-se a taxa de recirculação para 0,7 L/min. A bomba utilizada para recirculação foi ajustada ao longo do cultivo conforme aumento da viscosidade da suspensão celular, sendo a taxa de recirculação máxima aplicada de 1 L/min. O módulo de microfiltração utilizado era de polietersulfona, contendo poros de 0,2 µm, lúmen de 1,0 mm e área superficial de 0,13 m² (Repligen, EUA).

A perfusão foi iniciada no dia 3 com uma taxa de troca de meio de 0,35 vvd e foi aumentada gradualmente até 1,5 vvd, de forma a manter a concentração de glicose em, aproximadamente, 1 g/L durante o estado estacionário (EE). A partir do dia 7 de cultivo,

iniciou-se uma remoção controlada de células (*cell bleed*), de forma a manter a concentração celular em, aproximadamente, 25-30 × 10^6 células/mL.

As bombas utilizadas para adição de meio, coleta de sobrenadante contendo o produto de interesse (*harvest*) e remoção controlada de células foram calibradas antes do início do cultivo com auxílio de balão volumétrico e cronômetro, de forma a montar-se uma curva de calibração compatível com os volumes previstos a serem bombeados durante o experimento. Além disso, monitorou-se diariamente a massa dos frascos de alimentação, coleta e *cell bleed* para garantir que as bombas estavam funcionando de acordo com calibração prévia e sendo capazes de manter o volume de trabalho no vaso conforme planejado.

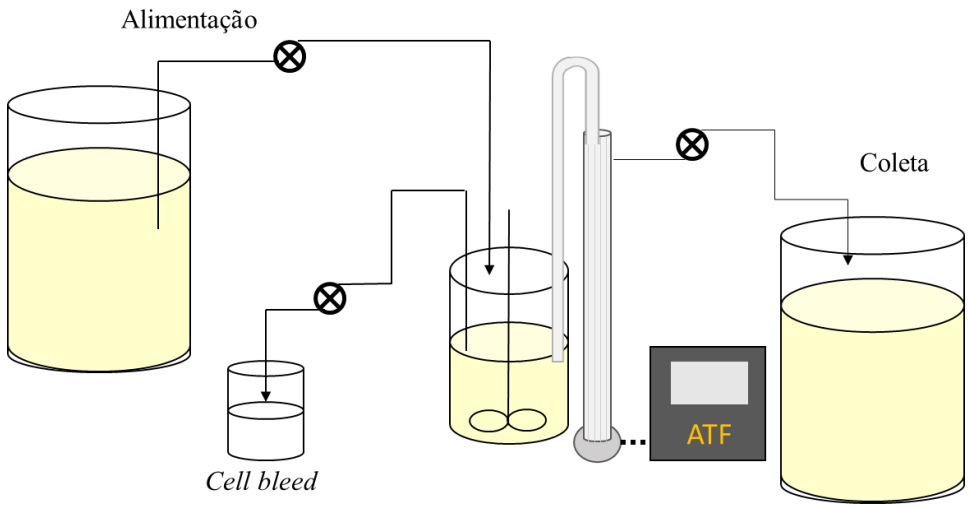


Figura 7: Desenho esquemático simplificado do sistema utilizado para a produção de VLPs de Zika em biorreator de tanque agitado. Além do vaso principal contendo os sensores necessários (não mostrados no esquema), o sistema conta com bombas peristálticas utilizadas para injeção de meio de cultivo para alimentação, coleta de sobrenadante após recirculação pelo equipamento de retenção celular (XCell™ ATF-2) e para remoção controlada de células (*cell bleed*). Além disso, o esquema mostra os frascos necessários às operações de alimentação, coleta e remoção de células Adaptado de CHICO et al. (2008) e NIKOLAY et al. (2018b).

4.6. Ensaios analíticos

4.6.1. Quantificação de células viáveis e totais

A contagem de células foi realizada utilizando o contador automático Vi-CELL XR (Beckman Coulter, EUA) ou com câmara de Neubauer ao microscópio óptico. Em ambos os casos, a quantificação celular baseia-se no método de exclusão do corante azul de tripan, o qual permite avaliação da concentração de células viáveis e totais e da viabilidade celular. Quando

necessário, a suspensão celular foi diluída em PBS antes da quantificação. A viabilidade celular foi dada pela relação entre células viáveis e células totais, conforme Equação 5.

$$Viabilidade\ (\%) = \frac{concentração\ de\ células\ viáveis}{concentração\ de\ células\ totais}\ x\ 100 \qquad (5)$$

Onde:

Concentração de células viáveis: X_v

Concentração de células totais: X_t

4.6.2. Quantificação de glicose e lactato

As concentrações do substrato glicose e do metabólito lactato foram feitas utilizando o analisador bioquímico YSI 2700 Select Biochemistry Analyzer (YSI Inc., EUA), o qual emprega biossensores (membranas com as enzimas glicose oxidase e lactato oxidase) para realizar a medição. Sempre que necessária a quantificação, amostras da suspensão celular foram coletadas e centrifugadas (200 x *g*, 5 minutos, temperatura ambiente) antes da leitura no equipamento. Para cada leitura, utilizou-se 25 µL de sobrenadante livre de células.

4.6.3. Análise da produção de partículas pseudovirais de Zika

A análise da produção de partículas pseudovirais foi realizada por imunoensaio do tipo *spot blot*, o qual baseou-se na aplicação de 3 µL de amostras de sobrenadante centrifugado em membrana de nitrocelulose de 0,2 µm de tamanho de poro (Vita Scientific, EUA). Após aplicação das amostras, aguardou-se a secagem completa da membrana e realizou-se bloqueio em tampão Tris salino (TBS), contendo 0,05% (v/v) de Tween 20 (Sigma-Aldrich, EUA) e 5% (m/v) de leite desnatado em pó (Molico, Brasil) por 2h.

Posteriormente, incubou-se a membrana com o anticorpo monoclonal 4G2 (MAB10216, Merck, EUA) por 1h, o qual reconhece uma região conservada do *loop* de fusão de flavivírus e foi usado como anticorpo primário (diluição 1:8000), seguido de incubação por 45 minutos com anticorpo anti-*mouse* conjugado à HRP (sigla do inglês *horseradish*

peroxidase), na diluição 1:10000 (A16011, Invitrogen, EUA). Alternativamente, utilizou-se soro de camundongos imunizados com plasmídeo contendo prME de ZIKV como anticorpo primário (diluição 1:50) em imunoensaios onde o sobrenadante de células transfectadas com a construção leccmut foi avaliado. Os anticorpos foram diluídos em tampão TBS-T (TBS contendo 0,05% (v/v) de Tween 20) com 0,5% (m/v) de leite desnatado. Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente e sob agitação e, entre as referidas etapas de incubação, a membrana foi lavada com TBS-T por 5 minutos sob agitação.

A ligação do anticorpo à proteína E das partículas pseudovirais foi revelada por quimioluminescência com o reagente de detecção ECL™ Prime (GE Healthcare, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A leitura foi realizada com auxílio do equipamento FluorChem E (Protein Simple, EUA).

Como padrão positivo, utilizou-se a proteína de envelope de Dengue (concentração estoque: 670 µg/mL, Prospec, Israel) em diferentes concentrações. A quantificação dos sinais obtidos por densitometria foi realizada com auxílio do *software* ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

4.7. Cálculos utilizados nos experimentos

Os cálculos utilizados nos experimentos de batelada e perfusão foram feitos com base nas equações descritas por CHICO et al. (2008) e LAGES (2015).

4.7.1. Batelada

A velocidade específica de crescimento na fase exponencial (μ_{exp}) foi determinada pelo método integral, ajustando a Equação 6 aos dados de X_v e t pelo método de regressão disponível em Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, EUA). A fase exponencial foi considerada no intervalo de tempo no qual a equação mostrou bom ajuste aos dados, com coeficiente de determinação (R^2) próximo de 0,99, uma vez que isto indica padrão exponencial de crescimento. $X_{v(0)}$ é a X_v no tempo zero, que corresponde ao ponto inicial da fase exponencial. Em outras palavras, µ foi determinada como o expoente da equação exponencial. O tempo de duplicação (t_d) foi calculado através da Equação 7.

$$X_v(\mathrm{t}) = X_v(0) \,.\, e^{\,\mu_{exp}\,.t} \qquad (6)$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \qquad (7)$$

Em relação à formação de produto, definiu-se a produtividade específica ou taxa específica de formação de produto pelo método integral, a partir do ajuste da Equação 8 por regressão linear aos dados de concentração de produto (P) *versus* integral de células viáveis (ICV), sendo q_p o coeficiente angular da equação desta reta. Esta equação é válida considerando-se que qp é constante em um dado intervalo de tempo.

$$P = \overline{q_p} \times ICV \qquad (8)$$

A ICV é definida na Equação 9, onde a integração numérica foi realizada pelo método dos trapézios, onde "i" representa o número da amostra experimental e "n" é o número total de amostras.

$$ICV = \int_{t_0}^{t} X_v \, dt \cong \sum_{i=0}^{n} \frac{X_{v_{(i-1)}} + X_{v_{(i)}}}{2} \times (t_i - t_{i-1}) \qquad (9)$$

4.7.2. Perfusão

Complementando as equações já descritas acima, descreve-se abaixo aquelas utilizadas no processo em perfusão. Para determinar a taxa específica de crescimento com maior precisão, é necessário monitorar os volumes de meio de cultivo adicionado (entrada) e de coleta e *cell bleed* que são retirados do biorreator (saída), o que foi feito coletando-se tais correntes em frascos posicionados sobre balanças. A vazão de alimentação foi determinada por balanço de massa de acordo com a Equação 10, na qual Q é a vazão de fluido (L/dia) na alimentação (Q_a), na coleta (Q_c) e no *cell bleed* (Q_b). Para realizar este cálculo, é necessário que o volume do biorreator seja constante.

$$\mathrm{Qa} = \mathrm{Qc} + \mathrm{Qb} \qquad (8)$$

A taxa de diluição (D) empregada nos processos de pseudoperfusão e perfusão, que representa o volume de meio fresco adicionado por volume de trabalho por dia (vvd) é dada pela Equação 3, descrita anteriormente.

O cálculo da taxa específica de crescimento obtida no experimento em perfusão foi realizado pelo método diferencial aplicando a Equação 11, válida para volume constante. D_c é a taxa de diluição da coleta e D_b, do *cell bleed* (dia^{-1}).

$$\mu \cong \frac{1}{\overline{Xv}} \cdot \frac{\Delta Xv}{\Delta t} + \overline{\alpha} \cdot \overline{Dc} + \overline{Db} \qquad (11)$$

A q_p foi calculada conforme descrito na Equação 12 e a produtividade volumétrica (P_v) de acordo com a Equação 13. Para cálculo de P_v, utilizou-se a média de X_v e q_p para os dias 10 a 29 de cultivo (estado estacionário).

$$q_p \cong \frac{1}{\overline{X_v}} \times \frac{\Delta P}{\Delta t} + \frac{\overline{D} \times \overline{P}}{\overline{X_v}} \qquad (12)$$

$$P_{v_{(perfusão)}} \approx \overline{q_P} \times \overline{X_v} \qquad (13)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação de diferentes linhagens celulares hospedeiras para expressão de partículas pseudovirais de Zika e definição do protocolo de transfecção

Com o objetivo de obter linhagens celulares expressando partículas pseudovirais de forma constitutiva e secretando-as para o meio de cultivo, diferentes construções gênicas contendo as sequências das proteínas estruturais prM e E foram desenhadas (Figura 6). O desenho das construções foi feito com base em dados da literatura que evidenciam que sequências quiméricas, obtidas por substituição dos domínios âncora e transmembrana da proteína E de flavivírus (20% da parte C-terminal de E) pela sequência correspondente do vírus da encefalite japonesa (JEV) ou por alterações apenas na região âncora de E, levaram a uma melhor secreção das partículas pseudovirais de diferentes flavivírus (CHANG et al., 2003; PURDY e CHANG, 2005).

Adicionalmente, CHANG e colaboradores (2003) mostraram que o uso do peptídeo sinal de JEV levou a aumento na secreção de prM e E de flavivírus e, por isso, decidiu-se avaliar também peptídeos sinal das sequências selvagem de JEV e Zika, além de peptídeos inovadores propostos por pesquisadores do Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC) com base na literatura e em simulações de eficiência de clivagem utilizando o site http://www.predisi.de/index.html, numerados de 3 a 10 (SP3-SP10). Desenhou-se, ainda, a construção leccmut, contendo mutação em dois aminoácidos do *loop* de fusão localizado no domínio II da proteína E (G106R e L107D). O *loop* de fusão é altamente conservado em flavivírus e tais mutações visaram evitar reações de reconhecimento cruzado, caso as VLPs sejam usadas para produção de uma vacina ou para fins diagnósticos.

De forma a iniciar o estudo da produção de VLPs de Zika *in vitro*, avaliou-se a expressão transiente das construções prM-E lecc1-lecc4 por células HEK293-3F6. Neste estudo preliminar, células cultivadas em SFM4Transfx foram transfectadas com a mistura DNA-lipofectamina 3000 e, 48h após este procedimento, foi feita análise da expressão de VLPs por *spot blot* (Figura 8).

Observou-se que a expressão transiente das construções quiméricas lecc1-lecc3 foi similar 48h após a transfecção e que células transfectadas com o DNA plasmidial referente à construção lecc4 não apresentaram expressão detectável de VLPs. Ressalta-se que a diferença entre as construções lecc3 e lecc4 é que, na última, alterou-se apenas a sequência do domínio

âncora, enquanto na construção lecc3 substituiu-se também a região transmembrana. De acordo com este resultado e com o fato de o uso do peptídeo sinal e da região C-terminal de E de JEV terem sido patenteados por CHANG (1998), decidiu-se utilizar a construção lecc3 para avaliar a expressão de VLPs por outras linhagens hospedeiras e para definição do protocolo de transfecção.

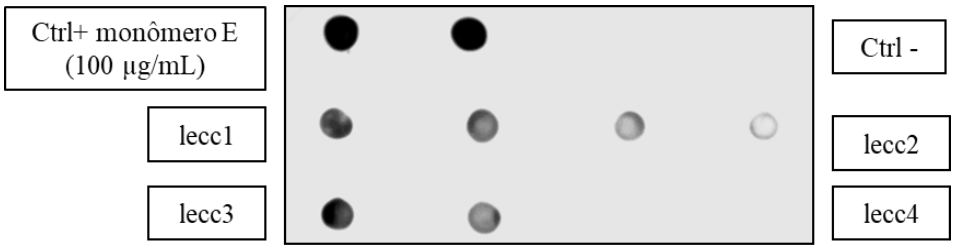


Figura 8: *Spot blot* em membrana de nitrocelulose para avaliação da secreção de partículas pseudovirais de Zika por células HEK293-3F6, utilizando o anticorpo monoclonal 4G2 como anticorpo primário. Como controle positivo, utilizou-se proteína E de Dengue na concentração de 100 µg/mL. Transfecção transiente com células HEK293-3F6 em tubos agitados, utilizando a mistura DNA-Lipofectamina 3000 na proporção 0,5 µg de DNA para 1 µL de lipídeo por mililitro de suspensão transfectada.

De forma a determinar a linhagem celular mais adequada para a produção *in vitro* de VLPs de Zika, investigou-se a expressão de tais partículas por células BHK-21, CHO.K1 e HEK293-3F6. Estas linhagens foram selecionadas pelo fato de serem conhecidas por apresentar níveis satisfatórios de expressão de proteínas recombinantes e/ou de produção de partículas virais. Assim, tais linhagens foram transfectadas com a construção lecc3, utilizando diferentes condições (Tabela 5).

De acordo com informações do fabricante dos meios de cultivo TC-LECC e TC-32A, comercializados para a finalidade de manutenção do crescimento celular, poderia ocorrer interferência de componentes de tais meios no protocolo de transfecção e/ou na detecção de VLPs por imunoblot. Além disso, os meios citados não seriam os mais indicados para protocolos de transfecção. Desta forma, testou-se transfectar células BHK-21 e CHO.K1 no meio HEK TF, o qual foi desenvolvido para uso em protocolos de transfecção.

A avaliação com células CHO.K1 (Figura 9) indicou que, apesar de baixa, houve maior secreção de VLPs quando a suspensão celular foi mantida em meio HEK TF, confirmando a hipótese de que o meio TC-LECC poderia interferir no protocolo de transfecção e/ou nos ensaios de *spot blot*, visto que não foi detectada qualquer secreção de VLPs para células cultivadas em TC-LECC. De qualquer forma, observou-se menor secreção de VLPs por células CHO.K1 em relação aos resultados obtidos anteriormente para células HEK293.

No que se refere a células BHK-21, observou-se discreta secreção de VLPs na condição onde células foram mantidas em HEK TF após a transfecção (Figura 10). Já na condição onde as células foram ressuspensas em TC-32A após a transfecção, não foi detectada secreção de VLPs, como observado anteriormente com células CHO.K1 (nenhum sinal detectado para células ressuspensas em TC-LECC).

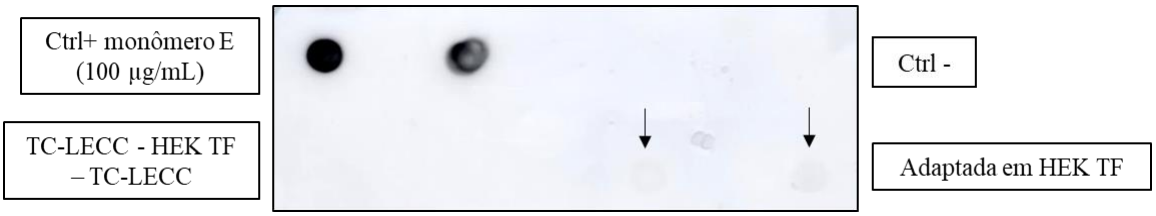


Figura 9: Detecção por *spot blot* da secreção transiente de VLPs por células CHO.K1 quando cultivadas em diferentes meios de cultivo. Setas indicam o fraco sinal detectado para a condição onde as células foram cultivadas e transfectadas em HEK TF e assim mantidas até o fim do experimento. Como controle positivo, utilizou-se proteína E de Dengue na concentração de 100 µg/mL. O anticorpo monoclonal 4G2 foi utilizado como anticorpo primário.

De acordo com protocolos de transfecção do fabricante do meio HEK TF (Xell AG), poderia ser realizada troca de meio 2-4h após o procedimento de transfecção, havendo interiorização dos complexos lipídio-DNA em período mais curto do que o indicado para troca de meio. Desta forma, acredita-se que a troca de meio 6h após a transfecção não tenha tanta influência na menor secreção de VLPs detectada por *spot blot*, sendo mais importante a interferência de tais meios no ensaio de detecção.

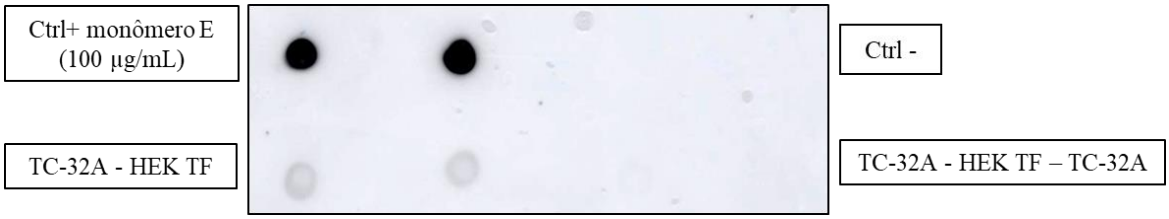


Figura 10: Detecção por *spot blot* da produção de VLPs de Zika por células BHK-21. Ambas as condições foram transfectadas em meio HEK TF, sendo que em um dos casos as células foram ressuspendidas no meio de crescimento 6h após a transfecção (resultado do lado direito, canto inferior). Como controle positivo, utilizou-se proteína E de Dengue na concentração de 100 µg/mL. O anticorpo monoclonal 4G2 foi utilizado como anticorpo primário.

Após avaliação dos resultados obtidos, constatou-se que células HEK293 foram capazes de secretar VLPs com maior eficiência, o que condiz com a literatura que indica que tal linhagem se apresenta como uma plataforma robusta e bem estabelecida para a produção de

vírus, vetores virais e partículas pseudovirais. Ressalta-se, inclusive, que tal linhagem tem sido utilizada na expressão de VLPs dos vírus da raiva, HIV e influenza em modo de operação contínuo, acoplando-se o biorreator a diferentes equipamentos de retenção celular, como filtros acústicos e filtros rotatórios (FONTANA et al., 2015, FUENMAYOR et al., 2018, VENEREO-SANCHEZ et al., 2017). Adicionalmente, pelo fato de VLPs de Zika serem envelopadas e de a membrana da célula hospedeira ser utilizada durante a montagem e secreção de tais partículas, o uso de uma linhagem celular humana resultaria em VLPs mais semelhantes a partículas virais produzidas no organismo humano em caso de infecção (LUA et al., 2014).

Desta forma, ensaios subsequentes avaliaram o uso de diferentes reagentes de transfecção: Lipofectamina 3000, TransIT®-2020 e jetPEI®. Além disso, testou-se a adição do meio concentrado HEK FS 4h após a transfecção. De acordo com o resultado obtido (Figura 11), é possível observar que o reagente TransIT®-2020 (condição 3) seria mais indicado para a transfecção de células HEK293 em meio HEK TF, visto que levou à maior secreção de VLPs, principalmente quando comparou-se tal resultado às condições transfectadas com Lipofectamina 3000. Observa-se, ainda, que a adição de meio concentrado (condição 2) não levou a aumento na secreção de VLPs. Assim, definiu-se que o protocolo para geração de populações estáveis produtoras de VLPs seria baseado na condição 3.

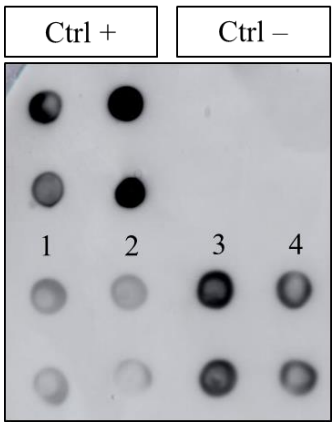


Figura 11: Confirmação por *spot blot* da produção de VLPs de Zika por células HEK293-3F6 utilizando os reagentes de transfecção Lipofectamina 3000 (1) e (2), TransIT®-2020 (3) e jetPEI® (4). Na condição 2, adicionou-se HEK FS 4h após a transfecção. Como controle positivo, utilizou-se proteína E de Dengue na concentração de 100 µg/mL. O anticorpo monoclonal 4G2 foi utilizado como anticorpo primário.

5.2. Geração de linhagens celulares estáveis produtoras e avaliação da produção de VLPs até seis semanas após a transfecção

Após definição do protocolo de transfecção, foi iniciada a investigação da produção de VLPs de diferentes construções por células HEK293-3F6. Desta forma, transfectou-se a linhagem celular hospedeira com as construções lecc3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e mut para comparar a secreção de VLPs formadas por sequências de proteína E selvagem (lecc 5-10), quimérica (lecc3) e com mutação no *loop* de fusão (leccmut), assim como para avaliar a influência de diferentes peptídeos sinal.

O resultado da expressão transiente (48h após a transfecção) de VLPs presentes no sobrenadante de células HEK293 é mostrado na Figura 12, podendo-se constatar que as construções lecc7-10 levaram a maiores níveis de produção em comparação às construções 3, 5 e 6. Comparando-se as construções que contêm a sequência nativa de E (lecc5-10), verificou-se que dos cinco peptídeos sinal propostos pelo LECC/COPPE/UFRJ, quatro deles (lecc7-10) proporcionaram concentrações de VLPs secretadas maiores do que o peptídeo sinal nativo (lecc5). Apenas o peptídeo sinal referente à construção lecc6 resultou em menores concentrações de VLPs no sobrenadante do que o peptídeo sinal nativo de ZIKV. Realizando-se, ainda, uma comparação entre a expressão transiente das construções lecc1 e 2 (Figura 8), as quais possuem peptídeo sinal de JEV propostos por CHANG (1998), com lecc 3, pode-se observar que a lecc3 teve expressão similar à lecc1 e maior que lecc2. Visto que as outras construções avaliadas transientemente apresentaram expressão de VLPs maior ou igual à lecc3 (Figura 12), confirma-se o potencial dos peptídeos sinal propostos pelo grupo do LECC/COPPE/UFRJ.

Comparando-se lecc3 e lecc6, as quais apresentam o mesmo peptídeo sinal, mas há variações na sequência da proteína E, verifica-se que o uso da versão quimérica desta proteína parece aumentar a produção de VLPs secretadas, o que está de acordo com a literatura que usou a região terminal de E de JEV para desenvolver suas quimeras (CHANG, 1998; CHANG et al., 2003; PURDY e CHANG, 2005).

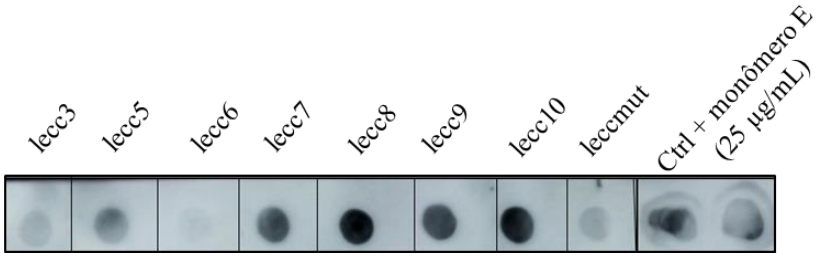


Figura 12: Imunoensaio do tipo *spot blot* para avaliação da secreção de diferentes construções de VLPs por células HEK293-3F6. Proteína E de Dengue foi utilizada como controle positivo (25 µg/mL). Soro de camundongos imunizados com plasmídeo contendo prME de ZIKV como anticorpo primário (diluição 1:50).

Aproxidamente 48h após a transfecção, adicionou-se G418 sulfato às populações transfectadas, dando-se início à seleção de células que expressavam VLPs de forma estável (Figuras 13A e 13B). Durante o período de seleção, pode-se observar que as populações passam por uma fase de baixíssima viabilidade celular, com significativa diminuição na concentração de células viáveis presentes, quando são selecionadas as células que integraram o DNA exógeno de forma estável. Cerca de 6 semanas após o início do cultivo na presença do agente de seleção, as células transfectadas já haviam se recuperado e apresentavam viabilidade na faixa de 84 a 96%, sendo foram consideradas estáveis.

O monitoramento da produção de VLPs nos sobrenadantes das populações transfectadas também foi realizado, confirmando a expressão contínua das partículas até 6 semanas após a transfecção para todas as construções avaliadas (Figura 13C). É possível observar a variação na produção transiente de VLPs entre as diferentes populações (Figura 12), refletindo a importância dos diferentes peptídeos sinal utilizados nas construções. A observação da importância dos peptídeos sinal para a produção de VLPs de flavivírus foi feita por CHANG (1998) e CHANG e colaboradores (2001; 2003) em diferentes trabalhos, sendo relatada a influência de tal sequência não só na quantidade, como na qualidade das partículas produzidas.

Destaca-se ainda que, exceto para amostras retiradas 1 semana após a transfecção, quando as células passavam por uma crise em consequência do início do uso do agente marcador de seleção e apresentavam densidade celular e viabilidade muito baixas, variações nos sinais detectados ao longo do tempo para uma mesma população foram mínimas, refletindo apenas oscilações na concentração de células viáveis e na viabilidade, decorrentes do processo de seleção de células estáveis.

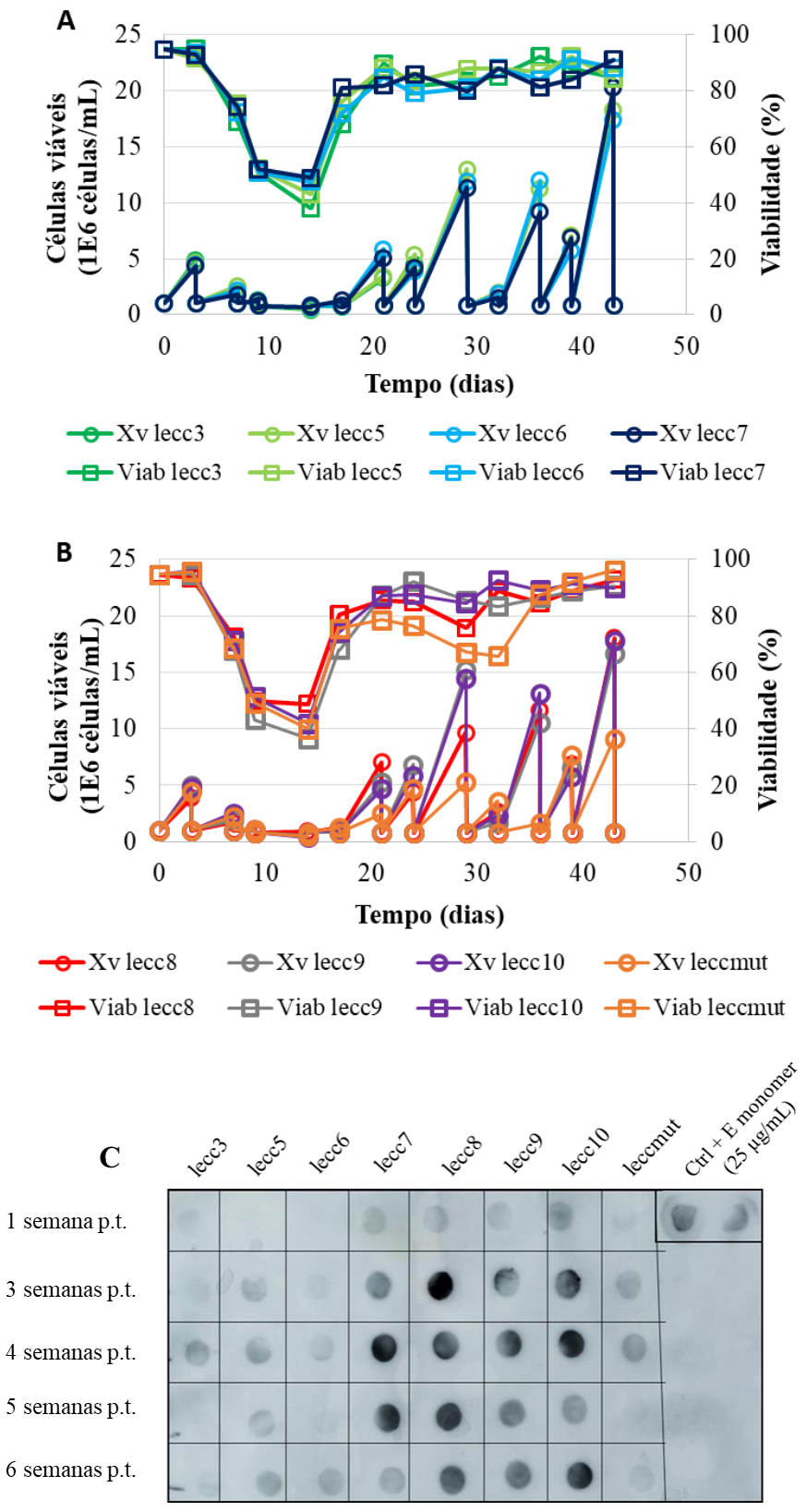


Figura 13: Seleção de populações de células HEK293-3F6 estáveis produtoras de VLPs de Zika. Concentração de células viáveis (círculos) e viabilidade celular (quadrados) de *pools* transfectados com as construções lecc3 e 5-7 (A) e lecc8-10 e leccmut (B). (C) Expressão de VLPs das construções lecc3, lecc5-10 e leccmut entre 1 e 6 semanas pós-transfecção (p.t.). Proteína E de Dengue foi utilizada como controle positivo (25 µg/mL). Soro de camundongos imunizados com plasmídeo contendo prME de ZIKV como anticorpo primário (diluição 1:50).

Dentre os poucos trabalhos da literatura que descrevem o cultivo de células de mamíferos para a produção de VLPs em perfusão (FONTANA et al., 2015; FUENMAYOR et al., 2018; VENEREO-SANCHEZ et al., 2017), nenhum deles é relacionado a flavivírus e apenas um (FONTANA et al., 2018) foca na expressão constitutiva de VLPs. No trabalho de FONTANA e colaboradores (2015), a linhagem celular recombinante foi obtida por meio de transdução de células HEK293 com um vetor lentiviral para expressar constitutivamente VLPs do vírus da raiva. A produção de VLPs foi realizada por meio do cultivo da linhagem recombinante em biorreator do tipo tanque agitado operado em perfusão, utilizando *spin filters* como equipamento de retenção celular. Testes *in vivo* confirmaram que as VLPs produzidas foram capazes de induzir a formação de anticorpos neutralizantes e proteger contra o vírus da raiva sem necessidade do uso de adjuvantes.

FUENMAYOR e colaboradores (2015) mostraram o uso de processos contínuos em perfusão para transfectar células HEK293 e expressar VLPs de HIV de forma transiente. Em tais processos, a transfecção foi realizada no próprio biorreator e a coleta do produto foi feita entre 48 e 96h pós-transfecção, utilizando-se um filtro acústico para reter as células no interior do sistema.

Já VENEREO-SANCHEZ e colaboradores (2017) detalharam a expressão induzível de VLPs de influenza a partir do cultivo de células HEK293. Primeiramente, os autores otimizaram a produção de VLPs em frascos agitados e, após isso, realizaram a produção de tais partículas em biorreator do tipo tanque agitado acoplado a um filtro acústico para retenção celular.

De forma a desenvolver uma plataforma acessível para o cultivo de altas concentrações celulares em perfusão, um sistema de expressão constitutivo pode apresentar menores custos e ser vantajoso quando comparado a sistemas de expressão transientes ou indutíveis. Neste trabalho, propôs-se o uso de linhagens celulares recombinantes expressando VLPs de forma estável e constitutiva e seu cultivo em biorreatores em modo contínuo com reciclo celular (perfusão), utilizando o sistema ATF-2 como equipamento de retenção celular. De acordo com a pesquisa bibliográfica realizada, não existem trabalhos na literatura reportando a produção de VLPs de forma estável e constitutiva por meio do cultivo de células HEK293 em perfusão.

5.3. Avaliação do comportamento celular das populações produtoras em frascos agitados 30 dias após a transfecção

Como o objetivo principal deste estudo foi avaliar a produção de VLPs em biorreatores de tanque agitado, inicialmente fez-se a investigação do comportamento celular das populações estáveis quando cultivadas sob agitação em modo batelada (Figura 14). Em geral, o crescimento celular e o perfil metabólico foi similar para as diferentes populações.

Células cultivadas *in vitro* mostram um padrão sigmóide de crescimento, que reflete a adaptação da cultura, o condicionamento do ambiente, a disponibilidade de nutrientes e outros fatores (LÉO et al., 2008). No início do ensaio cinético de crescimento celular, as células encontravam-se em uma fase conhecida como fase lag, em que há adaptação ao microambiente e às condições de cultivo, não havendo aumento aparente da concentração de células viáveis. Após este período, entre os dias 2 e 5 do cultivo, as células encontravam-se em fase exponencial de crescimento, isto é, multiplicando-se exponencialmente. A partir do dia 6, a diminuição da concentração de substratos e o acúmulo de metabólitos inibitórios começou a afetar o crescimento celular, de modo que as células entraram em fase estacionária. Logo em seguida, iniciou-se a fase de declínio, em que a taxa de morte celular é superior à taxa de proliferação celular, ocorrendo queda da concentração de células viáveis e da viabilidade celular, como observado na Figura 14A.

Em relação ao consumo do substrato glicose e à geração do metabólito secundário lactato, observa-se novamente comportamento semelhante entre as populações avaliadas (Figura 14B). Como descrito na literatura, à medida em que a glicose é metabolizada pelas células, ocorre a formação de lactato. A diminuição de substrato disponível estimula a mudança do metabolismo celular, de forma que o lactato passa a ser utilizado como substrato para gerar ATP (adenosina trifosfato) intracelularmente, em um comportamento análogo ao que ocorre no processo de gliconeogênese em hepatócitos humanos (ALTAMIRANO et al., 2013; ZAGARI et al., 2013). Este fenômeno é conhecido como *shift* metabólico e explica a queda da concentração de lactato entre os dias 5 e 6 da cinética.

O meio de cultivo livre de componentes de origem animal utilizado, HEK TF, foi o mesmo utilizado nas etapas de transfecção estável e manutenção das populações e foi capaz de suportar o crescimento celular nestes experimentos até a concentração máxima de $10{,}3 \times 10^6$ células/mL. Pequenas variações foram observadas na taxa específica de crescimento, porém, em geral, dentro da variação do desvio padrão das diferentes populações (Tabela 6). O

valor médio das diferentes populações de 0,49 ± 0,02 d^{-1} e o tempo de duplicação médio de 33,8 ± 1,2 h^{-1}. A combinação de altas concentrações celulares e altas viabilidades celulares obtidas confirmam que a expressão constitutiva de VLPs de ZIKV não foi deletéria às células.

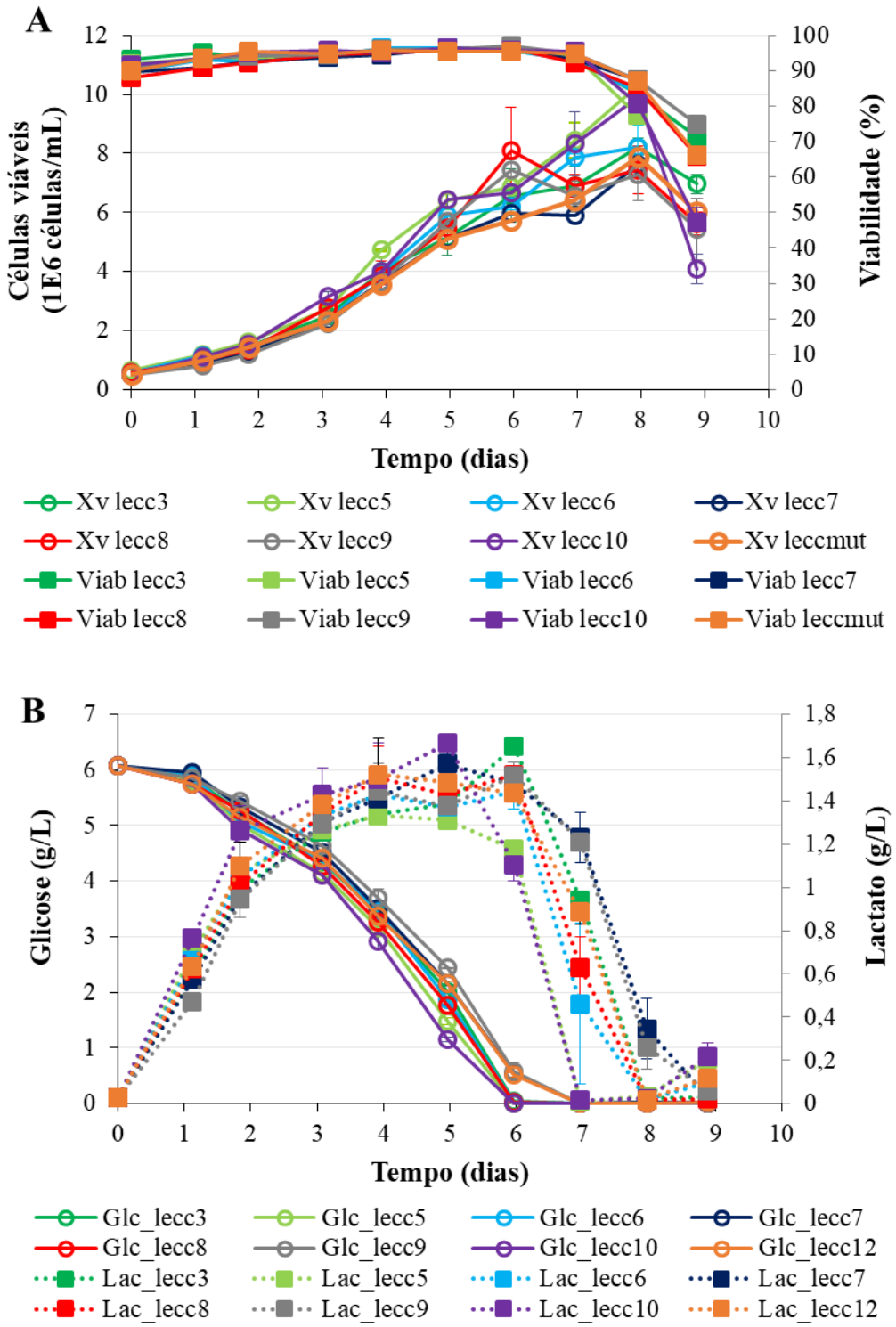


Figura 14: Perfil cinético do cultivo das populações estáveis produtoras de VLPs de Zika em frascos agitados no modo batelada. (A) Concentração de células viáveis (círculos não preenchidos) e viabilidade

celular (quadrados preenchidos) das populações estáveis. (B) Concentração de glicose (Glc) (círculos não preenchidos) e lactato (Lac) (quadrados preenchidos).

Tabela 6: Concentração máxima de células viáveis ($X_{v_{máx}}$), taxa específica de crescimento na fase exponencial (μ_{exp}) e tempo de duplicação para cada população estável no experimento de cultivo em batelada, de acordo com as equações 2 e 3.

Linhagem celular	$X_{v_{máx}}$ **(×10^6 células/mL)**	μ_{exp} **(dia^{-1})**	**Tempo de duplicação (h^{-1})**
HEK293-lecc3	8,2 ± 0,3	0,48 ± 0,04	34,9 ± 2,9
HEK293-lecc5	10,3 ± 0,3	0,48 ± 0,01	34,7 ± 0,6
HEK293-lecc6	8,2 ± 0,8	0,47 ± 0,02	35,8 ± 1,2
HEK293-lecc7	7,6 ± 0,6	0,50 ± 0,02	33,6 ± 1,3
HEK293-lecc8	8,1 ± 1,5	0,50 ± 0,03	33,6 ± 2,0
HEK293-lecc9	7,4 ± 0,34	0,52 ± 0,00	32,3 ± 0,3
HEK293-lecc10	9,9 ± 0,2	0,54 ± 0,03	31,0 ± 1,8
HEK293-leccmut	7,9 ± 0,6	0,48 ± 0,04	34,5 ± 2,8

O sobrenadante celular das populações estáveis foi coletado diariamente durante o experimento, de forma a comparar o nível de expressão das diferentes construções de VLPs ao longo dos dias (Figura 15). De acordo com a análise por imunoensaio *spot blot*, é possível observar que a expressão de VLPs pelas populações HEK293-lecc3 e HEK293-lecc6 não foi detectada. Avaliando-se qualitativamente, a produção observada para as construções lecc7 e leccmut pode ser considerada intermediária, visto que foi maior que a detectada para as construções lecc3 e 6 e menor do que a observada para as construções lecc5, 8, 9 e 10. Contudo, devido à mutação no loop de fusão presente em leccmut, estas amostras foram avaliadas em separado, utilizando-se soro anti-prME de ZIKV para detecção e, portanto, uma comparação direta não é possível.

Com este ensaio, confirmam-se os resultados obtidos durante a seleção de populações estáveis de populações produtoras de VLPs lecc8, 9 e 10 seriam mais promissoras, provavelmente devido ao maior potencial dos respectivos peptídeos sinal. Entretanto, observa-se que HEK293-lecc5 apresentou produção comparável às populações citadas anteriormente, o que não havia sido observado anteriormente (Figura 13C). Além disso, quando se compara a produção de VLPs da construção lecc7 com lecc8, 9 e 10, a primeira apresenta menor nível.

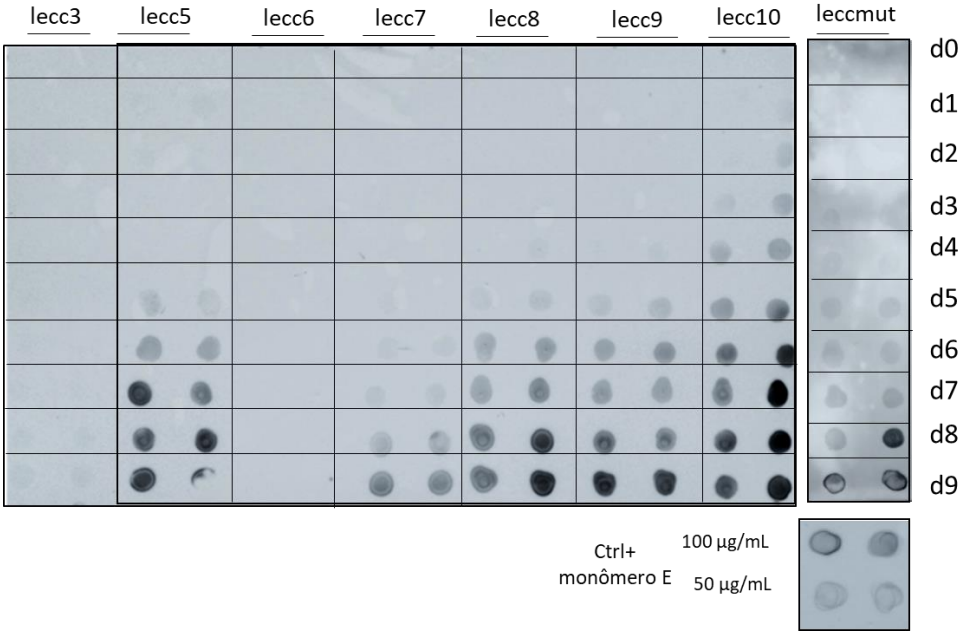


Figura 15: Detecção por *spot blot* de VLPs expressas por diferentes populações estáveis cultivadas em modo batelada. Utilizou-se o 4G2 como anticorpo primário para detecção das populações, com exceção das amostras referentes à população HEK293-leccmut, para a qual a análise por imunoensaio foi realizada utilizando soro de camundongos imunizados com plasmídeo contendo prME de ZIKV como anticorpo primário (diluição 1:50).

5.4. Seleção de subpopulações com maior produção de VLPs por meio do uso de FACS

O vetor pCIneo, empregado na transfecção das células HEK293-3F6, propicia a integração aleatória do transgene no genoma das células. Sendo assim, as populações transfectadas são caracterizadas por uma heterogeneidade de expressão, decorrente da posição de integração do transgene no genoma de cada célula da população.

Além disso, a linhagem HEK293 não possui um sistema de amplificação gênica eficaz, como os sistemas CHO-DHFR$^-$ e CHO-GS, disponíveis para plataformas baseadas em células CHO. Sendo assim, com o objetivo de obter uma subpopulação mais homogênea e com maior produção de VLPs, empregou-se FACS para selecionar um subconjunto de células altamente produtoras (SONG et al., 2011).

Conforme verificado por DOWD e colaboradores (2016), as versões quimérica ou selvagem da proteína E presentes em construções prM-E podem desencadear a geração de anticorpos com diferentes perfis de neutralização e com variadas capacidades de proteção. Assim, escolheu-se as populações produtoras das construções lecc3, composta por proteína E quimérica, e lecc9, contendo a sequência selvagem da proteína E, para estudos subsequentes de enriquecimento por FACS nas semanas 21 e 6 após a transfecção, respectivamente.

Baseando-se na hipótese de que proteínas secretadas podem ser encontradas de forma transiente na membrana celular (BREZINSKY et al., 2003; OKUMURA et al., 2015), as células foram marcadas com o anticorpo 4G2 biotinilado e, subsequentemente, este foi ligado ao fluoróforo ficoeritrina conjugada à estreptavidina, de forma a selecionar uma subpopulação com alto nível de produtividade por meio de citometria de fluxo acoplada a sorter (FACS) preparativa.

A análise das populações estáveis HEK293-lecc3 e HEK293-lecc9 por FACS confirmou a heterogeneidade das populações, consideradas estáveis por terem sobrevivido ao processo de seleção. Apenas 0,3-0,8% das células apresentaram intensidade de fluorescência expressivamente maior que o controle negativo (células não marcadas). Dentre as células desta subpopulação, coletaram-se 150.000-200.000 células em tubos cônicos e, posteriormente, a suspensão foi transferida para placas de 24 poços profundos ou tubos agitados, de modo a se realizar a expansão da suspensão celular e subsequente produção de bancos de trabalho. A análise do sobrenadante coletado antes e após o experimento de *sorting* permitiu a comparação da produção de VLPs por células que passaram pelo procedimento ou não, sendo confirmado o aumento na detecção de VLPs pelas subpopulações enriquecidas em células com maiores níveis de produção (Figura 16).

De forma adicional à avaliação da estabilidade já mostrada anteriormente (Figura 13C), monitorou-se a produção de VLPs das populações produtoras das construções lecc3 (Figura 16A) e lecc9 (Figura 16C). Células HEK293-lecc3 mostraram produção similar de VLPs para amostras de sobrenadante coletadas nas semanas 6 e 21 pós-transfecção (p.t.). Parte da suspensão celular foi mantida na ausência de G418 sulfato a partir da semana 16 e, mesmo neste caso, a produção de VLPs mostrou-se similar, confirmando a estabilidade da expressão por até 5 semanas na ausência do agente de seleção. Após o enriquecimento de células cultivadas na presença ou ausência de G418 sulfato, a produção de VLPs manteve-se similar em ambas as condições.

No caso de células HEK293-lecc9 (não-enriquecidas), a expressão de VLPs foi monitorada até a semana 14 p.t. e não foi detectada diminuição no nível de expressão. De forma similar ao procedimento feito para a população produtora da construção lecc3, manteve-se parte da suspensão celular na ausência do agente de seleção a partir da semana 11 e confirmou-se a estabilidade da produção.

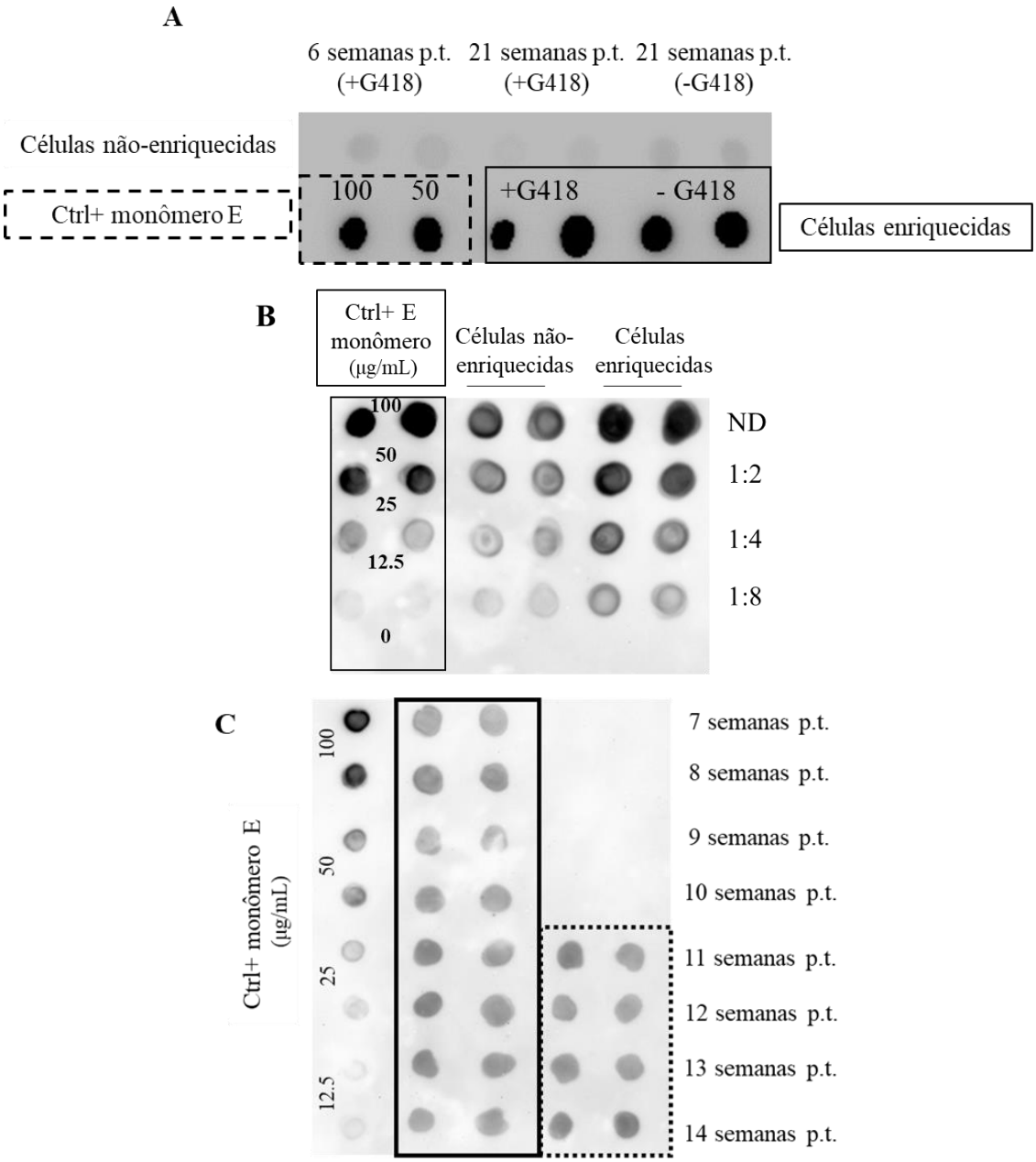


Figura 16: Imunoensaio do tipo *spot blot* confirmando aumento da produção de VLPs por células que passaram pelo procedimento de enriquecimento por FACS. O anticorpo monoclonal 4G2 foi utilizado como anticorpo primário nos ensaios. (A) Células HEK293-lecc3 foram mantidas em cultivo por mais de 20 semanas após a transfecção e pode ser observada produção de VLPs similar para amostras coletadas 6 e 21 semanas p.t. Parte da suspensão celular foi mantida na ausência do agente de seleção (G418) a partir da semana 16 p.t. e, novamente, observou-se expressão de VLPs similar às amostras de 6 e 21 semanas p.t., ambas na presença de G418 sulfato. (B) Expressão de VLPs obtida por células HEK293-lecc9 que passaram ou não pelo enriquecimento. (C) Avaliação da estabilidade da expressão de VLPs pela população HEK293-lecc9 (não-enriquecida) na presença do agente de seleção (retângulo com linha contínua). Células mantidas na ausência do agente de seleção a partir da semana 11 também mostram estabilidade na produção de VLPs (retângulo com linha pontilhada). Como controle positivo, utilizou-se proteína E de Dengue em diferentes concentrações.

Baseando-se nos resultados obtidos, células HEK293-lecc3 enriquecidas foram selecionadas para estudos posteriores, com o objetivo de desenvolver um processo de produção de VLPs em perfusão.

5.5. Investigação do uso de linhagens estáveis para desenvolver processos de produção em modo contínuo: avaliação em pequena escala

Frascos agitados tem sido utilizados desde o início da história do cultivo de células em suspensão. Neste caso, a agitação e a aeração são controlados pela incubadora e o agitador orbital onde os frascos estão acondicionados. Dentre os sistemas de cultivo mais utilizados em modelos *scale-down*, os tubos agitados ganham destaque (BIELSER et al., 2018).

Com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes estratégias de alimentação no comportamento de células HEK293-lecc3 (enriquecidas), investigou-se o cultivo de altas densidades celulares em tubos agitados em modo pseudoperfusão, de forma a simular uma perfusão em menor escala.

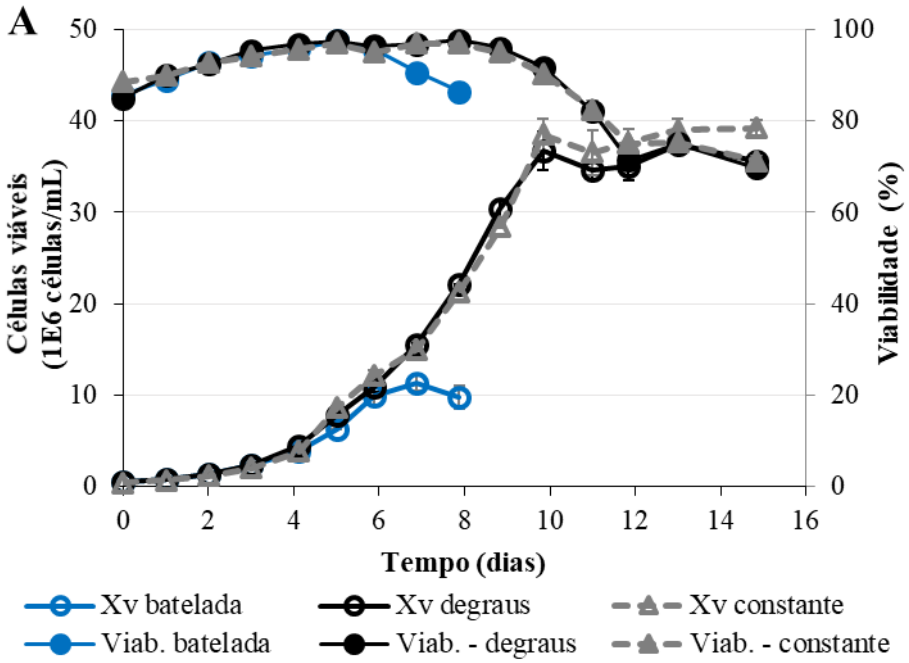
Nos ensaios com tubos agitados em pseudoperfusão, utilizou-se a centrifugação para reter as células e permitir as trocas de meio necessárias para cada estratégia de alimentação, simulando a perfusão de forma intermitente (BIELSER et al., 2018; CARVALHO e CASTILHO, 2017). Dados da literatura mostram que o uso de frascos agitados pode ser útil na predição do comportamento de células quando cultivadas em perfusão contínua em maior escala, como em biorreatores do tipo tanque agitado operados em perfusão (AHUJA et al., 2015; BETTINARDI, 2016; NIKOLAY et al., 2018a).

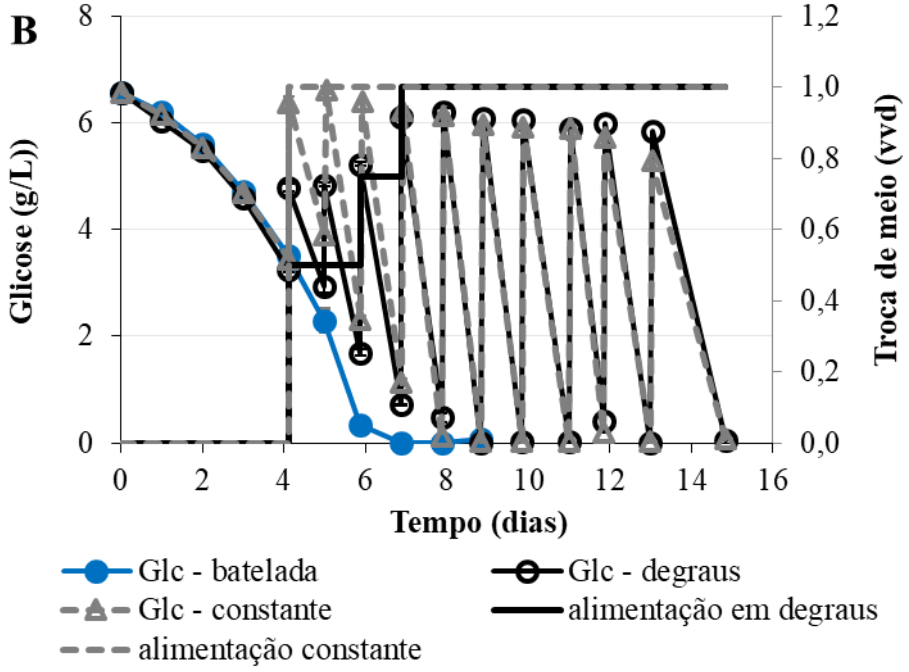
Experimentos em tubos agitados foram realizados de forma a testar estratégias de alimentação baseadas na troca de meio de cultivo em degraus, a qual foi feita de acordo com a demanda celular por glicose, ou de forma constante, onde foi feita troca diária de 100% do meio condicionado, ambas iniciadas no dia 4 de cultivo. O objetivo de tal experimento foi avaliar o efeito da renovação do meio de cultivo, acrescentando nutrientes, retirando metabólitos do ambiente e mantendo as células no frasco de cultivo, na forma de uma perfusão intermitente.

Como observado na Figura 17A, o crescimento foi substancialmente maior quando células foram cultivadas em pseudoperfusão em relação aos resultados obtidos para células propagadas em modo batelada, o que já é previsto na literatura quando ocorre alimentação de nutrientes ao longo do cultivo (CHICO et al., 2008; WARNOCK e AL-RUBEAI, 2006). Além disso, foi possível manter as células com alta viabilidade por mais tempo quando as estratégias

de alimentação foram aplicadas, visto que os nutrientes presentes no meio eram constantemente renovados com as duas diferentes estratégias de alimentação. Entretanto, quando se compara o crescimento de células alimentadas com as diferentes estratégias não há variação significativa, especialmente porque as diferenças no volume de meio trocado ficou restrita aos dias 4-7 do cultivo, quando a concentração de glicose no meio não foi limitante (> 1g/L) (Figura 17B). Desta forma, escolheu-se a estratégia de alimentação baseada na demanda celular para ser aplicada no experimento para avaliação da produção de VLPs de Zika em biorreator de tanque agitado, pois a mesma reduz o desperdício de meio de cultivo na fase inicial da cultura.

No que se refere à produção de partículas pseudovirais, tanto a análise qualitativa por *spot blot* (Figura 17C) quanto os dados semi-quantitativos obtidos por análise da imagem e densitometria de tal imunoensaio (Figura 17D), confirmam que os cultivos em pseudoperfusão apresentaram um desempenho melhor do que o controle em batelada, atingindo uma concentração de VLPs aproximadamente quatro vezes maior. Considerando os dados semi-quantitativos, em batelada teria sido alcançada uma concentração máxima de VLPs de, aproximadamente, 22 µg/mL, enquanto atingiu-se cerca de 90 µg/mL em pseudoperfusão. Estes resultados indicam que o processo de perfusão intermitente avaliado (pseudoperfusão) permite alcançar maiores concentrações não apenas de células viáveis, mas também de produto obtido. Resultados ainda melhores poderiam potencialmente ser obtidos se fossem realizadas mais trocas de meio por dia, pois os níveis de glicose não chegariam a níveis nulos, como ocorrido no experimento em questão (Figura 17B). Assim, acredita-se que uma plataforma baseada no cultivo de células produtoras de VLPs em modo contínuo com retenção celular (perfusão) poderia ser ainda mais vantajoso e fornecer altas produtividades volumétricas, contribuindo para a viabilidade econômica de tal produto como candidato à produção de uma vacina contra o vírus Zika.


A
Células viáveis (1E6 células/mL)
Viabilidade (%)
Tempo (dias)
Xv batelada
Xv degraus
Xv constante
Viab. batelada
Viab. - degraus
Viab. - constante


B
Glicose (g/L))
Troca de meio (vvd)
Tempo (dias)
Glc - batelada
Glc - degraus
Glc - constante
alimentação em degraus
alimentação constante

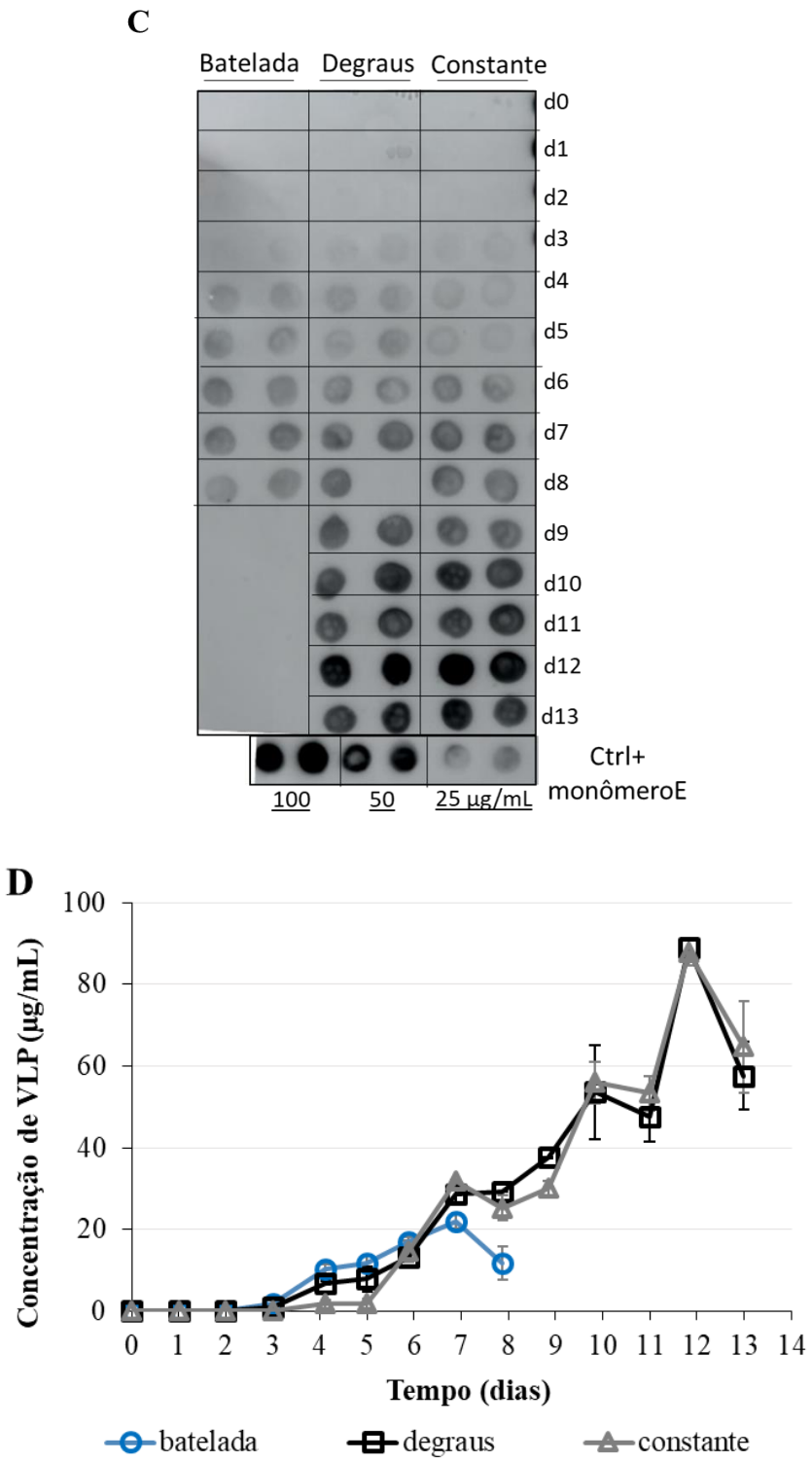


Figura 17: Produção de VLPs por células HEK293-lecc3 (enriquecidas) cultivadas em tubos agitados nos modos de operação batelada e pseudoperfusão. (A) Concentração de células viáveis e viabilidade durante o cultivo das células nas diferentes condições. (B) Concentração de glicose (Glc) e proporção de meio trocado em volume de meio fresco adicionado por volume de trabalho por dia (vvd). As estratégias de alimentação foram iniciadas no dia 4 e amostras foram retiradas diariamente antes e após a realização da troca de meio de cultivo. (C) *Spot blot* das amostras de sobrenadante coletadas entre os dias 0 e 13 do cultivo, realizado com o anticorpo primário 4G2. (D) Concentração de VLPs obtida para células cultivadas em batelada ou em pseudoperfusão, determinada por meio de análise de imagem e densitometria do *spot blot* mostrado em (D).

5.6. Corrida em biorreator operado em perfusão para produção de VLPs

A avaliação inicial do uso de biorreatores de tanque agitado para produção de VLPs de Zika envolveu o uso do sistema ATF-2, o qual promove a retenção celular por filtração tangencial alternada, permitindo a completa retenção de células e, idealmente, a não retenção de produto no interior do biorreator. Embora não tenha sido reportado na literatura o uso do ATF para VLPs, um sistema de perfusão baseado no uso do ATF como equipamento de retenção foi descrito por NIKOLAY e colaboradores (2018b) como uma plataforma eficiente para a produção do vírus Zika nativo a partir de células BHK-21 infectadas.

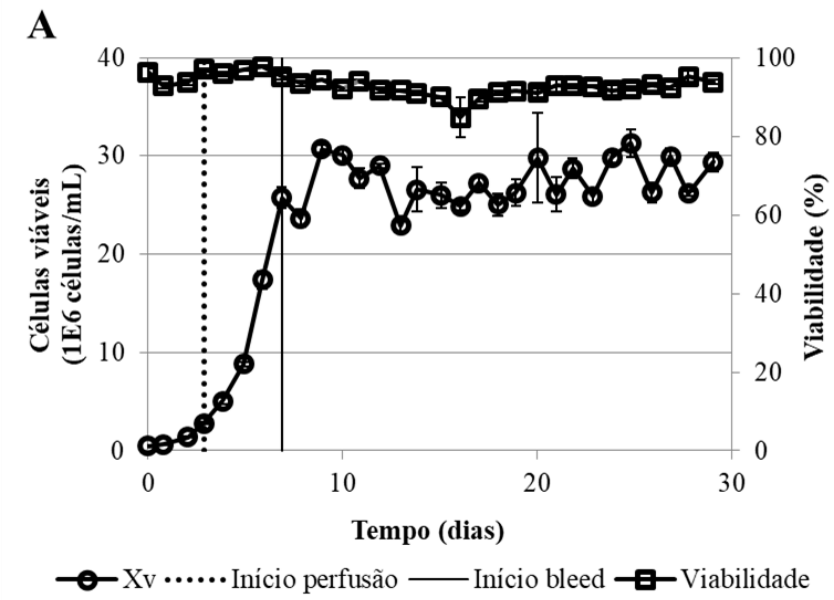
O sistema ATF-2 foi iniciado no dia 2 de cultivo, um dia antes do início da perfusão propriamente dita, para confirmar que seu funcionamento não prejudicaria o crescimento e a viabilidade das células. Não foram observados efeitos negativos no comportamento de células HEK293-lecc3 (enriquecidas), indicando que a tensão de cisalhamento promovida no interior do módulo de microfiltração não foi deletéria e ainda contribuiu para a diminuição da agregação celular. Entretanto, apesar de as partículas pseudovirais terem, aproximadamente, 50 nm de tamanho e o poro do módulo de microfiltração do ATF-2 usado ser de 0,22 µm, foi observado aumento da retenção de produto no biorreator ao longo do cultivo, principalmente a partir do dia 15 de cultivo (Figura 18C). Embora NIKOLAY e colaboradores (2018b) não tenham observado a retenção do vírus Zika ao usar o mesmo equipamento de retenção, os resultados do experimento revelam a coleta reduzida de produto em relação ao que foi, de fato, produzido.

De acordo com dados mostrados na Figura 18C, a concentração de VLPs dentro do biorreator atingiu um pico no dia 12 e teve queda progressiva até o fim do cultivo. Visto que este experimento foi inoculado com células com alto número de passagem e a estabilidade de produção para esta linhagem só foi demonstrada até a semana 21 pós-transfecção, estudos adicionais são necessários para comparar células com diferentes idades *in vitro*. A concentração máxima de VLP no biorreator foi de, aproximadamente, 90 µg/mL no dia 12, mas espera-se alcançar concentrações maiores quando se utilizar um equipamento de retenção celular que não promova retenção de produto e uso de células com menor número de passagens.

No que diz respeito ao crescimento celular, devido ao fato de células HEK293 apresentarem alta demanda por oxigênio e para evitar a limitação do mesmo, decidiu-se iniciar a remoção controlada de células quando a concentração celular atingiu, aproximadamente, 25×10^6 células/mL (Figura 18A). Desta forma, iniciou-se um estado estacionário com *cell bleed* no dia 7, de modo que a taxa de *bleed* utilizada era equivalente a taxa específica de

crescimento (μ), mantendo-se, assim, a concentração celular entre 25 e 30 milhões de células por mililitro. Durante a fase do cultivo operada em modo batelada, até o dia 4, a taxa específica de crescimento foi comparável àquela obtida para células cultivadas em frascos agitados, como esperado.

A taxa de perfusão é um parâmetro chave para o desempenho do processo. Em geral, para que seja possível economizar meio de cultivo e diminuir custos de produção, além de maximizar a concentração de produto, o ideal é operar o biorreator com a menor taxa específica de perfusão (do inglês *cell specific perfusion rate*, CSPR) possível (BIELSER et al., 2018; CASTILHO, 2015). Conforme mostrado nos experimentos em pseudoperfusão, a estratégia de alimentação em degraus, baseada na alimentação de meio conforme a demanda celular, pode ser utilizada e, assim, reduzir os volumes de meio aplicados durante o cultivo. Desta forma, a taxa de perfusão no experimento em questão foi reajustada diariamente de acordo com a demanda celular, de forma a manter a concentração de glicose em torno de 1 g/L (Figura 18B). Entretanto, neste estudo aplicou-se uma taxa de perfusão de 1,5 vvd, que corresponde a uma CSPR de, aproximadamente, 50-60 pL/célula/dia, a qual é maior do que a CSPR considerada ótima na literatura (CASTILHO, 2015). Estudos adicionais objetivando a otimização da estratégia de alimentação e do meio utilizado pode levar a um processo que requeira menor uso de meio de cultivo, contribuindo para a redução de custos.



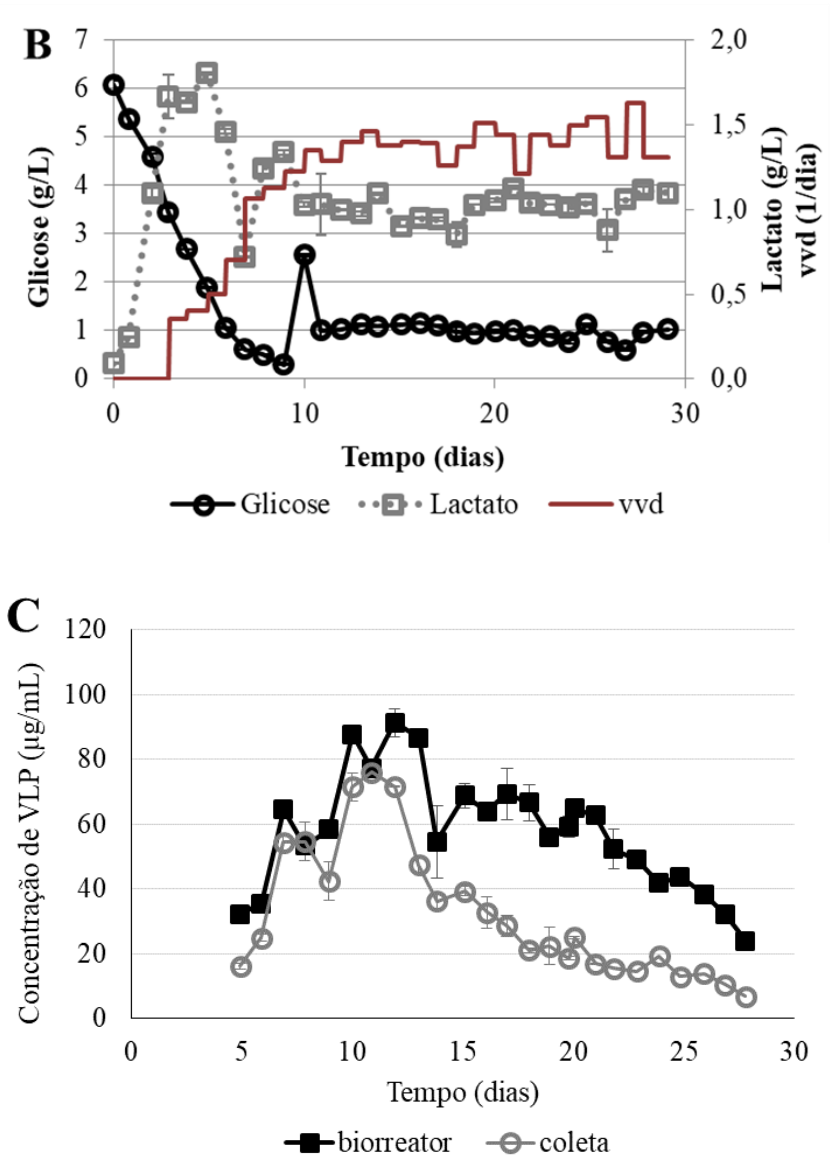


Figura 18: Produção de partículas pseudovirais de Zika por células HEK293-lecc3 (enriquecidas) em perfusão. (A) Concentração de células viáveis (círculos) e viabilidade durante o cultivo em biorreator. (B) Concentrações de glicose (círculo preto) e lactato (quadrado cinza) e taxa de perfusão (vvd) durante a corrida em perfusão, dada em volume de meio fresco por volume de vaso por dia. (C) Concentração de VLPs medidas no biorreator (quadrados) e na coleta (círculos) em termos de proteína E. Os resultados confirmam a retenção do produto no interior do biorreator devido ao uso do sistema XCell™ ATF-2.

Como mostrado na produção de VLPs de outros vírus (FONTANA et al., 2015; FUENMAYOR et al., 2018; VENEREO-SANCHEZ et al., 2017) e de produtos biofarmacêuticos em geral (CLINCKE et al., 2013; VOISARD et al., 2003), processos em perfusão permitem a obtenção de produtividade mais elevada em comparação com àqueles operados em modo batelada ou batelada alimentada. Os resultados aqui apresentados confirmam que a tecnologia de produção em perfusão utilizando linhagens celulares

transfectadas de forma estável, expressando as VLPs de forma constitutiva, representa uma plataforma promissora para a produção de vacinas e mostra melhoria de resultados quando comparada a outros modos de operação avaliados neste trabalho (Tabela 7). Adicionalmente, a estratégia desenvolvida neste trabalho pode ser facilmente aplicada para a produção de outras construções de VLPs de Zika, assim como para a produção de VLPs de outros flavivírus que circulam nas Américas e que têm sido expressas em nosso laboratório, como VLPs dos vírus da Febre Amarela, Dengue 1-4, encefalite de Saint Louis, Ilhéus, Cacipacoré e Oeste do Nilo.

Tabela 7: Comparação da concentração máxima de células viáveis ($X_{v_{(máx)}}$), concentração máxima de produto obtida ($P_{máx}$) e produtividade volumétrica máxima (P_v) obtidas a partir do cultivo de células HEK2l3-lecc3 (enriquecidas) em batelada, pseudoperfusão e perfusão.

Parâmetro	**Batelada**	**Pseudoperfusão (degraus)**	**Perfusão**
$X_{v_{(máx)}}$ (x 10^6 células/mL)	11,3	37,4	30,7
$P_{máx}$ (µg/mL)	21,9	89,1	91,3
P_v (mg/L/d)	3,4	-	25,0

Visto que foi observada retenção do produto decorrente do uso do ATF-2, acredita-se que a avaliação de outros equipamentos de retenção celular deve ser realizada. VOISARD e colaboradores (2003) salientam que processos em perfusão dependem de equipamentos de retenção celular que permitam a eficiente remoção de metabólitos e a troca de meio a taxas que suportem as elevadas concentração celular e produtividade. Para isso, o equipamento deve atuar propiciando a mínima perda de células viáveis e não causando danos às mesmas. Pelo fato de cada processo produtivo utilizar linhagens celulares e condições diferentes, o estudo do equipamento de retenção deve ser realizado caso a caso. Até os dias atuais, equipamentos utilizando diferentes princípios de separação como tamanho, densidade, carga elétrica, constante dielétrica e propriedades de superfície já foram avaliados e, assim, poderiam ser candidatos a substituir o ATF em uma plataforma para produção de VLPs de flavivírus (CARVALHO e CASTILHO, 2017; CASTILHO e MEDRONHO, 2008; VOISARD et al., 2003).

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se afirmar que foi possível gerar linhagens celulares estáveis produzindo VLPs de Zika de forma constitutiva e, ainda, comprovar a estabilidade da expressão por até 14 semanas, sem indícios de quaisquer efeitos deletérios às células produtoras. Baseando-se nos experimentos operados em batelada, observou-se que as linhagens estáveis geradas, quando cultivadas no meio quimicamente definido HEK TF, atingem até, aproximadamente, 11 milhões de células por mililitro.

De forma a aumentar a concentração de células e a produção de VLPs, avaliou-se o cultivo em pseudoperfusão de células HEK293-lecc3 enriquecidas por meio da seleção de uma subpopulação por FACS e obtiveram-se elevadas concentrações de células viáveis (cerca de 40×10^6 células/mL) em decorrência da adição de nutrientes e remoção de metabólitos secundários do ambiente celular. A concentração celular e produção de VLPs obtidas foram, aproximadamente, quatro vezes maior em comparação ao cultivo da mesma linhagem em batelada, confirmando o potencial de processos em perfusão para produção destas VLPs.

Por fim, foi realizado o estudo do comportamento de células HEK293-lecc3 (enriquecidas) em biorreator do tipo tanque agitado operado em modo contínuo com reciclo celular (perfusão). Uma das estratégias de alimentação previamente avaliada em frascos agitados operados em pseudoperfusão foi aplicada com sucesso, mostrando que é possível utilizar uma estratégia em degraus baseada na demanda celular para suprir tais células nutricionalmente.

A investigação do sistema XCell™ ATF-2 como equipamento de retenção celular mostrou que as tensões de cisalhamento ocasionadas pelo uso do equipamento não levaram à queda na viabilidade celular, a qual se manteve acima de 90% durante quase 30 dias. Entretanto, foi observada retenção de produto no interior do biorreator, indicando que o módulo de microfiltração utilizado estaria impedindo a permeação completa das VLPs para a corrente de filtrado (perfundido).

Todavia, acredita-se que células produtoras de VLPs de Zika e de outros flavivírus já produzidas no laboratório possam ser cultivadas em biorreatores de tanque agitado operado em modo perfusão, desde que se faça uso de outros equipamentos para retenção celular. Para tal

mudança na plataforma de produção, sugere-se estudar outros equipamentos de retenção celular para realizar a perfusão.

Adicionalmente, de forma a diminuir os custos de produção, sugere-se o estudo da redução da taxa específica de perfusão (CSPR), permitindo um menor consumo de meio de cultivo.

Para buscar aumento da produtividade, é interessante que se avalie futuramente, preliminarmente em pequena escala, o efeito de estratégias como uso de temperaturas subfisiológicas e adição de substâncias que promovam aumento da produção, como ácidos graxos de cadeia curta, a citar-se os ácidos butírico e valérico. Ambas as estratégias, adotadas anteriormente no LECC/COPPE/UFRJ, foram capazes de aumentar a produtividade de células CHO produtoras de Fator VIII recombinante (LAGES, 2015) e podem trazer melhorias também quando aplicadas à produção de VLPs por células HEK293.

Por fim, as estratégias a serem otimizadas para a produção de VLPs devem ser validadas em biorreatores do tipo tanque agitado, estabelecendo assim uma plataforma passível de ampliação de escala para a produção de VLPs.

De forma complementar, deve-se comprovar que as VLPs produzidas pela tecnologia proposta são capazes de gerar resposta imune *in vitro*.

Em resumo, foi mostrado neste trabalho que linhagens celulares estáveis e processos em perfusão trazem perspectivas promissoras para o desenvolvimento de tecnologias de produção em larga escala e com boa relação custo-benefício para a produção de VLPs de diferentes flavivírus, de modo que o desenvolvimento de processos otimizados e de linhagens estáveis produzindo outras VLPs deve ser avaliado em trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBINK, P., LAROCCA, R.A., DE LA BARRERA, R.A., BRICAULT, C.A., MOSELEY, E.T., BOYD, M., et al. (2016). Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. *Science*, 353(6304), 1129–1132.

AHUJA, S., JAIN, S., RAM, K. (2015). Application of multivariate analysis and mass transfer principles for refinement of a 3-L bioreactor scale-down model-when shake flasks mimic 15,000-L bioreactors better. *Biotechnology Progress*, 31(5), 1370–1380.

ALTAMIRANO, C., BERRIOS, J., VERGARA, M., BECERRA, S. (2013). Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(3), 10-10.

ANSORGE, S., LANTHIER, S., TRANSFIGURACION, J., DUROCHER, Y., HENRY, O., KAMEN, A. (2009). Development of a scalable process for high-yield lentiviral vector production by transient transfection of HEK293 suspension cultures. *Journal of Gene Medicine*, 11, 868-876.

BANDARANAYAKE, A.D., ALMO, S.C. (2014). Recent advances in mammalian protein production. *FEBS Letters*, 588, 253–260.

BARRETT, A. D. T. (2018). Current status of Zika vaccine development: Zika vaccines advance into clinical evaluation. *Npj Vaccines*, 3(1).

BETTINARDI, I.W. (2016) Desenvolvimento de Estratégias de Alimentação com Meios Concentrados para Cultivo de Células Animais em Perfusão. Dissertação de M.Sc., COPPE – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

BIELSER, J.M., WOLF, M., SOUQUET, J., BROLY, H., MORBIDELLI, M. (2018). Perfusion mammalian cell culture for recombinant protein manufacturing – A critical review. *Biotechnology Advances*, 36, 1628-1640.

BOIGARD, H., ALIMOVA, A., MARTIN, G.R., KATZ, A., GOTTLIEB, P., GALARZA, J.M. (2017). Zika virus-like particle (VLP) based vaccine. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(5): e0005608.

BOLLATI-FOGOLÍN, M., COMINI, M.A. Clonagem e Expressão de Proteínas Heterólogas em Células Animais. In: MORAES, A. M., AUGUSTO, E. F. P., CASTILHO, L. R. (Org.), Tecnologia do Cultivo de Células Animais - de Biofármacos a Terapia Gênica. Edição 1, Capítulo 3. São Paulo: Roca, 2008.

BREZINSKY, S.C.G., CHIANG, G.G., SZILVASI, A., MOHAN, S., SHAPIRO, R.I., MacLEAN, A., SISK, W., THILL, G. (2003). A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity. *Journal of Immunological Methods*, *277*(1–2), 141–155.

CALVET, G., AGUIAR, R.S., MELO, A.S.O., SAMPAIO, S.A., DE FILIPPIS, I., FABRI, A., ARAUJO, E.S.M., DE SEQUEIRA, P.C., DE MENDONÇA, M.C.L., DE OLIVEIRA, L., et al. (2016). Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious Diseases*, *16*(6), 653–660.

CAO-LORMEAU, V.M., BLAKE, A., MONS, S., LASTÈRE, S., ROCHE, C., VANHOMWEGEN, J., DUB, T., BAUDOIN, L., TEISSIER, A., LARRE, P., et al. (2016). Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. *The Lancet*, 387(10027), 1531–1539.

CARVALHO, R.J., CASTILHO, L.R. Tools Enabling Continuous and Integrated Upstream and Downstream Processes in the Manufacturing of Biologicals. In: SUBRAMANIAN, G (ed.). Continuous Biomanufacturing: Innovative Technologies and Methods, 1ª Ed., cap. 2. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017

CASALE, T.B., TENG, M.N., MORANO, J.P., UNNASCH, T., LOCKWOOD, C.J. (2018). Zika virus: An emerging infectious disease with serious perinatal and neurologic complications. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(2), 482–490.

CASTILHO, L., MEDRONHO, R. (2002). Cell Retention Devices for Suspended-Cell Perfusion Cultures. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 74, 129–169.

CASTILHO, L.R., MEDRONHO, R. Animal cell separation. In: CASTILHO, L.R., MORAES, A.M., AUGUSTO, E.F.P. e BUTLER, M. (eds.). Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy, 1ª Ed., cap. 11. New York: Taylor&Francis, 2008.

CASTILHO, L.R. Continuous Animal Cell Perfusion Processes: The First Step Toward Integrated Continuous Biomanufacturing. In: SUBRAMANIAN, G. (ed). Continuous Processing in Pharmaceutical Manufacturing. 1 ed., p. 115–154, Wiley Blackwell, 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. (2018). World Map of Areas with Risk of Zika. 2018. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/page/world-map-areas-with-zika>. Acesso em 12/02/2019.

CERVERA, L., GUTIÉRREZ-GRANADOS, S., MARTÍNEZ, M., BLANCO, J., GÒDIA, F., SEGURA, M.M. (2013) Generation of HIV-1 Gag VLPs by transient transfection of HEK 293 suspension cell cultures using an optimized animal-derived component free medium. *Journal of Biotechnology*, 166:152–65.

CHACKERIAN, B. (2007). Virus-like particles: Flexible platforms for vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 6(3), 381-390.

CHANG, G.J.J. (1998). Chimeric flavivirus immunogens comprising the Japanese encephalitis virus (JEV) prM signal sequence, Patent US8221768B2. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US8221768B2/en23>

CHANG, G.J. J., DAVIS, B.S., HUNT, A.N.N.R., HOLMES, D.A. (2001). Flavivirus DNA Vaccines: Current Status and Potential. *Annals New York Academy of Sciences*, 951, 272–285.

CHANG, G.J.J., HUNT, A.R., HOLMES, D.A., SPRINGFIELD, T., CHIUEH, T.S., ROEHRIG, J.T., GUBLER, D.J. (2003). Enhancing biosynthesis and secretion of premembrane and envelope proteins by the chimeric plasmid of dengue virus type 2 and Japanese encephalitis virus. *Virology*, 306(1), 170–180.

CHICO, E., RODRÍGUEZ, G., FIGUEREDO, A. Biorreatores para células animais. In: MORAES, A.M., AUGUSTO, E.F.P., CASTILHO, L. R. (eds). Tecnologia do Cultivo de Células Animais - de Biofármacos a Terapia Gênica. 1 ed, Capítulo 9, São Paulo: Roca, 2008.

CIMICA, V., GALARZA, J.M. (2017. Adjuvant formulations for virus-like particle (VLP) based vaccines. *Clinical Immunology*. Academic Press Inc.

CLINCKE, M.F., MÖLLERYD, C., ZHANG, Y., LINDSKOG, E., WALSH, K., CHOTTEAU, V. (2013). Very high density of CHO cells in perfusion by ATF or TFF in WAVE bioreactor^{TM}: Part I: Effect of the cell density on the process. *Biotechnology Progress*, *29*(3), 754–767.

CUNNINGHAM, A.L., GARÇON, N., LEO, O., FRIEDLAND, L.R., STRUGNELL, R., LAUPÈZE, B., DOHERTY, M., STERN, P. (2016). Vaccine development: From concept to early clinical testing. *Vaccine*, 34(52), 6655–6664.

DICK, G., KITCHEN, S.F., HADDOW, A.J. (1952). Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(5), 509–520.

DI PASQUALE, A., BONANNI, P., GARÇON, N., STANBERRY, L.R., EL-HODHOD, M., TAVARES DA SILVA, F. (2016). Vaccine safety evaluation: Practical aspects in assessing benefits and risks. *Vaccine*, 34(52), 6672–6680.

D'ORTENZIO, E., MATHERON, S., DE LAMBALLERIE, X., HUBERT, B., PIORKOWSKI, G., MAQUART, M., DESCAMPS, D., DAMOND, F., YAZDANPANAH, Y., LEPARC-GOFFART, I. (2016). Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. *New England Journal of Medicine*, 374(22), 2195–2198.

DOWD, K.A., KO, S.Y., MORABITO, K.M., YANG, E.S., PELC, R.S., DeMASO, C.R., CASTILHO, L.R., ABBINK, P., BOYD, M., NITYANANDAM, R., et al. (2016). Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus. *Science*, *354*(6309), 237–240.

DUFFY, M.R., CHEN, T.H., HANCOCK, W.T., POWERS, A.M., KOOL, J.L., LANCIOTTI, R.S., PRETRICK, M., MARFEL, M., HOLZBAUER, S., DUBRAY, C., et al. (2009). Zika

Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, 360(24), 2536–2543.

ESPINOSA, D., MENDY, J., MANAYANI, D., VANG, L., WANG, C., RICHARD, T., GUENTHER, B., ARURI, J., AVANZINI, J., GARDUNO, F., et al. (2017). Passive Transfer of Immune Sera Induced by a Zika Virus-Like Particle Vaccine Protects AG129 Mice Against Lethal Zika Virus Challenge. *EBioMedicine*, 27, 61-70.

ESPÓSITO, D.L.A., NGUYEN, J.B., DeWITT, D.C., RHOADES, E., MODIS, Y. (2015). Physico-chemical requirements and kinetics of membrane fusion of flavivirus-like particles. *Journal of General Virology*, 96:1702-1711.

EVALUATE LTD. (2018). EvaluatePharma®: World Preview 2018, Outlook to 2024. Disponível em: <www.evaluate.com/PharmaWorldPreview2018>. Acesso em 18/11/2018

FONTANA, D., KRATJE, R., ETCHEVERRIGARAY, M., PRIETO, C. (2015). Immunogenic virus-like particles continuously expressed in mammalian cells as a veterinary rabies vaccine candidate. *Vaccine*, 33:4238-4246.

FRIETZE, K.M., PEABODY, D.S., CHACKERIAN, B. (2016). Engineering virus-like particles as vaccine platforms. *Current Opinion in Virology*, 18, 44–49.

FUENMAYOR, J., GÒDIA, F., CERVERA, L. (2017) Production of virus-like particles for vaccines. *New Biotechnology*, 39(Pt B):174-180.

FUENMAYOR, J., CERVERA, L., GÒDIA, F., KAMEN, A. (2018). Extended gene expression for Gag VLP production achieved at bioreactor scale. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*.

GAUDINSKI, M.R., HOUSER, K.V., MORABITO, K.M., HU, Z., YAMSHCHIKOV, G., ROTHWELL, R.S. et al. (2018). Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA vaccine candidates in healthy adults: randomised, open-label, phase 1 clinical trials. *The Lancet*, 391(10120), 552–562.

GENZEL, Y., VOGEL, T., BUCK, J., BEHRENDT, I., RAMIREZ, D.V., SCHIEDNER, G., JORDAN, I., REICHL, U. (2014). High cell density cultivations by alternating tangential flow (ATF) perfusion for influenza A virus production using suspension cells. *Vaccine*, 32:2770-2781.

GOUDAR, C.T., TITCHENER-HOOKER, N., KONSTANTINOV, K. (2015). Integrated continuous biomanufacturing: A new paradigm for biopharmaceutical production. *Journal of Biotechnology*, 213, 1-2.

GOVERNO DO BRASIL. (2017. Brasil é referência mundial em produção de vacinas. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/noticias/saude/2017/09/brasil-e-referencia-mundial-em-producao-de-vacinas>. Acesso em 15/03/2019

GUTIÉRREZ-GRANADOS, S., GÒDIA, F., CERVERA, L. (2018). Continuous manufacturing of viral particles. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 22:107–114.

HENRY, O., DORMOND, E., PERRIER, M., KAMEN, A. (2004). Insights into adenoviral vector production kinetics in acoustic filter-based perfusion cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 86:765-774.

HENRY, O., KWOK, E., PIRET, J.M. (2008). Simpler noninstrumented batch and semicontinuous cultures provide mammalian cell kinetic data comparable to continuous and perfusion cultures. *Biotechnology Progress*, 24, 921–931).

HEUKELBACH, J., ALENCAR, C.H., KELVIN, A.A., DE OLIVEIRA, W.K., CAVALCANTI, L.P.G. (2016). Zika virus outbreak in Brazil. *Journal of Infection in Developing Countries*, *10*(2), 116–120.

HILLS, S.L., RUSSELL, K., HENNESSEY, M., WILLIAMS, C., OSTER, A.M., FISCHER, M., MEAD, P. (2016). Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission — Continental United States, 2016. MMWR. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65(8), 215–216. Disponível em: <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6508e2>

JÄGER, V., BÜSSOW, K., SCHIRRMANN, T. Transient recombinant protein expression in mammalian cells. In: AL-RUBEAI, M. (eds). Animal Cell Culture. Cell Engineering, vol 9, p.27-64. Springer, Cham, 2014.

KAESTNER, L., SCHOLZ, A., LIPP, P. (2015). Conceptual and technical aspects of transfection and gene delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25, 1171–1176.

LAGES, J.C.L. (2015). Desenvolvimento de um processo de cultivo contínuo com reciclo celular para produção de um biofármaco lábil. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

LANCIOTTI, R.S., KOSOY, O.L., LAVEN, J.J., VELEZ, J.O., LAMBERT, A.J., JOHNSON, A.J., STANFIELD, S.M., DUFFY, M.R. (2008). Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, 14(8), 1232–1239.

LA VIGNE, P. (2016). Global Vaccine Market Surging to More Than $70 Billion by 2024. Disponível em: <https://thevaccinereaction.org/2016/11/global-vaccine-market-surging-to-more-than-70-billion-by-2024/> Acesso em 06/02/2019

LE, H., VISHWANATAN, N., JACOB, N.M., GADGIL, M., HU, W.S. (2015). Cell line development for biomanufacturing processes: recent advances and an outlook. *Biotechnology Letters*, v. 37, n. 8, p. 1553-1564.

LÉO, P., GALESI, A.L.L, SUAZO, C.A.T., MORAES, A.M. Células Animais: Conceitos Básicos. In: MORAES, A. M., AUGUSTO, E. F. P., CASTILHO, L. R. (Org.), Tecnologia do Cultivo de Células Animais - de Biofármacos a Terapia Gênica. Edição 1, Capítulo 2. São Paulo: Roca, 2008.

LESCH, H.P., HEIKKILA, K.M., LIPPONEN, E.M., VALONEN, P., MÜLLER, A., RÄSÄNEN, E., TUUNANEN, T., HASSINEN, M.M., PARKER, N., KARHINEN, M., SHAW, R., YLÄ-HERTTUALA, S. (2015). Process development of adenoviral vector production in fixed bed bioreactor: from bench to commercial scale. *Human Gene Therapy*, 26:560-571.

LIN, H.H., YIP, B.S., HUANG, L.M., WU, S.C. (2018). Zika virus structural biology and progress in vaccine development. *Biotechnology Advances*, 36, 47-53.

LUA, L.H.L., CONNORS, N.K., SAINSBURY, F., CHUAN, Y.P., WIBOWO, N., MIDDELBERG, A.P.J. (2014). Bioengineering Virus-Like Particles as Vaccines. *Biotechnology and Bioengineering*, 111, p. 425-440.

MANCEUR, A.P., KIM, H., MISIC, V., ANDREEV, N., DORION-THIBAUDEAU, J., LANTHIER, S., BERNIER, A., TREMBLAY, S., GÉLINS, A.M., BROUSSAU, S., GILBERT, R., ANSORGE, S. (2017). Scalable lentiviral vector production using stable HEK293SF producer cell lines. *Human Gene Therapy Methods*, 28(6):330-339.

McCARTHY, M. (2016). Zika virus was transmitted by sexual contact in Texas, health officials report. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 352:i720.

MODJARRAD, K., LIN, L., GEORGE, S.L., STEPHENSON, K.E., ECKELS, K.H., DE LA BARRERA, R.A. et al. (2017). Preliminary aggregate safety and immunogenicity results from three trials of a purified inactivated Zika virus vaccine candidate: phase 1, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trials. *The Lancet*, 391(10120), 563–571.

MORABITO, K.M., GRAHAM, B.S. (2017). Zika Virus Vaccine Development. *Journal of Infectious Diseases*, 216, S957–S963.

MORAES, A.M., MENDONÇA, R.Z., SUAZO, C.A.T. Meios de Cultura para Células Animais. In: MORAES, A.M., AUGUSTO, E.F.P., CASTILHO, L.R. (Org.), Tecnologia do Cultivo de Células Animais - de Biofármacos a Terapia Gênica. Edição 1, Capítulo 5. São Paulo: Roca, 2008.

MOSER, M., LEO, O. (2010). Key concepts in immunology. *Vaccine*, 28, C2–C13.

NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES. (2012). Vaccine Types. Disponível em: <https://www.niaid.nih.gov/research/vaccine-types>. Acesso em 13/02/2019

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. (2019). Clinical trial registry. Disponível em: < https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=zika&term=&cntry=&state=&city=&dist=>. Acesso em 15/03/2019

NIKOLAY, A., LÉON, A., SCHWAMBORN, K., GENZEL, Y., REICHL, U. (2018a). Process intensification of EB66® cell cultivations leads to high-yield yellow fever and Zika virus production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(20), 8725–8737.

NIKOLAY, A., CASTILHO, L.R., REICHL, U., GENZEL, Y. (2018b). Propagation of Brazilian Zika virus strains in static and suspension cultures using Vero and BHK cells. *Vaccine*, *36*(22), 3140–3145.

OEHLER, E., WATRIN, L., LARRE, P., LEPARC-GOFFART, I., LASTÈRE, S., VALOUR, F., BAUDOIN, L., MALLET, H.P., MUSSO, D., GHAWCHE, F. (2014). Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome - case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance*, 19(9).

OKUMURA, T., MASUDA, K., WATANABE, K., MIYADAI, K., NONAKA, K., YABUTA, M., OMASA, T. (2015). Efficient enrichment of high-producing recombinant Chinese hamster ovary cells for monoclonal antibody by flow cytometry. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *120*(3), 340–346.

OZ BIOSCIENCES. (2019). Lipofection. Disponível em: <https://www.ozbiosciences.com/content/14-Lipofection-liposomal-transfection-delivery-system>. Acesso em 02/03/2019

OZTURK, S. Cell Culture Technology – An Overview. In: OZTURK, S., HU, W. (Eds.). Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies. Edição 1, Capítulo 1. Estados Unidos: CRC Press, 2005.

PAUL, D., BARTENSCHLAGER, R. (2013).Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World Journal of Virology*, 2(2), 32.

PIERSON, T.C., FREMONT, D.H., KUHN, R.J., DIAMOND, M.S. (2008). Structural Insights into the Mechanisms of Antibody-Mediated Neutralization of Flavivirus Infection: Implications for Vaccine Development. *Cell Host and Microbe*, 4, 229–238.

PIJLMAN, G.P. (2015). Enveloped virus-like particles as vaccines against pathogenic arboviruses. *Biotechnology Journal*, 10, 659–670.

PLOTKIN, S. (2014). History of vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(34), 12283–12287.

PLOTKIN, S., ROBINSON, J.M., CUNNINGHAM, G., IQBAL, R., LARSEN, S. (2017). The complexity and cost of vaccine manufacturing – An overview. *Vaccine*, 35, 4064–4071.

PRIOLA, J.J., CALZADILLA, N., BAUMANN, M., BORTH, N., TATE, C.G., BETENBAUGH, M.J. (2016). High-throughput screening and selection of mammalian cells for enhanced protein production. *Biotechnology Journal*, 11, 853-865.

PURDY, D.E., CHANG, G.J.J. (2005). Secretion of noninfectious dengue virus-like particles and identification of amino acids in the stem region involved in intracellular retention of envelope protein. *Virology*, 333(2), 239–250.

RIEDEL, S. (2005). Edward Jenner and the History of Smallpox and Vaccination. Baylor *University Medical Center Proceedings*, 18(1), 21–25.

ROLDÃO, A., MELLADO, M.C., CASTILHO, L.R., CARRONDO, M.J.T., ALVES, P.M. (2010). Virus-like particles in vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 9(10), 1149–1176.

SHEN, A.Y., GOOR, J.V., ZHENG, L., REYES, A.E., KRUMMEN, L.A. Recombinant DNA Technology and Cell Line Development. In: OZTURK, S., HU, W. (Org.). Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies. Edição 1, Capítulo 2. Estados Unidos: CRC Press, 2005.

SONG, M., RAPHAELLI, K., JONES, M.L., ALIABADI-ZADEH, K., LEUNG, K.M., CROWLEY, D., HUGHES, B., MAHLER, S., GRAY, P.P., HUANG, E.P., et al. (2011). Clonal selection of high producing, stably transfected HEK293 cell lines utilizing modified, high-throughput FACS screening. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *86*(7), 935–941.

STEWART, A.J., DEVLIN, P.M. (2006). The history of the smallpox vaccine. *Journal of Infection*, 52(5), 329–334.

TAPIA, F., VOGEL, T., GENZEL, Y., BEHRENDT, I., HIRSCHEL, M., GANGEMI, J.D, REICHL, U. (2014). Production of high-titer human influenza A virus with adherent and suspension MDCK cells cultured in a single-use hollow fiber bioreactor. *Vaccine*, 32:1003-1011.

TEIXEIRA-ROCHA, E.S., CARMO, E,H., TAVARES-NETO, J. (2005). Ocorrência de poliomielite associada à vacina no Brasil, 1995 a 2001. *Rev Panam Salud Publica*, 18(1):21–4.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES. (2017). Types of Vaccines. Disponível em: < https://www.vaccines.gov/basics/types/index.html>. Acesso em 13/02/2019

VENEREO-SANCHEZ, A., SIMONEAU, M., LANTHIER, S., CHAHAL, P., BOURGET, L., ANSORGE, S., GILBERT, R., HENRY, O., KAMEN, A. (2017). Process intensification for

high yield production of influenza H1N1 Gag virus-like particles using an inducible HEK-293 stable cell line. *Vaccine*, 35(33), 4220–4228.

VIRALZONE – SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS. (2016) .Zika virus. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/6756?outline=all_by_protein>. Acesso em 13/02/2019

VOISARD, D., MEUWLY, F., RUFFIEUX, P.A., BAER, G., KADOURI, A. (2003). Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(7), 751-765.

WALSH, G. (2018) Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature Biotechnology*, vol 36, 1136–1145.

WANG, S., GODFREY, S., RAVIKRISHNAN, J., LIN, H., VOGEL, J., & COFFMAN, J. (2017). Shear contributions to cell culture performance and product recovery in ATF and TFF perfusion systems. *Journal of Biotechnology*, 246, 52–60.

WARNOCK, J.N., AL-RUBEAI, M. (2006). Bioreactor systems for the production of biopharmaceuticals from animal cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 45(1), 1.

WILDER-SMITH, A., VANNICE, K., DURBIN, A., HOMBACH, J., THOMAS, S.J., THEVARJAN, I., SIMMONS, C.P. (2018). Zika vaccines and therapeutics: Landscape analysis and challenges ahead. *BMC Medicine*, *16*(1).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2016a) WHO Zika virus and complications: 2016 Public Health Emergency of International Concern. Disponível em: <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/en/>. Acesso em 10/11/2018

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2016b) WHO and experts prioritize vaccines, diagnostics and innovative vector control tools for Zika R&D. Disponível em: < https://www.who.int/en/news-room/detail/09-03-2016-who-and-experts-prioritize-vaccines-diagnostics-and-innovative-vector-control-tools-for-zika-r-d>. Acesso em 14/02/2019

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2017) Situation report. Zika virus microcephaly Guillain-Barré syndrome. Disponível em: <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/10-march-2017/en/>. Acesso em 10/11/2018

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2018). Zika Virus. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>. Acesso em 13/02/2019

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2019a) .Immunization, Vaccines and Biologicals: Vaccines and Diseases. Disponível em: <https://www.who.int/immunization/diseases/en/>. Acesso em 06/02/2019

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2019b) Vaccines. Disponível em: <https://www.who.int/topics/vaccines/en/>. Acesso em 11/02/2019

WURM, F. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22(11): 1393-1398.

YAO, T., ASAYAMA, Y. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive Medicine and Biology*, 16(2): 99-117.

ZAGARI, F., JORDAN, M., STETTLER, M., BROLY, H., WURM, F. M. (2013). Lactate metabolism shift in CHO cell culture: The role of mitochondrial oxidative activity. *New Biotechnology*, 30(2), 238–245.

ZELTINS, A. (2013) Construction and Characterization of Virus-Like Particles: A Review. *Molecular Biotechnology*, 53, 92–107.

ANEXO A: Artigo submetido à revista Vaccine

Zika virus-like particles (VLPs): stable cell lines and continuous perfusion processes as a new potential vaccine manufacturing platform

Renata G. F. Alvim[1,2], Ivaldo Itabaiana Jr.[2] and Leda R. Castilho[1*]

[1]Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), COPPE, Cell Culture Engineering Lab, Cx. Postal 68502, 21941-972, Rio de Janeiro/RJ, Brazil.

[2]Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), School of Chemistry (EQ), Department of Biochemical Engineering, 21941-909, Rio de Janeiro/RJ, Brazil.

***Corresponding author:** leda@peq.coppe.ufrj.br

Keywords: virus-like particles (VLPs), Zika virus, HEK293 cells, stable expression, perfusion, upstream process.

Abstract

Zika virus (ZIKV) was first detected in Brazil in 2015 and then rapidly spread to more than 80 countries in Africa, Asia and the Americas. ZIKV infection was correlated with severe congenital malformations in newborns from infected mothers, as well as Guillain-Barré syndrome in adults. Although the number of infected people has declined in the affected countries lately, the development of a vaccine for ZIKV is of great importance to avoid the future resurgence of the virus in endemic areas or the future spread to currently non-endemic regions. Among many different platforms currently under study, virus-like particles (VLPs) are a promising alternative to the development of vaccines, since tridimensional particles mimicking the virus – but lacking its genome – can be produced and present the antigen in a repetitive way, potentially eliciting robust immune responses. In this work, we demonstrated the generation of stably transfected HEK293 cells constitutively expressing Zika VLPs. Our results show that the use of a stirred-tank perfusion bioreactor using XCell™ ATF-2 as a cell retention device represents a feasible system for the production of Zika VLPs. Small-scale shake flask studies using a cell pool enriched by FACS-aided sorting showed that daily medium exchange enhances significantly the viable cell density and VLP production (~4-fold) over batch cultures. Further enhancements were achieved by carrying out ATF-based continuous perfusion in a controlled bioreactor – in spite of continuous dilution of the bioreactor, maximum titer was higher than in small-scale.

1. Introduction

Zika virus belongs to the *Flaviviridae* family, genus *Flavivirus*. It was first isolated from *Rhesus* monkeys in Uganda, Africa, in the 1940's [1]. A first major outbreak was reported in 2007 in Yap Island, Micronesia, although some human infections have been reported before [2,3]. In 2013, a large outbreak occurred in French Polynesia and evidence was gathered, suggesting that ZIKV could cause Guillain-Barré syndrome in infected adults [4,5]. In 2015, a much larger outbreak started in Brazil and it was proven that the infection caused by the virus in pregnant women can lead to serious congenital malformations [6,7]. Thus, due to the serious impacts that ZIKV infection could potentially generate, the WHO (World Health Organization) declared it in February 2016 as a Public Health Emergency of International Concern [8]. Nowadays, there is evidence of transmission of vector-borne ZIKV in 84 countries, territories or subnational areas and more than 50 ZIKV vaccine candidates are being studied [9,10,11].

Virus-like particles are three-dimensional structures, constituted by recombinant structural proteins of the virus, lacking the viral genome and displaying a repetitive surface pattern that is able to trigger immunogenicity [12,13,14]. Two different works have shown that immunization of mice with different Zika VLPs constructs led to efficient induction of neutralizing antibodies, revealing the potential of VLPs as a vaccine candidate [15,16].

The structural proteins prM (premembrane) and E (envelope) were chosen to express our Zika VLP candidate, since it has been shown for flaviviruses that these proteins are enough for the self-assembly of the VLPs *in vitro* [17] and that epitopes recognized by protective neutralizing antibodies are mainly within protein E [18].

Thus, the possibility of developing stable cell lines producing VLPs represents a platform that could potentially enable the manufacturing of an affordable vaccine, overcoming the high costs of DNA and transfection reagents related to the production of recombinant proteins and VLPs in large scale by transient transfection. Moreover, stable expression enables

the use of continuous perfusion processes, which can be operated at high cell densities and at steady state, providing a stable and optimal environment for the cells and, thus, allowing improvements in process productivity, reducing costs and ensuring high product quality [19,20,21].

2. Materials and methods

2.1. Cell line development and culture conditions

Based on the genome sequence of a ZIKV strain isolated in Brazil (strain BeH819966, GenBank #KU365779), different prM-E gene constructs, flanked by different signal peptides and containing wild-type, mutated or chimeric sequence variants of the E (envelope) protein were designed (Figure 1). These constructs were cloned into the pCIneo vector (Promega, USA), which contains a CMV promoter to drive transgene integration and a neomycin resistance cassette to enable selection of stable transfectants, and transfected into the suspension-adapted HEK293SF-3F6 cell line (NRC, Canada). Transfection was performed in 24-deep well plates (Porvair Sciences, UK, or Thomson Instrument Company, USA) at a density of 1×10^6 cells/mL, using 0.5 µg/mL of plasmid and 1.5 µL/mL of the transfection reagent TransIT®-2020 (Mirus Bio, USA), in HEK TF medium (Xell AG, Germany). Approximately 48h post-transfection, cells were diluted in fresh HEK TF medium to the final concentration of 1×10^6 cells/mL, and 100 µg/mL of G418 sulfate (Gibco, USA) was added to promote selection of stably transfected cells. Cell pools were diluted twice a week during 6 weeks under the presence of the selection pressure (G418 sulfate). Supernatant samples were taken periodically to confirm VLP production by immunoblot assay. During the whole process of cell line development and maintenance, cells were cultivated in HEK TF medium in shake flasks (Corning, USA), spin tubes with vented caps (TPP AG, Switzerland) or 24-deep well plates, shaken at 180 rpm (25 or 50 mm orbit size). Flasks were kept in a humidified incubator

at 37°C and 5 % CO_2. Cell count was performed using a Vi-CELL XR cell counter (Beckman Coulter, USA) or a Neubauer chamber, both based on the trypan blue exclusion method. When necessary, glucose and lactate concentrations were measured using a YSI 2700 Select Biochemistry Analyzer (YSI Inc., USA).

2.2. Analysis of VLP production

The analysis of VLP production was performed by immunoblot technique based on the application of 3-µL samples of centrifuged supernatant (200*g*, 5 minutes, room temperature) onto a nitrocellulose membrane (Vita Scientific, USA). The monoclonal antibody 4G2 (MAB10216, Merck, USA), which is able to recognize the conserved fusion loop of the E protein of flaviviruses, was used as a primary antibody (1:8,000), followed by incubation with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated donkey anti-mouse antibody (1:10,000) (A16011, Invitrogen, USA). Binding of antibody to the E protein of the VLPs was visualized via chemiluminescence with ECL™ Prime detection reagent (GE Healthcare, USA). Dengue envelope protein (Prospec, Israel) was used as a positive control in different concentrations, allowing the quantitation of E proteins forming the VLPs using ImageJ densitometry analysis software (National Institutes of Health, USA).

2.3. Enrichment of stable cell pools producing Zika VLPs

In order to enrich cell pools for high-producer subpopulations, approximately 200×10^6 viable cells were stained with 4G2 antibody biotinylated *in house* using EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin kit (Thermo Scientific, USA) and streptavidin-PE (Invitrogen, USA). After incubation with biotinylated 4G2 for 20 minutes on ice bath, cells were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) containing 2% (m/v) of bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, USA). Cells were then stained with streptavidin-PE for 15 minutes on ice bath. Stained cells

showing higher fluorescence signal were collected by FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting) and transferred to 24-deep well plates to a final concentration of 0.5×10^6 cells/mL in 0.3 mL HEK TF medium. Penicillin/streptomycin was added to the medium during the sorting procedure and for 2 passages thereafter to prevent microbial cell growth. Cell banks of the enriched cell pools were prepared and kinetic studies to investigate cell growth and VLP production were performed. Non-stained cells were used as negative control in the FACS runs, and non-sorted cells were used in immunoblots for comparison with the enriched (sorted) cell pools.

2.4. Kinetic studies in shake flasks

Batch and pseudoperfusion (PP) studies were performed to assess cell behavior in spin tubes, using 15 mL as initial working volume. Cells were inoculated at 0.5×10^6 cells/mL in HEK TF medium and samples were taken daily to evaluate cell growth, viability, glucose consumption, lactate concentration and also to determine VLP production over time. All experiments were performed in biological duplicates. In the case of pseudoperfusion, two different feeding strategies were applied, both starting feeding on day 4, when the volume of the spin tubes was adjusted to 10 mL. From day 4 on, cell suspension was centrifuged daily (200*g*, 5 minutes, room temperature), to promote cell retention, and then medium was exchanged. In the first pseudoperfusion strategy, a stepwise feeding was performed based on cell demand for glucose: 0.5 vvd (volume of fresh medium per volume of culture per day) when glucose concentration upon sampling was higher than 2 g/L; 0.75 vvd if between 1 and 2 g/L; and 1 vvd when lower than 1 g/L. The second pseudoperfusion strategy was based on constant medium exchange rate of 1 vvd from day 4 on.

2.5. Perfusion run in stirred-tank bioreactor

A perfusion cultivation was carried out in a stirred-tank bioreactor (ez-Control, Applikon Biotechnology, The Netherlands) fitted with a pitched-blade impeller and using an alternating tangential flow filtration system (XCell™ ATF-2, Repligen, USA) as cell retention device. The microfiltration polyethersulfone hollow fiber module for ATF2 system had pore size of 0.2 µm, 1.0 mm of lumen and 0.13 m² of surface area (Repligen, USA). The lab-scale bioreactor was inoculated with 0.5×10^6 cells/mL and cultivation was performed at 37°C, pH 7.1 and a dissolved oxygen (dO_2) set point of 40% of the air saturation. Automatic control of dO_2 was performed by injection of air in the beginning of the run until cell concentration reached $2\text{-}3 \times 10^6$ cells/mL, and then injecting pure oxygen through a drilled hole sparger, both at a maximum rate of 0.25 L/min. Stirring speed was maintained between 200 and 300 rpm, with a working volume of 0.9–1.1 L.

Perfusion started on day 3 with a medium exchange rate of 0.35 vvd and was gradually increased up to 1.5 vvd, in order to keep glucose concentration at approximately 1 g/L during the steady state. Controlled removal of cells (cell bleed) was initiated on day 7 to maintain cell concentration at approximately $25\text{-}30 \times 10^6$ cells/mL.

3. Results and Discussion

3.1. Design of different gene constructs and development of stable cell lines

With the final aim of obtaining stable cell lines constitutively expressing and secreting Zika VLPs, different gene constructs containing the sequences of the structural proteins premembrane (prM) and envelope (E) were designed (Figure 1). Construct design was partly based on reports in literature showing that chimeric sequences, obtained by replacement of the stem and transmembrane domains of the E protein of flaviviruses (20% of the C-terminal end of E) by the corresponding sequence of the Japanese encephalitis virus (JEV), or by alterations just in the stem region of E, led to more efficient secretion of flavivirus VLPs [25,26].

Additionally, the use of the JEV signal peptide had shown to increase secretion of prM and E of flaviviruses [25,26], so we decided to compare the JEV and ZIKV wild-type signal peptides to different signal peptides designed in our group (named SP3-SP10). Furthermore, in one of the constructs, two aminoacids were mutated in the flavivirus conserved fusion loop region of the E protein to avoid cross-recognition.

(Figure 1)

Mammalian cell lines known for good recombinant protein expression and/or virus production (CHO-K1, HEK293, Vero and BHK-21) were transfected with the different constructs, but the highest transient expression level was observed in HEK293 cells, so only data for this cell line are shown. This result was not surprising, since HEK293 cells are well established as a robust bioprocess platform for the production of viruses, virus vectors and virus-like particles. Interestingly, HEK293 cells have been used to produce HIV, rabies and influenza VLPs in continuous perfusion mode, coupling the bioreactor to different cell retention devices, such as acoustic filters and spin filters [22,23,24]. As an additional point regarding HEK293 cells, since Zika VLPs are enveloped and the cell membrane of the host cell line is used during assembly and budding of the VLPs, the use of a human cell line might be an advantage for this purpose.

Initially, four different constructs (lecc1-lecc4) bearing chimeric E sequences were used to evaluate VLP production by transient expression in the suspension-adapted HEK293-3F6 cell line. Only the supernatants were analyzed, because our aim was to maximize secreted VLP production, which can be continuously harvested in the setting of a continuous perfusion process. In this first part of the study, it was observed that lecc1-lecc3 presented similar transient expression level at 48 hours post-transfection (hpt), and that no VLPs were detected in the supernatant of cells transfected with lecc4. Lecc3 and lecc4 differ in that in lecc4 the E

sequence was altered only in the stem region, and not in both the stem and transmembrane domains as in lecc3 (Figure 2A).

Based on this result and on the fact that the use of the JEV signal peptide and of the JEV C-terminal portion of E (used in constructs lecc1 and lecc2) had been patented by Chang [27], construct lecc3 was chosen for further studies designed to enable a comparison of chimeric to wild-type and fusion-loop mutated E sequences, as well as of wild-type ZIKV signal peptide to other different signal peptides designed in our research group (lecc5-10, leccmut). The results of transient expression (48 h p.t.) of VLPs in the supernatants is shown in Figure 2B. Constructs lecc7-10 showed higher VLP secretion levels in comparison to constructs 3, 5 and 6. This means that among the signal peptides designed at our lab, all but one (SP3 in lecc3 and lecc6 constructs) enabled higher secreted VLP concentrations than the ZIKV wild type signal peptide in construct lecc5.

Approximately 48h post-transfection with constructs lecc3, lecc5-10 and leccmut, G418 sulfate was added to the cultures to select cells stably expressing the VLPs. After 6 weeks under selection pressure, mock transfected cells had died, and transfected cell pools had viability in the range of 84-96% and were considered stable. VLP monitoring in the supernatants of transfected cell pools along 6 weeks post-transfection (wpt) confirmed continued VLP production in all of them (Figure 2C). The levels of secreted VLPs varied between the different stable cell pools as observed for the transient expression samples, reflecting the performance of the different signal peptides used in the gene constructs. Also, except for the samples withdrawn 1 wpt, when cells were undergoing the crisis post-transfection and had very low cell density and very low viability, variations in detected signal over time for a given cell pool were minor, reflecting oscillations in viable cell density and viability during the selection process.

It is generally believed for flaviviruses that constitutive expression of VLPs would be toxic to the host cells, so usually transient or inducible expression methods are used to obtain

flavivirus VLPs [28]. However, except for a relatively short period approximately 1 wpt, our data show that cells presented high viability along the 6-week selection phase and thereafter, indicating that constitutive expression of Zika VLPs was not deleterious to the cells and disclosing the potential use of this rationale to enable the development of a continuous process for flavivirus VLP production. Among the few works found in literature using continuous perfusion cultivation of mammalian cells for the production of VLPs [22,23,24], none of them is related to flaviviruses, and just one of them [23] focuses on constitutive expression of the VLPs. However, differently from the present work, which uses a plasmid expression vector, their recombinant cell line was obtained by lentivirus-based transduction of HEK293 cells to express rabies VLPs. In the other two works from literature adopting perfusion processes for VLP production, either repeated transient expression [22] or inducible stable expression [24] is used. In order to develop an affordable high-cell density perfusion platform, a constitutive stable expression might have lower costs and be advantageous when compared to inducible or transient expression systems.

(Figure 2)

Since the aim of this study was to produce VLPs in stirred-tank bioreactors, small-scale evaluation of the cell pools 6 weeks post-transfection was first performed in batch mode using spin tubes shaken at 180 rpm. In general, cell growth and metabolic behavior were similar among the different cell pools. Maximum cell concentration obtained in the cultures maintained in the animal-component free medium used for both transfection and cell maintenance was 8-10 × 10^6 cells/mL (Figure 3). The high cell densities, along with high cell viabilities, confirmed that the stable constitutive expression of Zika VLPs was not deleterious to the cells.

(Figure 3)

3.2. Evaluation of cell stability and FACS-aided enrichment of cell pools

In order to evaluate stability of VLP expression, supernatant samples were taken over time and evaluated by immunoblot for lecc3 (Figure 4A) and lecc9 (Figure 4C). Lecc3 pools showed similar VLP production when samples from 6 wpt and 21 wpt were evaluated. Part of the cell pool had been maintained in the absence of G418 from 16 wpt on, and immunoblot analysis did not indicate any differences (Figure 4A), confirming stability of expression even 5 weeks in the absence of selection pressure. The cells at 21 wpt (with and without G418) were additionally submitted to FACS-aided enrichment of high-producers, and expression in both sorted cell populations (with and without G418) were equivalent. In the case of lecc9, VLP expression was monitored weekly from 7 wpt to 14 wpt, with no indications of expression loss. Part of the cell pool had been maintained in the absence of G418 from 11 wpt on (dashed rectangle in Figure 4C), and immunoblot analysis did not indicate any differences.

Besides stability evaluation, selection of high-producer cells was desired. For HEK293 cells, there is a lack of an effective amplifiable expression system, such as CHO-DHFR$^-$ and CHO-GS systems. Therefore, it was important to pursue other strategies to obtain cells with increased productivity, such as the use of FACS to select high producer cells [29]. Since it has been observed in non-human primates that chimeric and wild-type versions of E contained in prM-E constructs can elicit the generation of antibodies with different neutralizing profile and different protective capacity [30], lecc3 cell pool bearing a chimeric E sequence and lecc9 cell pool bearing a wild-type E sequence were chosen for further studies and were used in FACS experiments for pool enrichment. Lecc3 and lecc9 cell pools were sorted 21 wpt and 6 wpt, respectively. For these two constructs, other members of our group purified VLPs and obtained transmission electron microscopy images that confirmed the expected size and structure of the VLPs (data not shown).

Based on the hypothesis that secreted products may be transiently found on the cell membrane [31,32], cells were stained with a fluorescent marker in order to sort for high-producer cells using preparative flow cytometry. Sorting of a heterogeneous cell pool that survived selection (thus expressing the antibiotic resistance gene and considered stable), only 0.3%-0.8% of the cells presented fluorescence intensity clearly higher than the negative control (non-stained cells) and were gated. From this gate, 150,000-200,000 cells were collected into tubes before transferring the cell suspension to 24-deep well plates. Cells were expanded under orbital shaking, and supernatant samples were taken to compare VLP production before and after cell FACS enrichment. Improved production after sorting was confirmed by immunoblot both for lecc3 and lecc9 cell pools (Figures 4A and 4B). Based on the immunoblot results, lecc3 cell pool was selected for further studies to develop the perfusion process.

(Figure 4)

3.3. Use of stable pools to develop continuous perfusion studies: small-scale evaluation

In order to evaluate the effect of feeding strategies on the behavior of FACS-enriched lecc3 cell pool, pseudoperfusion was used as a scale-down model for high cell density cultivations [33]. Experiments in spin tubes were carried out testing a stepwise daily feeding strategy, based on the cell demand for glucose, and a constant feeding strategy based on 100% daily medium exchange, both starting feeding on day 4. As observed in Figure 5A, cell growth was substantially increased when cells were fed daily compared to batch mode. There was no significant difference in the behavior of cells fed according to the two different strategies, especially because differences in the amount of medium fed ended by being restricted to days 4 to 7, when glucose concentration was not limiting (>1 g/L) (Figure 5B). Therefore, the stepwise strategy based on cell demand was chosen to be applied in the subsequent perfusion bioreactor experiment.

Regarding VLP production (Figure 5C), cells grown under both feeding strategies had a better performance than those grown in batch mode, reaching a VLP concentration approximately 4-fold higher than the batch control. These results indicate that an intermittent perfusion process (pseudoperfusion) allows improvements in both cell concentration and production. Thus, a truly continuous perfusion system could be even more advantageous and provide high volumetric productivities, contributing to an affordable production of the VLP vaccine candidate.

(Figure 5)

3.4. Perfusion run using XCell-ATF2 as cell retention device

The initial evaluation of stirred-tank bioreactors to produce Zika VLPs involved the use of the ATF-2 system, which promotes cell retention by alternating tangential filtration, allowing complete retention of the cells and ideally no retention of the product in the bioreactor. Although no reports in literature have been found regarding the use of ATF for VLPs, an ATF-based perfusion system has been reported by Nikolay *et al*. [34] as efficient for the production of native Zika virus from infected BHK-21 cells.

The ATF system was started on day 2, one day before the beginning of perfusion itself, to check if there would be any negative effects on cell viability and growth. No negative effects on enriched HEK293-lecc3 cell pool behavior in the bioreactor were observed, indicating that the shear stress levels in the ATF cartridge are not deleterious and might even help decreasing HEK293 cell aggregation. However, although Zika VLPs are approximately 50 nm in size and the pore size of the ATF-2 cartridge used was 0.22 µm, and in spite of the successful report for whole Zika virus [34], we observed a retention of approximately 60% of the VLPs inside the bioreactor, resulting in poor VLP transmission to the harvest. Maximum VLP concentration

inside the bioreactor was approximately 130 µg/mL, as compared to approximately 55 µg/mL in the harvest.

Regarding cell growth, due to the high oxygen demand of HEK293 cells and in order to avoid oxygen limitations, we decided to start cell bleed when viable cell concentration reached approximately 25×10^6 cells/mL (Figure 6A). A steady state at $25\text{-}30 \times 10^6$ cells/mL was kept from day 7 on, and perfusion rate was recalculated daily according to cell demand, in order to maintain glucose level around 1 g/L (Figure 6B). The stepwise feeding strategy was successful, since it decreases medium usage in the beginning of perfusion, as compared with a constant feeding strategy of 1 vvd, as tested in the small-scale pseudoperfusion studies. Lower medium usage represents in turn lower medium costs and reduced labor related to medium preparation.

As shown for VLPs of other viruses [22,23,24] and for other biopharmaceutical products [35,36], perfusion processes enable higher productivities than batch and fed-batch processes. Our present results confirm that perfusion technology using stably transfected cells constitutively expressing Zika VLPs is highly promising as a vaccine manufacturing platform. Moreover, the strategy developed in this work can be easily applied for the production of our other Zika VLP constructs, as well as for the production of VLPs of other flaviviruses circulating in the Americas that we have been expressing at our lab, such as Yellow Fever, Dengue 1-4, Saint-Louis encephalitis, Ilheus, Cacipacore and West-Nile viruses.

(Figure 6)

4. Conclusions

VLPs are a promising vaccine platform for flavivirus vaccines due to safety and repetitive presentation of the antigen. Furthermore, VLPs represent the possibility of incorporating mutations to have customized molecular features, which is very interesting in the case of flaviviruses, in order to decrease cross-reactivity and the risk of antibody-dependent enhancement (ADE) of infection, which affect diagnostics and vaccine development.

Stable cell lines and perfusion processes, as proposed in the present work, bring thus promising prospects for the development of large-scale, cost-effective technologies for production of vaccines for ZIKV and other flaviviruses.

5. Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

6. Acknowledgments

The authors wish to acknowledge financial support from the Brazilian funding agencies CNPq, CAPES and FAPERJ; financial support granted by JLabs and Janssen Brazil in the context of the “Latin-America Quick Fire Challenge 2016”; reagents and media donated by GE Healthcare, Xell AG and Merck Millipore; and the HEK293-3F6 cell line provided by NRC Canada. The authors also thank T. Brunswick and T. Gonçalves (CENABIO, Federal University of Rio de Janeiro) for technical help during cell sorting experiments, and B. S. Graham (Vaccine Research Center, NIH) for sharing analytical reagents.

All authors attest they meet the ICMJE criteria for authorship.

7. References

[1] Dick, G., Kitchen, S. F., and Haddow, A. J. (1952). Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *46*(5), 509–520. https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4

[2] Lanciotti, R. S., Kosoy, O. L., Laven, J. J., Velez, J. O., Lambert, A. J., Johnson, A. J., Stanfield, S. M., and Duffy, M. R. (2008). Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, *14*(8), 1232–1239. https://doi.org/10.3201/eid1408.080287

[3] Duffy, M. R., Chen, T. H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., *et al*. (2009). Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, *360*(24), 2536–2543. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715

[4] Oehler, E., Watrin, L., Larre, P., Leparc-Goffart, I., Lastère, S., Valour, F., Baudouin, L., Mallet, H. P., Musso, D., and Ghawche, F. (2014). Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome - case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance*, *19*(9). https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20720

[5] Cao-Lormeau, V. M., Blake, A., Mons, S., Lastère, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., Dub, T., Baudouin, L., Teissier, A., Larre, P., *et al*. (2016). Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. *The Lancet*, *387*(10027), 1531–1539. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00562-6

[6] Heukelbach, J., Alencar, C. H., Kelvin, A. A., de Oliveira, W. K., and de Góes Cavalcanti, L. P. (2016). Zika virus outbreak in Brazil. *Journal of Infection in Developing Countries*, *10*(2), 116–120. https://doi.org/10.3855/jidc.8217

[7] Calvet, G., Aguiar, R. S., Melo, A. S. O., Sampaio, S. A., de Filippis, I., Fabri, A., Araujo, E. S. M., de Sequeira, P. C., de Mendonça, M. C. L., de Oliveira, L., *et al*. (2016). Detection

and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious Diseases*, *16*(6), 653–660. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00095-5

[8] World Health Organization. WHO Zika virus and complications: 2016 Public Health Emergency of International Concern. http://www.who.int/emergencies/zika-virus/en/. Accessed November 2018

[9] World Health Organization. Situation report. Zika virus microcephaly Guillain-Barré syndrome (10 March 2017). http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/10-march-2017/en/ Accessed November 2018

[10] Wilder-Smith, A., Vannice, K., Durbin, A., Hombach, J., Thomas, S. J., Thevarjan, I., and Simmons, C. P. (2018). Zika vaccines and therapeutics: Landscape analysis and challenges ahead. *BMC Medicine*, *16*(1). https://doi.org/10.1186/s12916-018-1067-x

[11] Lin, H. H., Yip, B. S., Huang, L. M., and Wu, S. C. (2018). Zika virus structural biology and progress in vaccine development. *Biotechnology Advances*, 36, 47-53. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.004

[12] Roldão, A., Mellado, M. C., Castilho, L. R., Carrondo, M. J. T. and Alves, P. M. (2010). Virus-like particles in vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, *9*(10), 1149–1176. https://doi.org/10.1586/erv.10.115

[13] Fuenmayor J., Gòdia F. and Cervera L. (2017) Production of virus-like particles for vaccines. *New Biotechnology*, *39*(Pt B):174-180. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.010

[14] Chackerian, B. (2007). Virus-like particles: Flexible platforms for vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, *6*(3), 381-390. https://doi.org/10.1586/14760584.6.3.381

[15] Boigard, H., Alimova, A., Martin, G. R., Katz, A., Gottlieb, P., and Galarza, J. M. (2017). Zika virus-like particle (VLP) based vaccine. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(5): e0005608. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005608

[16] Espinosa, D., Mendy, J., Manayani, D., Vang, L., Wang, C., Richard, T., Guenther, B., Aruri, J., Avanzini, J., Garduno, F., *et al*. (2017). Passive Transfer of Immune Sera Induced by a Zika Virus-Like Particle Vaccine Protects AG129 Mice Against Lethal Zika Virus Challenge. *EBioMedicine*, *27*, 61-70. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.12.010

[17] Pijlman, G. P. (2015). Enveloped virus-like particles as vaccines against pathogenic arboviruses. *Biotechnology Journal*, *10*, 659–670. https://doi.org/10.1002/biot.201400427

[18] Pierson, T. C., Fremont, D. H., Kuhn, R. J. and Diamond, M. S. (2008). Structural Insights into the Mechanisms of Antibody-Mediated Neutralization of Flavivirus Infection: Implications for Vaccine Development. *Cell Host and Microbe*, *4*, 229–238. https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.08.004.

[19] Goudar, C.T., Titchener-Hooker, N. and Konstantinov, K. (2015). Integrated continuous biomanufacturing: A new paradigm for biopharmaceutical production. *Journal of Biotechnology*, *213*, 1-2. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.08.015.

[20] Castilho, L. R. (2015). Continuous Animal Cell Perfusion Processes: The First Step Toward Integrated Continuous Biomanufacturing. In *Continuous Processing in Pharmaceutical Manufacturing* (pp. 115–154). Wiley Blackwell. https://doi.org/10.1002/9783527673681.ch06

[21] Gutiérrez-Granados, S., Gòdia, F. and Cervera, L. (2018). Continuous manufacturing of viral particles. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 22:107–114. https://doi.org/10.1016/j.coche.2018.09.009

[22] Fuenmayor, J., Cervera, L., Gòdia, F. and Kamen, A. (2018). Extended gene expression for Gag VLP production achieved at bioreactor scale. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. http://dx.doi.org/10.1002/jctb.5777.

[23] Fontana, D., Kratje, R., Etcheverrigaray, M., and Prieto, C. (2015). Immunogenic virus-like particles continuously expressed in mammalian cells as a veterinary rabies vaccine candidate. *Vaccine*, 33:4238-4246. http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.088.

[24] Venereo-Sanchez, A., Simoneau, M., Lanthier, S., Chahal, P., Bourget, L., Ansorge, S., Gilbert, R., Henry, O., and Kamen, A. (2017). Process intensification for high yield production of influenza H1N1 Gag virus-like particles using an inducible HEK-293 stable cell line. *Vaccine*, *35*(33), 4220–4228. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.06.024.

[25] Chang, G. J. J., Hunt, A. R., Holmes, D. A., Springfield, T., Chiueh, T. S., Roehrig, J. T., and Gubler, D. J. (2003). Enhancing biosynthesis and secretion of premembrane and envelope proteins by the chimeric plasmid of dengue virus type 2 and Japanese encephalitis virus. *Virology*, *306*(1), 170–180. https://doi.org/10.1016/S0042-6822(02)00028-4

[26] Purdy, D. E., and Chang, G. J. J. (2005). Secretion of noninfectious dengue virus-like particles and identification of amino acids in the stem region involved in intracellular retention of envelope protein. *Virology*, *333*(2), 239–250. https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.12.036

[27] Chang, G.-J. J. (1998). Chimeric flavivirus immunogens comprising the Japanese encephalitis virus (JEV) prM signal sequence, Patent US8221768B2.

[28] 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*, *96* (1702-1711). https://doi.org/10.1099/vir.0.000113.

[29] Song, M., Raphaelli, K., Jones, M. L., Aliabadi-Zadeh, K., Leung, K. M., Crowley, D., Hughes, B., Mahler, S., Gray, P. P., Huang, E. P., *et al*. (2011). Clonal selection of high producing, stably transfected HEK293 cell lines utilizing modified, high-throughput FACS

screening. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *86*(7), 935–941. https://doi.org/10.1002/jctb.2618.

[30] Dowd, K. A., Ko, S. Y., Morabito, K. M., Yang, E. S., Pelc, R. S., DeMaso, C. R., Castilho, L. R., Abbink, P., Boyd, M., Nityanandam, R., *et al*. (2016). Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus. *Science*, *354*(6309), 237–240. https://doi.org/10.1126/science.aai9137.

[31] Brezinsky, S. C. G., Chiang, G. G., Szilvasi, A., Mohan, S., Shapiro, R. I., MacLean, A., Sisk, W., and Thill, G. (2003). A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity. *Journal of Immunological Methods*, *277*(1–2), 141–155. https://doi.org/10.1016/S0022-1759(03)00108-X

[32] Okumura, T., Masuda, K., Watanabe, K., Miyadai, K., Nonaka, K., Yabuta, M., and Omasa, T. (2015). Efficient enrichment of high-producing recombinant Chinese hamster ovary cells for monoclonal antibody by flow cytometry. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *120*(3), 340–346. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.01.007.

[33] Nikolay, A., Léon, A., Schwamborn, K., Genzel, Y., and Reichl, U. (2018). Process intensification of EB66® cell cultivations leads to high-yield yellow fever and Zika virus production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(20), 8725–8737. https://doi.org/10.1007/s00253-018-9275-z.

[34] Nikolay, A., Castilho, L. R., Reichl, U., and Genzel, Y. (2018). Propagation of Brazilian Zika virus strains in static and suspension cultures using Vero and BHK cells. *Vaccine*, *36*(22), 3140–3145. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.03.018.

[35] Clincke, M. F., Mölleryd, C., Zhang, Y., Lindskog, E., Walsh, K., and Chotteau, V. (2013). Very high density of CHO cells in perfusion by ATF or TFF in WAVE bioreactor™: Part I: Effect of the cell density on the process. *Biotechnology Progress*, *29*(3), 754–767. https://doi.org/10.1002/btpr.1704.

[36] Voisard, D., Meuwly, F., Ruffieux, P. A., Baer, G., and Kadouri, A. (2003). Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, *82*(7), 751-765. https://doi.org/10.1002/bit.10629.

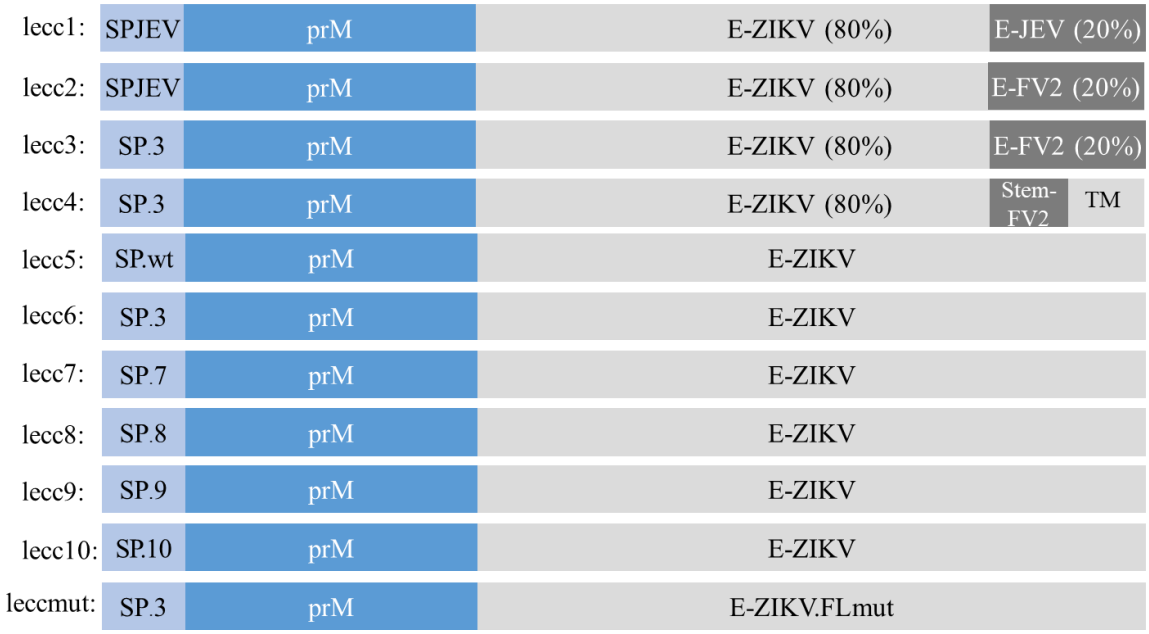


Figure 1: ZIKV constructs based on the structural proteins prM and E. Different signal peptides (SP), as well as chimeric and mutated E protein sequences were evaluated. All sequences were based on a ZIKV strain isolated in Brazil in 2015 (strain BeH819966).

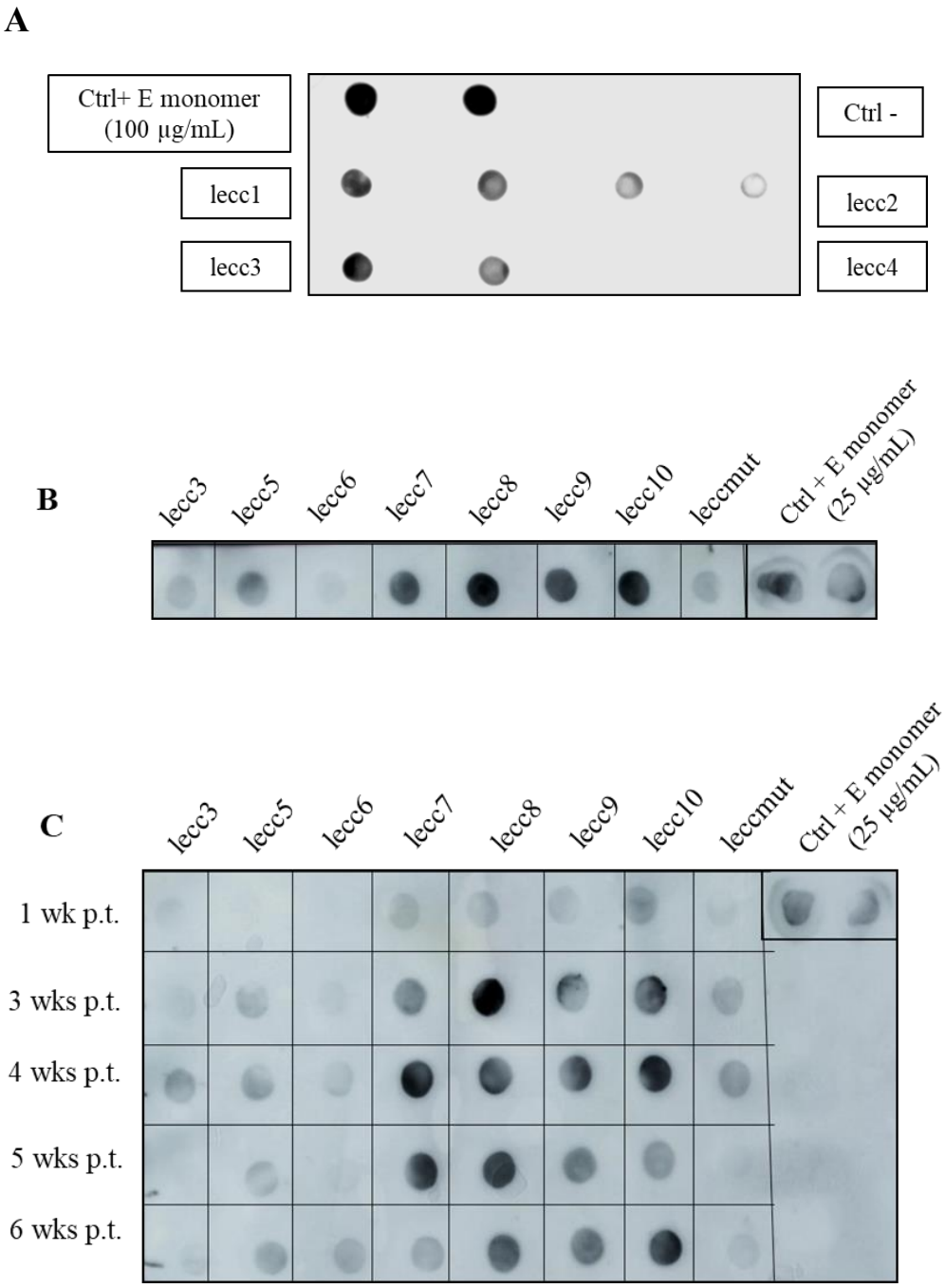


Figure 2: Immunoblot using 4G2 monoclonal antibody as primary antibody for confirmation of VLP production by the different cell pools. Dengue E protein was used as a positive control to assure that E proteins were recognized effectively by this methodology. (A) First evaluation of VLP transient expression in HEK293-3F6 cell line using constructs lecc1-lecc4 at 48h post-transfection (p.t.). Samples from both biological transfection replicates were evaluated. As observed, it was possible to detect expression of constructs lecc1-lecc3, but no production of lecc4 was visualized. (B) Transient expression of different VLP constructs at 48h p.t., showing higher expression level for constructs lecc7-lecc10. (C) VLP expression of constructs lecc3, lecc5-lecc10 and leccmut from 1 week (wk) p.t. until 6 weeks p.t.

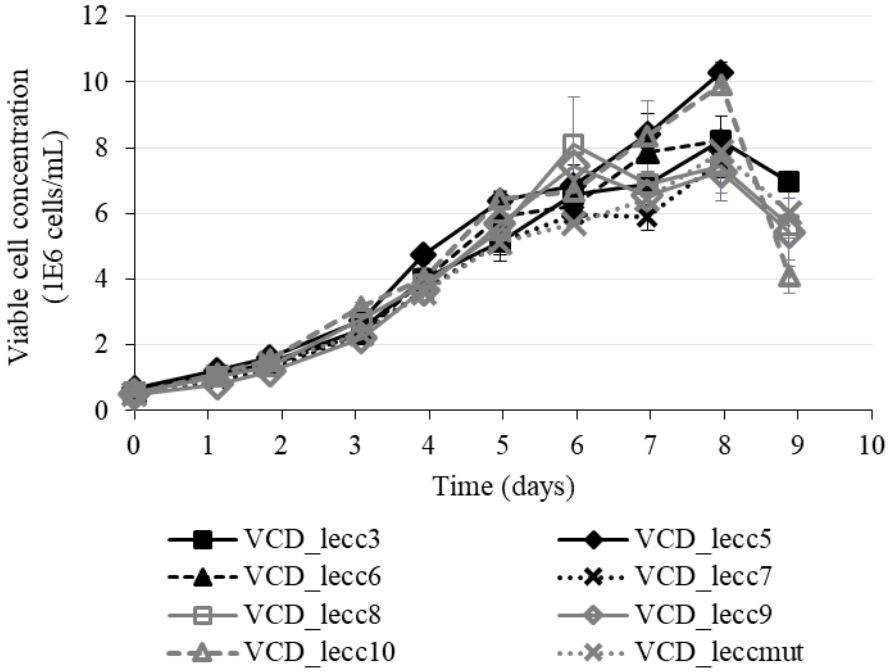
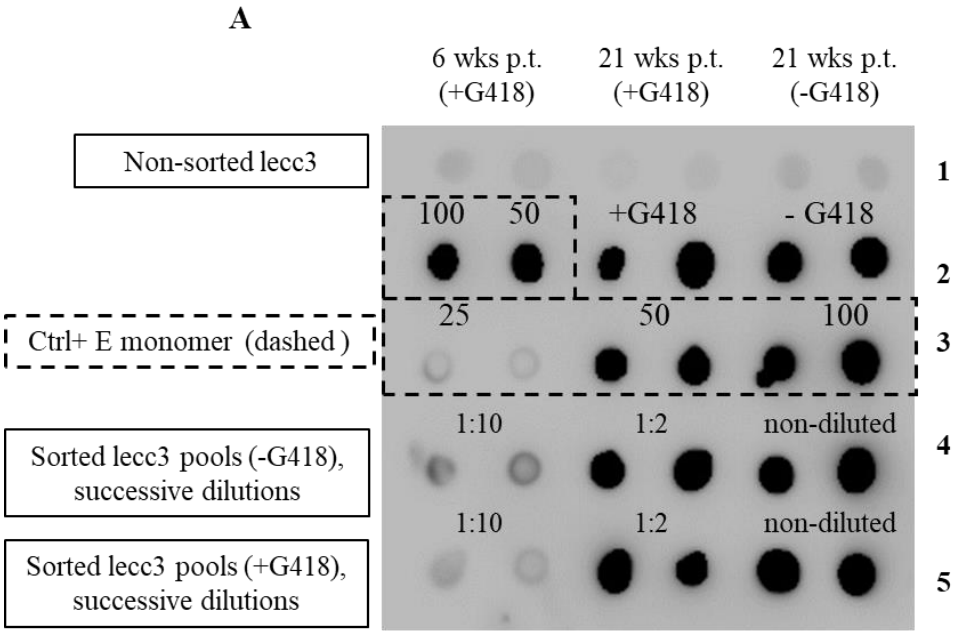
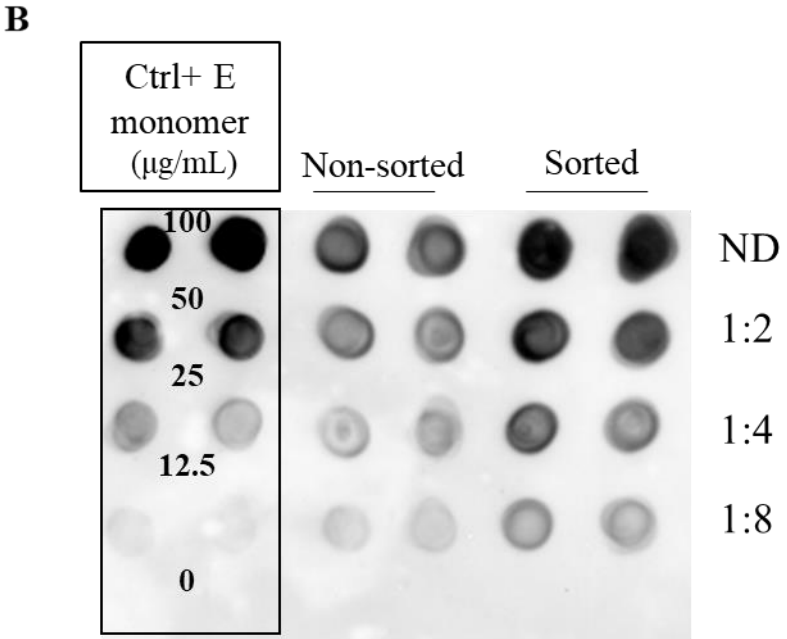


Figure 3: Viable cell concentration (VCD) obtained for the different stable cell pools cultivated in batch mode. Kinetic study was performed 43 days post-transfection in HEK TF medium. Viability was kept above 90% until day 7, when nutrient depletion led to a decrease in both viability (data not shown) and VCD.


A
6 wks p.t.
(+G418)
21 wks p.t.
(+G418)
21 wks p.t.
(-G418)
Non-sorted lecc3
100
50
+G418
- G418
Ctrl+ E monomer (dashed)
25
50
100
Sorted lecc3 pools (-G418), successive dilutions
1:10
1:2
non-diluted
Sorted lecc3 pools (+G418), successive dilutions
1:10
1:2
non-diluted
1
2
3
4
5


B
Ctrl+ E monomer (µg/mL)
Non-sorted
Sorted
100
50
25
12.5
0
ND
1:2
1:4
1:8

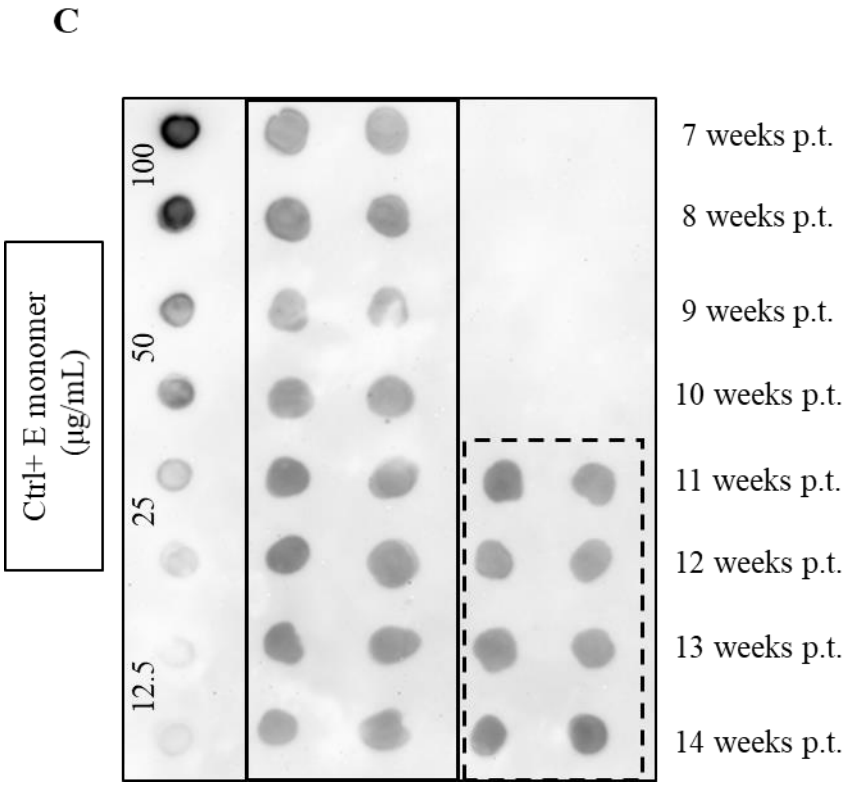
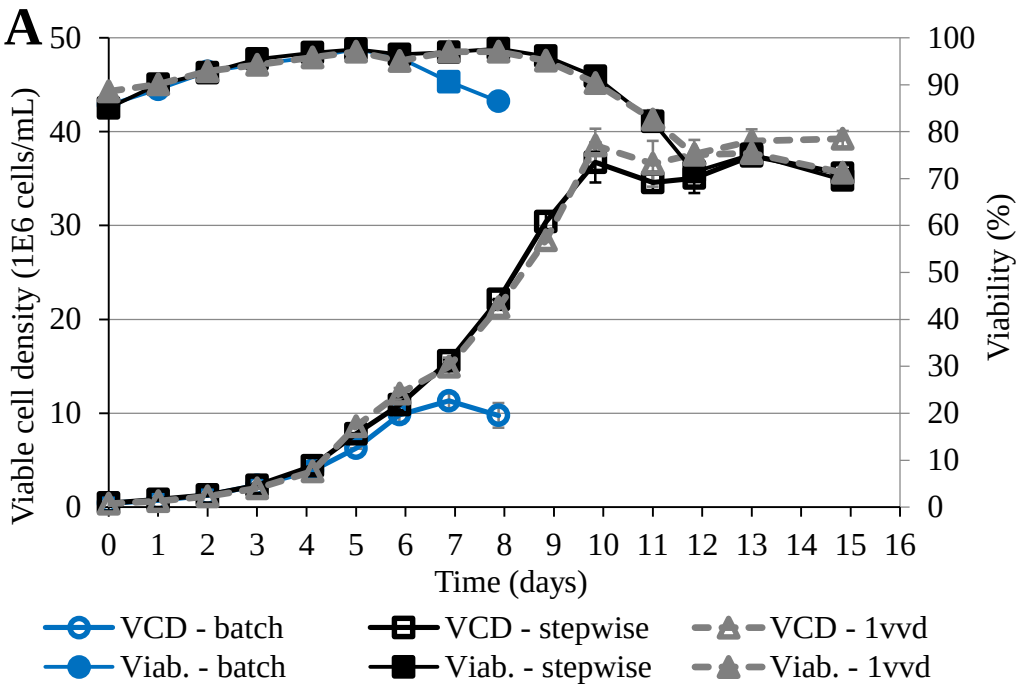
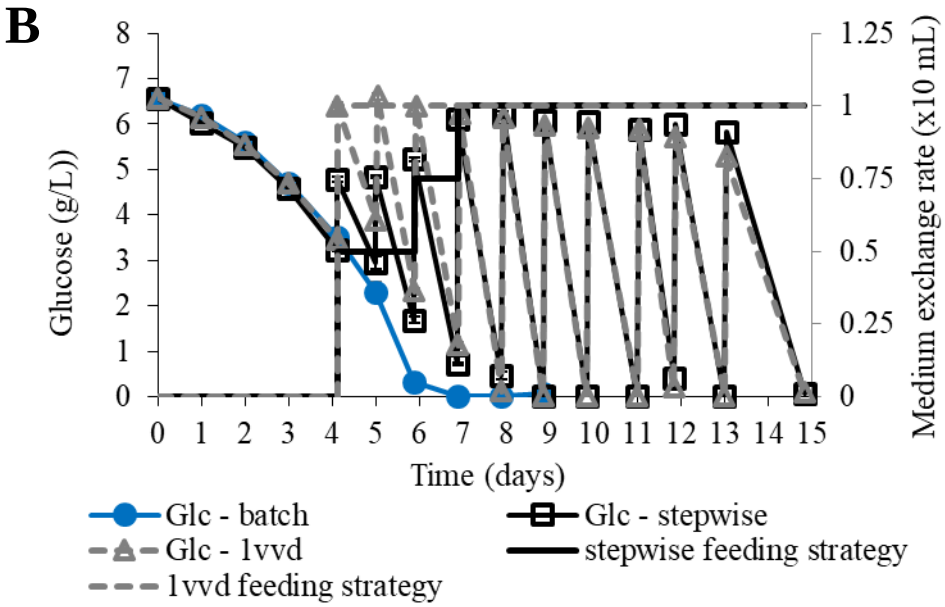


Figure 4: Immunoblot confirming stability in production over time and the increase in VLP production by cell pools after sorting procedure. All conditions were evaluated in replicates. (A) Non-sorted lecc3 cells were kept for over 20 weeks in culture and it showed similar expression with samples collected 6 weeks (wks) post-transfection (p.t.), indicating stability in VLP production over time. Part of the cell pool was maintained in the absence of selection pressure (G418) after 16 weeks p.t. (wpt) and VLP expression was comparable to samples taken 6 wpt and 21 wpt, both in the presence of G418 (line 1). Samples from sorted lecc3 cells (lines 2, 4 and 5) indicate increased production when compared to samples from non-sorted cells (line 1). Dengue E protein in different concentrations (dashed rectangle, lines 2 and 3) was used as positive control. (B) VLP expression obtained by sorted and non-sorted lecc9 cell pools. (C) Evaluation of the stability of VLP expression by lecc9 cell pool (non-sorted) in the presence of selection pressure (black rectangle). Stability was evaluated only in the presence of selection antibiotic (G418 sufate) until week 10 post-transfection. Additionally, part of the cell pool was cultivated in the absence of G418 from week 11 post-transfection on (dashed rectangle) and production showed to be stable even with no addition of the selection antibiotic. Dilution of samples was carried out to assure sorted cells were producing more than pre-sorted cell pool. Dengue E protein in different concentrations was used as positive control.


A
Viable cell density (1E6 cells/mL)
Viability (%)
Time (days)
VCD - batch
Viab. - batch
VCD - stepwise
Viab. - stepwise
VCD - 1vvd
Viab. - 1vvd


B
Glucose (g/L))
Medium exchange rate (x10 mL)
Time (days)
Glc - batch
Glc - stepwise
Glc - 1vvd
stepwise feeding strategy
1vvd feeding strategy

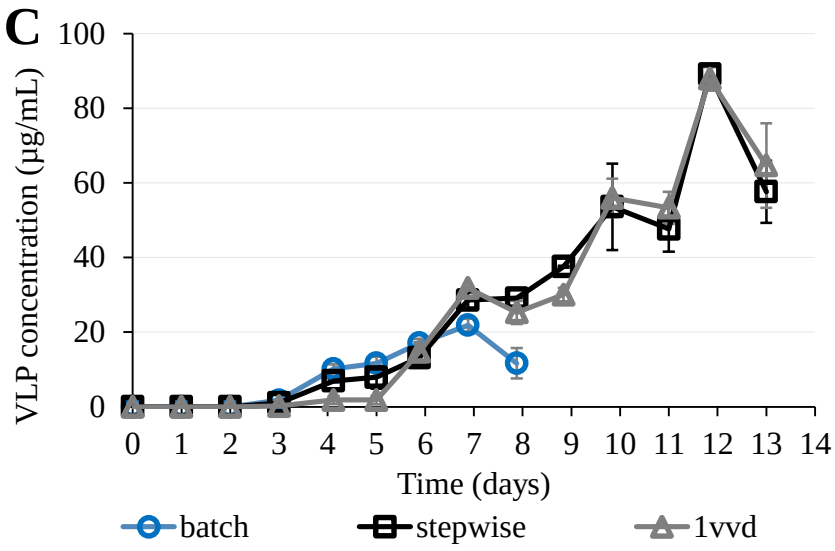
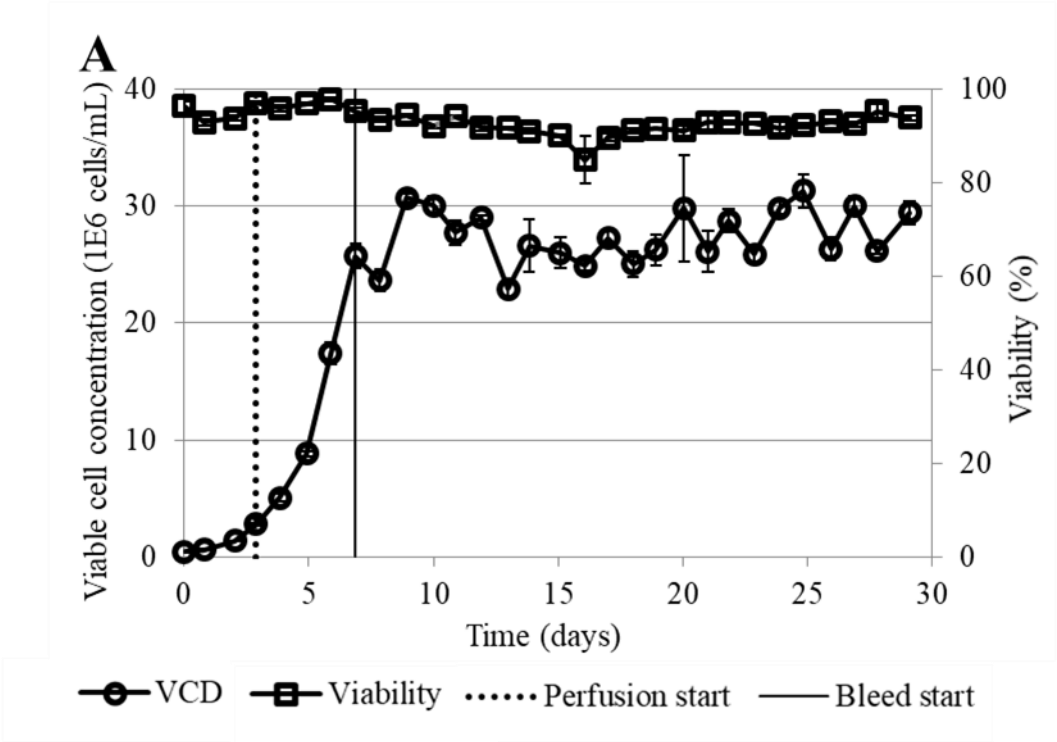


Figure 5: Production of VLPs by lecc3 cell pool (sorted) in spin tubes cultivated under batch (blue circles) and pseudoperfusion modes (black squares - stepwise feeding; grey triangles - constant 1vvd feeding). (A) Viable cell density (VCD – open symbols) and viability (filled symbols) during the cultivation of cells. (B) Glucose concentration (Glc) and daily medium exchange rate during the cultivation. Feeding strategies started on day 4 and samples were taken before and after feed regimen was performed. (C) VLP concentration referred to reference protein E obtained when cells were grown in batch (blue circles) or pseudoperfusion modes (black squares - stepwise feeding; grey triangles - constant 1vvd feeding).



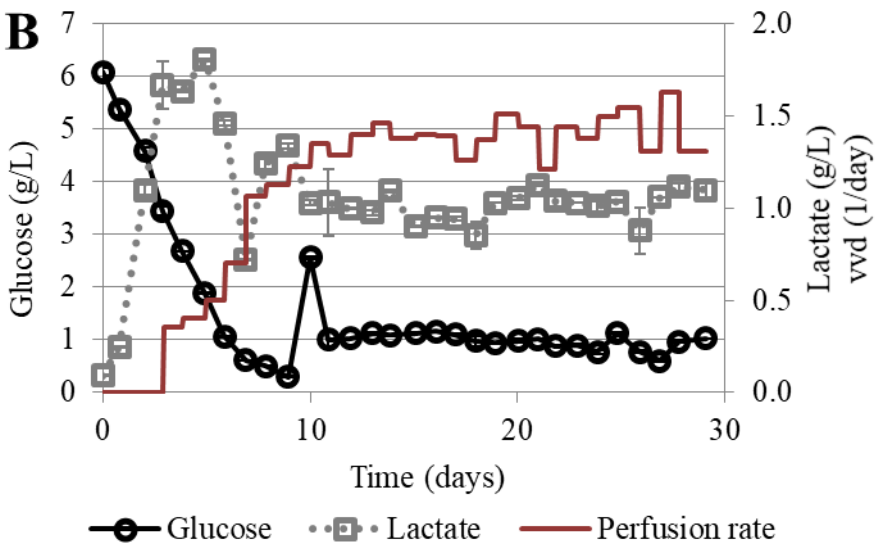


Figure 6: Production of VLPs by lecc3 cell pool (sorted) in perfusion mode. (A) Viable cell density (VCD – circles) and viability (squares) during the cultivation of cells. (B) Glucose and lactate concentrations and perfusion rate medium exchange during the perfusion run, given as volume of fresh medium per culture volume per day.