DANIELLA CRISTINA VENTINI MONTEIRO

PURIFICAÇÃO E IMUNOGENICIDADE DA GLICOPROTEÍNA DO VÍRUS DA RAIVA (RVGP) EXPRESSA PELOS SISTEMAS CÉLULAS S2 E SEMLIKI FOREST VIRUS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2014

DANIELLA CRISTINA VENTINI MONTEIRO

Purificação e imunogenicidade da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) expressa pelos sistemas células S2 e Semliki Forest Virus

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Pereira

Co-orientador: Prof. Dr. Renato Mancini Astray

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Monteiro, Daniella Cristina Ventini.
Purificação e imunogenicidade da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) expressa pelos sistemas células S2 e Semliki Forest Vírus / Daniella Cristina Ventini Monteiro. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Pereira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Imunologia viral.

Versão do título para o inglês: Purification and immunogenicity of the rabies virus glycoprotein (RVGP) expressed by S2cells and Semliki Forest Vírus.

1. Glicoproteína do vírus da raiva 2. Células de inseto S2 3. Vírus Semliki Forest 4. Vacina contra raiva I. Pereira, Prof. Dr. Carlos Augusto II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0200/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Daniella Cristina Ventini Monteiro.

Título da Tese: Purificação e imunogenicidade da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) expressa pelos sistemas células S2 e Semliki Forest Vírus.

Orientador(a): Prof. Dr. Carlos Augusto Pereira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Desenvolvimento de bioprocesso com células S2 para produção e purificação da glicoproteína recombinante do vírus da raiva (RVGP) e estudo da sua antigenicidade" **protocolo nº 791/11**, sob a responsabilidade de Carlos Augusto Pereira, Renato Mancini Astray e Daniella Cristina Ventini, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 10/03/2011.

We certify that the research entitled "Development of a S2 cells bioprocess for the produtction and purification of rabies virus glycoprotein (RVGP) and antigenicity studies", **protocol nº 791/11**, under the responsibility of Carlos Augusto Pereira, Renato Mancini Astray and Daniella Cristina Ventini, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 03/10/2011.

Vigência do Projeto: 03/2011 – 03/2014	**Nº de animais/espécie**
Laboratório de Imunologia Viral	100 camundongos Balb/c Machos

São Paulo, 17 de março de 2011.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

À Neide Ventini (*in memorian*), meu exemplo de força, sem seus ensinamentos e cuidados eu nada teria conseguido, e neles eu continuo seguindo viagem.

Obrigada mãe!

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Carlos Augusto Pereira pelo acolhimento, oportunidade, confiança, orientação, transparência, amizade e apoio.

Ao Dr. Renato Mancini Astray pela orientação, paciência, respostas para todas as minhas milhões de perguntas, apoio nos momentos difíceis, carinho e amizade.

À Dra. Soraia Attie Calil Jorge pela amizade, discussões, aulas, ouvidos e amizade.

Ao Dr. Aldo Tonso, pela amizade, carinho, orientação e constante ajuda com os biorreatores.

Ao Dr. Marcos Alexandre Nobre Lemos, meu irmão de coração, por todos os momentos de estudo, brincadeiras, colaboração, chatices, parceria e amizade.

À Dra. Marilena Martins Pamboukian, pela amizade, carinho de mãe e orientação.

À Maria Lucia da Silva Gomes por ser o exemplo de como sorrir nos momentos difíceis e continuar a caminhar com leveza.

À Vera Lucia Boldorini, pela ajuda com os animais, convivência diária e puxões de orelha.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Viral: Ma. Sandra F. S. Patiño, Ma. Ana Lia Pradella Puglia, Thaíssa C. Bernadino, Me. Alexandre G. de Rezende, Ma. Juliana F. B. Paschoal, Polyana A. V. M. de Sousa, Roselane P. Gomes, Nayara G. L. Santos, Alessandra C. D. Lupi, Mayra Rocca e demais LIVs, pela amizade, discussões, polimerização de inúmeros géis de acrilamida, demais colaborações e ótimo convívio.

Ao Guilherme Augusto Del Padre, pela amizade, discussões, ajudas, explicações e companhia nos finais de semana de ensaios em biorreator.

Ao Dr. Jaime Henrique Amorim Santos pela ajuda e ensino com os imunoensaios.

Ao Paulo Roberto Monteiro, meu amigo, confidente, companheiro e marido, pelo incentivo, apoio, amor e carinho, que foram essenciais para esta e outras conquistas.

À amada Bruna Ventini Monteiro, minha melhor amiga e filha, exemplo de pureza.

Aos filhotes Rico e Rambo, pelo amor incondicional e parceria.

À família Monteiro pelo acolhimento, cuidados, atenção e carinho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e bolsa (142729/2010-8).

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento (FAPESP), pelo apoio financeiro.

Ao Programa de pós-graduação Interunidades em Biotecnologia.

Amigos, durante meu doutorado eu recebi os melhores presentes da vida e também as maiores tristezas, e todos vocês, cada um à sua maneira, contribuíram e contribuem, e muito, para que eu siga em frente. Sem vocês eu não conseguiria, muito obrigada!

RESUMO

VENTINI-MONTEIRO, D. C. **Purificação e imunogenicidade da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) expressa pelos sistemas células S2 e Semliki Forest Virus.** 2014. 137 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O desenvolvimento de novas vacinas contra a raiva tão eficientes quanto as atuais, porém a um menor custo, é considerado importante para a profilaxia dessa doença, que ainda causa a morte de aproximadamente 55 mil pessoas por ano no mundo. Neste trabalho utilizamos dois sistemas para a expressão recombinante do principal antígeno da raiva, a glicoproteína viral (RVGP): células Schneider 2 de *Drosophila melanogaster* estavelmente transfectadas (S2 rRVGP) e vírus *Semliki Forest* (SFV) carregando o RNA da RVGP (SFV-RVGP). Para a purificação da RVGP recombinante (rRVGP), produzida por células S2 rRVGP cultivadas em biorreator, foram realizados procedimentos de preparação membranária, seguidos da solubilização da rRVGP em soluções tampão contendo detergente (CHAPS, DDM ou OG), devido a sua característica hidrofóbica. Uma vez solubilizada, a rRVGP foi parcialmente purificada por cromatografia de afinidade à cauda de histidina (IMAC) presente na molécula. Análises de *dot blotting* mostraram que a purificação em tampão contendo OG apresentou melhor resultado que as demais. A análise de *western-blotting* mostrou que as frações cromatográficas eluídas em concentrações de 450 mM e 500 mM de imidazol apresentaram a rRVGP no tamanho esperado de aproximadamente 70 kDa. A purificação da rRVGP de S2 rRVGP apresentou resultados promissores para o isolamento de monômeros, que podem ser usados em futuros estudos de caracterização dessa glicoproteína. Para os estudos de imunogenicidade, camundongos foram vacinados com rRVGP de S2 rRVGP e SFV-RVGP. Após a imunização com três doses de cada preparação, os dois grupos não apresentaram diferença significativa da vacina comercial, em relação ao título de anticorpos dosados por ELISA, com títulos de 2,5, 3,5 e 3,7 EU/mL, para os animais vacinados com S2 rRVGP, SFV-RVGP e vacina comercial, respectivamente. Já os resultados de RFFIT *(Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test*), mostraram títulos de anticorpos neutralizantes de 1,7, 9,5 e 23,8 UI/mL, respectivamente, revelando uma diferença nesse tipo de resposta. Quando SFV-RVGP foi dado como primeira dose, seguido de duas doses de reforço com rRVGP de S2 rRVGP, os títulos de anticorpos ficaram dentro da média (ELISA 4,2 UI/mL e RFFIT 14,8 UI/mL), mostrando ser uma abordagem adequada para imunização contra a raiva, visto a intensidade e qualidade da resposta imune gerada. A análise de citocinas (IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 e IFN-γ) e da quantidade de anticorpos IgG1 e IgG2a, mostraram que o SFV-RVGP induziu predominantemente uma resposta imune do tipo celular, demonstrando seu potencial uso como tratamento pós-exposição. A produção de anticorpos neutralizantes contra o vírus da raiva (RFFIT) demonstrou a capacidade dos dois vetores em expressar uma rRVGP imunogênica, apresentando um potencial uso clínico (veterinário e humano).

Palavras-chave: Glicoproteína do vírus da raiva. Células de inseto S2. Vírus *Semliki Forest*. Vacina contra raiva.

ABSTRACT

VENTINI-MONTEIRO, D. C. **Purification and immunogenicity of the rabies virus glycoprotein (RVGP) expressed by S2 cells and Semliki Forest Virus systems.** 2014. 137 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The development of new and equally efficient rabies vaccines with lower production cost is still considered important to the prophylaxis of the disease, which is responsible for around 55 000 human deaths per year worldwide. In this work we used two systems for recombinant expression of the major rabies antigen, the viral glycoprotein (RVGP): stably transfected *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells (S2 rRVGP) and Semliki Forest Virus (SFV) carrying the RNA of RVGP (SFV-RVGP). For recombinant RVGP (rRVGP) purification from S2 rRVGP cells cultivated in bioreactor, membrane preparations were firstly obtained, followed by rRVGP solubilization in buffers containing detergents (CHAPS, DDM or OG), since rRVGP is a hydrophobic molecule. The solubilized rRVGP was then partially purified by its histidine tag using metal ion affinity chromatography (IMAC). Dot blotting analysis showed that the purification with the buffer containing OG produced the best results. Western blotting analysis showed that chromatographic fractions eluted with 450 mM and 500 mM imidazole presented the rRVGP at the expected size of approximately 70 kDa. The rRVGP purification from S2 cells presented promising results for rRVGP monomers isolation, which can be further used for the characterization of this glycoprotein. In immunogenicity studies, mice were vaccinated with rRVGP and SFV-RVGP. After the immunization with three doses of each preparation, the two groups showed no statistical difference to the commercial rabies vaccine, in relation to the antibody titer measured by ELISA, with titers of 2.5, 3.5 and 3.7 EU/mL in groups vaccinated with S2 rRVGP, SFV-RVGP and commercial vaccine, respectively. RFFIT assays (rapid fluorescent focus inhibition test) showed titers of 1.7, 9.5 and 23.8 IU/ml, respectively, showing a difference in the neutralization antibodies titers. When SFV-RVGP was used for priming followed by two booster doses with rRVGP from S2 rRVGP, antibodies titers remained within the average (ELISA 4.2 IU/mL and RFFIT 14.8 IU/mL), showing that this approach is appropriated for immunization against rabies in view of the intensity and quality of the stimulated immune response. Analysis of cytokines (IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 and IFN-γ) and IgG1 and IgG2a antibodies demonstrated that the SFV-RVGP induced predominantly a cellular immune response, showing its potential use as post-exposure treatment. The synthesis of anti-rabies neutralizing antibodies demonstrated that both vectors were capable of expressing an immunogenic rRVGP, what reinforces potential clinical applications (veterinary or human).

Keywords: Rabies virus glycoprotein. S2 insect cells. *Semliki Forest* Virus. Rabies vaccine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema do vírus da raiva. 23

Figura 2. Esquema da glicoproteína do vírus da raiva. 24

Figura 3. Esquema do padrão de glicosilação em diferentes tipos de células. 28

Figura 4. Estrutura e genoma do SFV. 33

Figura 5. Representação esquemática da produção do SFV recombinante. 35

Figura 6. Mapa do vetor pMTRVGP-Hygro. 39

Figura 7. Mapa do vetor pMTRVGP-Hygro-His. 40

Figura 8. Esquema de imunização dos animais utilizados. 46

Figura 9. Concentração celular do cultivo das células S2MtRVGP-H-His e análise da expressão de rRVGP. 50

Figura 10. Cultivo de células S2MtRVGP-H em biorreator para produção de rRVGP. 51

Figura 11. Cultivo de células S2MtRVGP-H-His em biorreator para produção de rRVGP... 52

Figura 12. Quantificação da rRVGP armazenada. 53

Figura 13. Cromatogramas da purificação da rRVGP-histidina produzida por células S2 em FPLC. 55

Figura 14. Detecção da rRVGP-histidina produzida por células S2 nas frações coletadas após purificação por *dot blotting*. 56

Figura 15. Cromatograma da purificação da rRVGP-histidina produzida por células S2 por FPLC, em gradiente de imidazol. 57

Figura 16. SDS-PAGE das frações coletadas após purificação da rRVGP-histidina por FPLC, em gradiente de imidazol. 58

Figura 17. Detecção da rRVGP-histidina produzida por células S2 nas frações coletadas após purificação histidina por FPLC, em gradiente de imidazol, por *Western-blotting*. 59

Figura 18. Detecção da rRVGP-histidina produzida por células BHK-21 infectadas por SFV-RVGP nas frações coletadas da cromatografia de afinidade, por *western-blotting*. 60

Figura 19. Detecção por *dot blotting* da rRVGP-histidina produzida por células BHK-21 infectadas por SFV-RVGP nas frações coletadas da cromatografia de afinidade. 60

Figura 20. Síntese de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-glicoproteína do vírus da raiva. Cinética da razão IgG1 / IgG2a em animais imunizados com vacina contra raiva ou SFV-RVGP. 67

Figura 21. Síntese de citocinas em cultura de esplenócitos dos animais previamente imunizados. 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos de imunização com o vetor SFV. 37

Tabela 2. Síntese de anticorpos IgG anti-glicoproteína do vírus da raiva no soro dos animais imunizados com rRVGP ou SFV-RVGP. Cinética de produção de anticorpos e definição do tipo de ancoragem da proteína e título viral para vacinação. 62

Tabela 3. Síntese de anticorpos IgG anti-glicoproteína do vírus da raiva no soro dos animais imunizados. Avaliação de anticorpos por ELISA, RFFIT e comparativo da resposta imune entre os grupos. 64

Tabela 4. Síntese de anticorpos IgG anti-glicoproteína e neutralizantes do vírus da raiva no soro dos animais imunizados. Vacinação com duas doses (dias 0 e 14) de rRVGP, SFV-RVGP ou vacina. Dosagem de anticorpos após 20 e 50 dias da primeira imunização..... 66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHK – *Baby Hamster Kidney*

CD4 – *Cluster of diferentation* 4

CD8 – *Cluster of diferentation* 8

CFIA – *Canadian Food Inspection Agency*

CHO – *Chinese Hamster Ovary*

CO_2 – Dióxido de carbono

$CuSO_4$ – Sulfato de cobre

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbant Assay*

ERA – cepa *Evelyn Rokitnicki Abelseth* do vírus da raiva

EU – Equivalentes internacionais (equivalentes a unidades internacionais)

FDA – *Foods and Drugs Administration*

FPLC – *Fast Protein Liquid Chromatography*

FSH – *Follicle-stimulating hormone*

GnTI – Enzima N-acetil glicosamina transferase I

HEK – *Human Embrionic Kidney*

HIV – *Human Immunodeficiency Virus*

IFN – Interferon

IgG – Imunoglobulina G

IL – Interleucina

IMAC - *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*

L – RNA polimerase

KH – *Luteinizing hormone*

M – Proteína de matriz

ManI – Enzima manosidase I

ManII – Enzima manosidase II

$Man_3GlcNAc_2$ – N-acetil-glicosamina

N – Nucloproteína

nsP - *Non structutal proteins*

ORF – *Open Reading frames*

P – Fosfoproteína

qRT-PCR – *Real-time quantitative reverse transcription of polymerase chain reaction*

RABV – *Rabies Virus strain Pasteur vaccins / PV*

RFFIT – *Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test*

RNA – *Ribonucleic acid*

RVGP – *Rabies Virus Glycoprotein – Pasteur strain*

rRVGP – Glicoproteina do virus da raiva recombinante – cepa Pasteur

S2 – *Schneider* 2

S2MtRVGP-H – Células S2 que expressam a RVGP sob domínio do promotor da metalotioneína e selecionadas com higromicina

S2MtRVGP-H-His – Células S2 que expressam a RVGP com cauda de histidina sob domínio do promotor da metalotioneína e selecionadas com higromicina

SDS-PAGE – *Sodium dodecyl sulfate poluacrilamide gel electrophoresis*

Sf – *Spodoptera frugiperda*

SFV – *Semliki Forest Virus*

SFV-GFP – Partícula de SFV que contém RNA para codofifar a proteína verde fluorescente

SFV-RVGP – Partícula de SFV que contém RNA para codificar a RVGP

UI – Unidades internacionais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA 16

2 OBJETIVOS 18

2.1 Objetivo geral 18

2.2 Objetivos específicos 18

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19

3.1 A raiva, a vacina contra raiva e o panorama mundial 19

3.2 Vírus da raiva 22

3.3 Glicoproteína recombinante do vírus da raiva 25

3.4 Expressão de proteínas recombinantes 26

3.5 Cultivo de células animais 27

3.6 Células de *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2) 29

3.7 Semliki Forest Virus (SFV) 32

3.8 Purificação 37

4 MATERIAIS E MÉTODOS 39

4.1 Preparação da rRVGP expressa em células S2 39

4.1.1 *Estabelecimento da linhagem celular S2MtRVGP-H* 39

4.1.2 *Estabelecimento da linhagem celular S2MtRVGP-H-His* 39

4.1.3 *Cultivo de células S2MtRVGP-H e S2MtRVGP-H-His em biorreator de tanque agitado e manutenção celular* 40

4.1.4 *Medida de viabilidade e densidade celular* 41

4.1.5 *Quantificação da rRVGP produzida* 41

4.1.6 *Purificação da rRVGP* 42

4.1.6.1 Análise da rRVGP armazenada 42

4.1.6.2 Purificação da rRVGP produzida por células S2MtRVGP-H-His 42

4.1.6.3 Purificação da rRVGP produzida por células BHK-21 infectadas por SFV-RVGP 43

4.1.6.4 Quantificação de proteínas totais por BCA 43

4.1.6.5 Imunodetecção das frações purificadas 43

4.2 Obtenção das partículas de SFV-RVGP e rRVGP de células BHK-21 44

4.2.1 *Quantificação das partículas virais SFV-RVGP* 44

4.3 Análise da resposta imune de animais imunizados com rRVGP e SFV-RVGP 45

4.3.1 *Animais utilizados* 45
4.3.2 *Protocolo de imunização* 45
4.3.3 *Dosagem de anticorpos IgG anti-glicoproteína do vírus da raiva* 46
4.3.4 *Rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT)* 46
4.3.5 *Dosagem de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-glicoproteína do vírus da raiva* 47
4.3.6 *Extração e cultura dos esplenócitos murinos* 47
4.3.7 *ELISA para citocinas (IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-10, IL-12)* 47
4.3.8 *Análises estatísticas* 48
5 RESULTADOS 49
5.1 Preparação da rRVGP expressa em células S2 49
5.1.1 *Estabelecimento da linhagem celular S2MtRVGP-H* 49
5.1.2 *Estabelecimento da linhagem celular S2MTRVGP-H-His* 49
5.1.3 *Cultivo de células S2MtRVGP-H e S2MtRVGP-H-His em biorreator de tanque agitado* 50
5.1.4 *Análise da rRVGP armazenada* 52
5.1.5 *Purificação da rRVGP* 53
5.1.5.1 Purificação da rRVGP produzida por células S2MtRVGP-H-His 53
5.1.5.2 Purificação da rRVGP produzida por células BHK-21 infectadas por SFV-RVGP 59
5.2 Estudo da imunogenicidade da rRVGP produzida por células S2 e SFV-RVGP 61
5.2.1 *Síntese de anticorpos IgG anti-glicoproteína do vírus da raiva* 61
5.2.2 *Síntese de citocinas em animais imunizados com RVGP* 68
6 DISCUSSÃO 71
7 CONCLUSÕES 81
REFERÊNCIAS 82
APÊNDICES – Artigos de periódicos 95

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Apesar da existência de métodos profiláticos, como a vacinação de animais domésticos (capazes de prevenir a raiva em reservatórios intermediários como cães e gatos), e de tratamentos pós-exposição eficazes, pela aplicação vacinas e/ou imunoglobulinas nos casos de acidentes, a raiva ainda é responsável pela morte de aproximadamente 55 mil pessoas por ano no mundo. A maior parte dos óbitos acontece em muitos países que ainda não têm condições de produção de vacinas modernas ou utilizam vacinas menos eficazes, devido ao alto custo e sofisticação da tecnologia de produção de vacinas mais seguras, produzidas em culturas celulares (aproximadamente 95% dos acidentes acontecem na Ásia e na África).

Em alguns países, como Estados Unidos, Canadá e alguns países da Europa, são realizados programas de vacinação dos reservatórios naturais da raiva, a fauna silvestre, que devido à contínua pressão humana sobre a natureza, tem se aproximado cada vez mais da fauna doméstica e diretamente dos humanos.

Frente a essa realidade, o desenvolvimento de vacinas contra a raiva mais eficientes e mais baratas que as vacinas contendo vírus inativado é primordial, tanto para o uso humano (principalmente nos países de alto risco), quanto para o uso veterinário. O desenvolvimento de produtos associados ao vírus da raiva, como imunoglobulinas e antígenos para composição de kits diagnósticos, ou para utilização no controle de etapas de produção de vacinas, são igualmente importantes.

A glicoproteína do vírus da raiva é o principal antígeno capaz de conferir resposta imunológica neutralizante contra uma infecção pelo vírus da raiva. Essa proteína é uma glicoproteína transmembrânica, trimérica, que depende de modificações pós-traducionais para preservação de sua imunogenicidade.

O Laboratório de Imunologia Viral (onde desenvolvi o meu projeto) estuda e desenvolve células S2 de *Drosophila melanogaster* geneticamente modificadas e tecnologia para cultura destas células. A minha dissertação de mestrado resultou no desenvolvimento de tecnologia otimizada para a preparação da glicoproteína recombinante do vírus da raiva (rRVGP, glicoproteína recombinante do vírus da raiva - cepa Pasteur) em células S2 geneticamente modificadas e cultivadas em biorreatores e também estudos de extração da rRVGP produzida por essas células.

A experiência por nós adquirida nesses últimos anos nos leva a crer que somente com uma produção de forma controlada será possível obter a rRVGP em quantidade e com

qualidade suficientes para dar continuidade aos estudos de estrutura e imunogenicidade da proteína.

As células S2 têm se mostrado adequadas para sintetizar até 6 µg de rRVGP por 10^7 células. Em vista dos bons resultados iniciais e de perspectivas concretas de estudos de aplicação como vacina veterinária ou em kits diagnósticos, um projeto de estabelecimento de bioprocesso completo, incluindo validação de *upstream*, desenvolvimento de processos de purificação e estudos imunológicos de função da rRVGP, adquire alta relevância. Dando continuidade ao mestrado, este trabalho visou estudar a rRVGP produzida por células de inseto (S2) quanto à sua capacidade de induzir uma resposta imune humoral e celular assim como a soroneutralização de vírus rábico em ensaios *in vitro*.

Ainda com relação à rRVGP, estudamos e desenvolvemos aspectos de *downstream*, ou seja, métodos de extração e purificação de rRVGP produzida em biorreatores com protocolo otimizado para futuros estudos de estrutura da proteína (modificações pós traducionais).

A imunogenicidade da rRVGP também foi estudada pela sua expressão nas próprias células do hospedeiro através da infecção com *Semliki Forest Vírus* (SFV) contendo um RNA auto replicativo que codifica para a rRVGP (BENMAAMAR et al., 2009). As partículas de SFV recombinantes infecciosas, mas não replicativas, foram obtidas por técnicas de biologia molecular, a partir de plasmídeos já construídos e testados. Essas partículas carregam a informação genética da RVGP (SFV-RVGP). O sistema SFV caracteriza-se pela capacidade de produzir uma grande quantidade de RNA mensageiro de interesse nas células infectadas, levando a um alto nível de expressão em culturas celulares ou *in vivo* da proteína recombinante.

Portanto, nesse projeto utilizamos duas formas diferentes de imunização contra a raiva, através da vacinação de camundongos com rRVGP produzida em células S2 ou produzida *in vivo* mediante a infecção com o SFV-RVGP.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir rRVGP em células *Schneider* 2 de *Drosophila melanogaster* (S2) em quantidade e qualidade adequadas para: 1. Desenvolvimento de protocolos de produção, armazenamento e purificação; 2. Avaliação de sua imunogenicidade comparando a resposta imunológica específica induzida por imunização com: rRVGP, vacina contra raiva comercial, vírus rábico inativado e *Semliki Forest Vírus* portando RNA para a rRVGP (SFV-RVGP).

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer linhagens de células S2 para a expressão da rRVGP, com e sem cauda de histidina;
- Estabelecer protocolos de produção, armazenamento e purificação da rRVGP em células S2;
- Avaliar a imunogenicidade da rRVGP produzida em células S2 em comparação à outras formas de imunização contra a raiva (SFV-RVGP e vírus inativado).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A raiva, a vacina contra raiva e o panorama mundial

A raiva é uma encefalomielite viral que acomete os mamíferos. Como o vírus da raiva tem tropismo por neurônios, ele se propaga através do sistema nervoso central desenvolvendo uma inflamação progressiva e letal no cérebro e na medula espinhal. Os sintomas iniciais da raiva são febre e muitas vezes dor, formigamento, pontadas ou sensação queimação no local da ferida (parestesia). A doença pode se manifestar de duas formas, na raiva furiosa as pessoas infectadas podem apresentar hiperatividade, comportamento de excitação, hidrofobia e até aerofobia. Depois de alguns dias, a morte ocorre por parada cardiorrespiratória. A segunda forma de manifestação é a raiva paralítica, responsável por cerca de 30% dos casos de raiva em humanos. Nessa forma os músculos paralisam gradualmente, começando pelo local da mordida ou arranhão. O coma desenvolve-se lentamente ocorrendo morte. Muitas vezes essa forma não é diagnosticada aumentando os casos não relatados. Uma vez que os sintomas se manifestam praticamente não há mais a possibilidade de cura. Dos casos relatados, apenas três pessoas que apresentaram sintomas de infecção sobreviveram (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

O período de incubação em humanos, na maioria dos casos, é de um a três meses, mas pode variar de menos de uma semana até mais de um ano. Em cães a média é de 10 dias a dois meses. Após contato com animal com suspeita de raiva, a limpeza do ferimento, a administração de vacina e a administração do soro contra raiva (tratamentos pós-exposição), administrados em poucas horas, são medidas que podem prevenir a infecção (WHO, 2014).

A infecção ocorre através da mordida ou arranhão de um animal infectado. Cachorros ainda são os principais hospedeiros e transmissores da doença (aproximadamente 50000 casos de morte humana, relacionadas à infecção pelo vírus da raiva, na Ásia e na África, são causados por mordida de cachorro). Nas Américas o maior responsável pelos casos de morte por infecção com o vírus da raiva é o morcego, na Austrália e na Europa Ocidental morcegos infectados pelo vírus da raiva emergiram recentemente como um problema de saúde pública. Mortes em humanos derivadas de mordidas de raposas, guaxinins, gambás e outros carnívoros selvagens hospedeiros são raramente relatadas. A transmissão ainda pode acorrer através do contato entre saliva contaminada com a mucosa ou arranhões na pele. Contaminação através de mordida humana teoricamente pode ocorrer, mas não há relatos. Raramente pode ocorrer

transmissão através da inalação do vírus, transplante de órgão infectado ou consumo de carne crua infectada (WHO, 2014).

A raiva ainda é considerada uma doença negligenciada resultando em milhares de mortes e milhões de casos de exposição por ano no mundo. A doença ocorre em mais de 150 países e territórios, exceto na Antártica. Mais de 55 mil pessoas morrem de raiva por ano, principalmente na Ásia e na África (95% dos casos). Mais de ¾ da população humana corre risco de exposição ao vírus. Cinco bilhões de pessoas na Ásia e na África contemplam o grupo de alto risco de exposição à raiva canina (XIANG et al., 2014).

A vacinação preventiva é eficaz na prevenção da infecção, mas na maioria dos casos só é indicada às pessoas com alto risco de exposição (veterinários, pessoas que trabalham diretamente com animais silvestres e domésticos e na manipulação de cepas infecciosas). A vacina contra a raiva é classificada em três gerações. Na vacina de primeira geração é utilizado substrato animal para obtenção de massa viral, como tecido nervoso animal adulto (carneiros, cabras e coelhos), ovos embrionados e cérebro de animal lactente (camundongos, coelhos e ratos) e podem ser do tipo inativadas ou atenuadas (PÉREZ; PAOLAZZI, 1997). As vacinas de segunda geração são produzidas em culturas celulares como células VERO, células diploides humanas e células de embrião de galinha e apresentam-se na forma inativada. Atualmente, produz-se no Brasil, a vacina antirraiva em células Vero, livre de soro fetal bovino, o que reduz o risco de transmissão de zoonoses e príons. Todas as vacinas contra a raiva hoje existentes, de uso humano, são inativadas, ou seja, não apresentam vírus vivos. Porém as vacinas de cultivo celular são as que apresentam menos riscos de efeitos colaterais (WHO, 2014).

Há ainda vacinas de terceira geração, vacinas recombinantes, porém essas são utilizadas somente em animais para vacinação oral da fauna silvestre. Há uma vacina comercial constituída por vírus vaccinia vivo recombinante contendo o gene da glicoproteína do vírus da raiva da cepa ERA (*Evelyn Rokitnicki Abelseth*). Essa cepa é utilizada por apresentar mais propriedades antigênicas e ser mais segura em animais domésticos (LAWSON; CRAWLEY, 1972). Esses vírus, vaccínia, são empacotados em saches plásticos associados à farinha de peixe formando iscas (Raboral V-RG®, Merial, Maine, EUA). Essa vacina é utilizada nos EUA e alguns países da Europa para controle da raiva em coiotes e guaxinins e esta sendo utilizada sob licença experimental em raposas cinzentas. Há outra vacina oral constituída por adenovírus vivo recombinante (adenovírus humano tipo V) contendo o gene da glicoproteína também da cepa ERA (ONRAB®, Artemis Technologies, Guelph, Ontario, Canada). Essa vacina é apresentada em forma de blister plástico rodeado por

uma matriz de cera e gordura contendo cloridrato de tetraciclina. Essa vacina é usada experimentalmente pela CFIA (Agência de Inspeção de Alimentos do Canadá) para controle da raiva em gambás e guaxinins (FEHLNER-GARDINER et al., 2012; MAINGUY et al., 2013).

Além das duas vacinas de terceira geração em uso comercial, há diversos trabalhos que estudam a imunogenicidade das proteínas presentes no vírus da raiva, principalmente da glicoproteína, expressas *in vivo* através de vacinas de RNA e DNA e vacinação com proteína purificada produzidas a partir de células de inseto, plantas, mamíferos, leveduras e bactérias. Nas pesquisas realizadas com proteína recombinante vale ressaltar que, em todas as pesquisas onde foram realizados testes desafio (inoculação do vírus da raiva nos animais previamente imunizados), somente os animais imunizados com proteínas sintetizadas por células de animais mostraram sobrevivência superior a 50% (AMANN et al., 2013; ASTRAY et al., 2014; CENNA et al., 2008; ERTL et al., 1989; FU et al., 1991; GUPTA et al., 2005; HU et al., 2007; KLEPFER et al., 1993; KORAKA et al., 2014; LECOCQ et al., 1985; NIEDERHÄUSER et al., 2008; ROJAS-ANAYA et al., 2009; SAKAMOTO et al., 1999; TUCHIYA et al., 1992; WANG et al., 2012; WIKTOR et al., 1984; WU et al., 2014; XIANG et al., 2014).

É bem conhecido que os anticorpos neutralizantes constituem o principal mecanismo de defesa contra a raiva (COX; DIETZSCHOLD; SCHNEIDER, 1977; HOOPER et al., 1998; HU et al., 2007). Embora em alguns casos já tenha sido considerado que outros mecanismos podem ser também responsáveis pela proteção (FUJII et al., 1994), é maior consenso que os mecanismos não humorais estejam mais envolvidos na rapidez da resposta após a infecção viral (CENNA et al., 2008; JOHNSON; CUNNINGHAM; FOOKS, 2010; KAUR; RAI; BHATNAGAR, 2009). Nesse âmbito agentes imunizantes que ativam tanto resposta humoral quanto resposta celular são interessantes para conferir proteção e rapidez da resposta perante a uma infecção causada pelo vírus da raiva. Há pesquisas recentes que mostram o papel da pré ativação dos linfócitos T CD4 e CD8 frente a infecção pelo vírus da raiva. Animais previamente depletados para células CD4 e vacinados apresentaram porcentagem de sobrevivência de 33%, enquanto animais depletados para células CD8 apresentaram 56% de sobrevivência (a depleção de ambas as células resultou em 20% de sobrevivência) (AMANN et al., 2013). Os autores discutem que a presença das células T CD4+ durante a imunização é crucial para o desenvolvimento de uma resposta imunológica protetora contra um desafio com vírus da raiva e que, em menor escala, células T CD8+ também contribuem para sobrevivência frente ao desafio viral, porém a ausência das duas linhagens resulta na menor

taxa de sobrevivência, mostrando a importância da indução de ambos linfócitos contra uma infecção com o vírus da raiva. A remoção das células T-helper impede a estimulação de células B e consequentemente diminui a produção de anticorpos, resultando na diminuição da taxa de sobrevivência. Células T CD4 são importantes para desencadear e modular a resposta imunológica. Nesse mesmo trabalho também foram testados animais deficientes para células B, tanto esses animais quanto os não imunizados não sobreviveram ao desafio após imunização prévia, o autor discute a necessidade das células B (com consequente produção de anticorpos neutralizantes) para proteção efetiva contra infecção pelo vírus da raiva.

Mais de 15 milhões de pessoas recebem tratamento pós-exposição com vacinação e/ou soro hiperimune, prevenindo mais de 300.000 mortes (WHO, 2014). No sudeste da Ásia aproximadamente 20 milhões de pessoas são mordidas por cachorros por ano (e aproximadamente 1,5 milhões desses casos recebem o tratamento pós-exposição) (MESLIN; BRIGGS, 2013). Cerca de 40% das pessoas que são mordidas por animais suspeitos são crianças e adolescentes abaixo de 16 anos (grupo de risco) na Ásia e África (WHO, 2014). Alguns países da América Latina, Ásia e África ainda utilizam vacinas derivadas de tecido cerebral, que apresentam efeitos colaterais (WU; SMITH; RUPPRECHT, 2011).

As vacinas modernas, baseadas em cultura de células de mamíferos são eficazes, apresentam baixos efeitos colaterais, mas ainda apresentam um alto custo de produção e são requeridas múltiplas doses para alcançar uma resposta imune protetora (título acima de 0,5 UI/mL de anticorpos neutralizantes para o vírus da raiva) (RUPPRECHT et al., 2009).

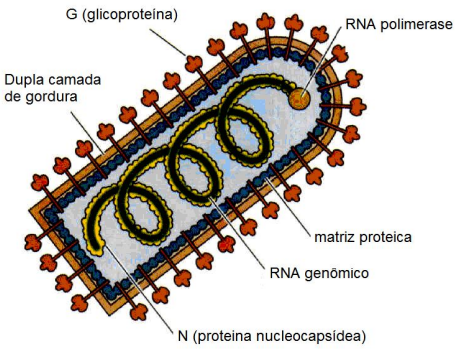
A maioria dos tratamentos contra a raiva são pós-exposição (vacinação ou administração de soro hiperimune). Um estudo conduzido na Tailândia, no ano de 2006, sugere que a inclusão de uma vacina de menor custo, capaz de induzir >0,5 UI/mL de anticorpos neutralizantes e memória imunológica, no calendário infantil seria economicamente viável quando comparado aos gastos com tratamentos pós-exposição (CHULASUGANDHA et al., 2006). Nos casos de exposição subsequentes, uma vez que as vacinas atuais apresentam boa memória imunológica, somente uma dose reforço seria necessária para o tratamento. Como a resposta no reforço é rápida não seria necessária imunização ativa. Nos países de alto risco a Organização Mundial de Saúde recomenda a vacinação contra à raiva em criança menores de 16 anos como tratamento preventivo (MALERCZYK et al., 2007; RAVISH, 2014; SUWANSRINON et al., 2006; WHO, 2014).

3.2 Vírus da raiva

O vírus da raiva pertence ao gênero *Lyssavirus*, família *Rhabidoviridae*, ordem *Mononegavirales*. O genótipo 1 do gênero *Lyssavirus*, RABV, apresenta distribuição mundial e foi o único já identificado no Brasil. Atualmente são descritos 20 membros do gênero *Lyssavirus* e são distribuídos pela Europa, África, Austrália, Ásia Central, Cáucaso e Sibéria (KING et al., 2011).

O vírus da raiva é envelopado, possui RNA negativo, apresenta 75 nm de diâmetro e de 100 a 300 nm de comprimento. É um vírus não-lítico, que não produz efeitos citopáticos, tendo tropismo por neurônios (DEBRÉ; CELLERS, 1971). O RNA genômico é transcrito em cinco RNAs mensageiros, os quais são traduzidos em proteínas (REGENMORTEL et al., 2000). As proteínas do nucleocapsídeo, que inclui a nucleoproteína "N", a fosfoproteína "P" e a proteína "L" (uma RNA-polimerase), formam o complexo ribonucleoproteico, e as proteínas do envelope viral (a matriz proteica ou proteína matriz "M" e a glicoproteína "G") envolvem a ribonucleoproteína, conforme a figura 1 (DEBRÉ; CELLERS, 1971).

Figura 1. Esquema do vírus da raiva.



Fonte: Debre e Cellers (1971).

Das cinco proteínas identificadas, duas são de especial importância para a proteção imunológica contra os lyssavirus: a nucleoproteína (N), que é uma proteína que apresenta uma pequena diversidade de sequência de aminoácidos entre os genótipos, e a glicoproteína (G).

A nucleoproteína (N) possui 450 aminoácidos, 58-62 kDa e é capaz de induzir a formação de anticorpos neutralizantes pelo sistema imunológico (apesar a glicoproteína ser imunodominante) (FU et al., 1991). Essa proteína participa da formação do capsídeo com a encapsidação do RNA genômico (MASATANI et al., 2010).

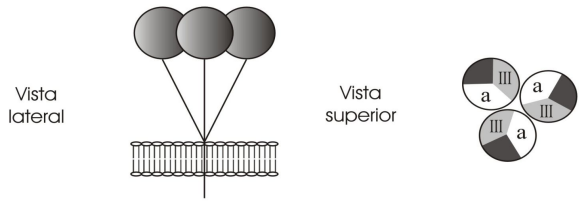
A fosfoproteína (P) (208 aminoácidos, 35-40 kDa) e a proteína L, RNA polimerase, (2128 aminoácidos, 190 kDa), juntamente com a proteína N, estão associadas ao complexo

ribonucleoproteico (RNP) e formam o complexo de polimerase viral. Essas duas proteínas (P e L) estão associadas à síntese do RNA genômico viral e alguns estudos associaram a proteína P a uma atividade antagonista de interferon durante a infecção viral, suprimindo a atividade antiviral no hospedeiro (KOSER et al., 2004; OSAKADA; CALLAWAY, 2013).

A proteína da matriz (M) (203 aminoácidos e 22-25 kDa) preenche o espaço entre o complexo RNP e o envelope. Promove a montagem da partícula viral e exerce papel no brotamento do vírus na membrana da célula do hospedeiro (KOSER et al., 2004; OKUMURA; HARTY, 2011).

A glicoproteína é uma proteína transmembrana que forma o envelope viral e é a única proteína exposta na superfície da partícula viral (DELAGNEAU; PERRIN; ATANASIU, 1981) (figura 2). Possui 505 aminoácidos, sendo 44 aminoácidos presentes no domínio citoplasmático, 22 aminoácidos no domínio transmembrânico e o restante no ectodomínio (439 aminoácidos), exposto como trímeros presentes na superfície viral (WOJCZYK et al., 2005), figura 2. Seu peso molecular é de aproximadamente 65 kDa, aproximadamente 195 kDa o trímero (GAUDIN et al., 1992; GUPTA et al., 2005). As cepas selvagens possuem um (Asn^{319}) ou dois (Asn^{37} e Asn^{319}) sítios de glicosilação (*sequons*), a maioria dois, enquanto cepas adaptadas à produção em laboratório podem apresentar, adicionalmente, sítios nas posições Asn^{158}, Asn^{204} e Asn^{247} (alterações relacionadas ao aumento da produção ou diminuição da patogenicidade, porém nenhum dado foi comprovado) (YAMADA et al., 2013). Não há dados descritos sobre O-glicosilação em nenhuma cepa do vírus da raiva (WOJCZYK et al., 1998).

Figura 2. Esquema da glicoproteína do vírus da raiva.



Fonte: Sissoeff et al. (2005).

A correta glicosilação do vírus da raiva é importante para expressão da proteína na membrana e também para manter sua função biológica (SHAKIN-ESHLEMAN et al., 1992; WOJCZYK et al., 1998, 2005), o que corrobora o fato de que a imunização com a glicoproteína, sintetizada em células que não realizam glicosilação complexa e microrganismos, não desenvolve formação de anticorpos neutralizantes frente a uma infecção

viral (aspecto apresentado no capítulo anterior). A glicoproteína induz a produção de anticorpos neutralizantes que protegem contra a infecção viral (PERRIN; THIBODEAU; SUREAU, 1985). É também responsável pela indução de linfócitos T citotóxicos tanto na infecção de animais com o vírus nativo quanto na vacinação por vírus inativado (FUJII et al., 1994).

A glicoproteína do vírus é a mediadora da adesão aos receptores celulares e também na entrada na célula hospedeira (através da fusão com a membrana do endossomo em pH ácido) (DIETZSCHOLD et al., 1983). A primeira fase da replicação viral é a adsorção do vírus com a célula do hospedeiro através dessa proteína. Inicialmente os trímeros interagem com os receptores celulares e levam à fusão e internalização do vírus e existe mais de um receptor ao qual a glicoproteína pode se ligar. Após adsorção, o vírus penetra na célula por endocitose mediada por clatrina ou macropinocitose. Uma vez internalizado por endocitose, o meio ácido do endossomo desencadeia mudanças conformacionais na glicoproteína, que conduzem à fusão das membranas virais e endossômicas e a subsequente liberação do genoma viral para o citosol (MIFUNE; OHUCHI; MANNEN, 1982; WHITE; MATLIN; HELENIUS, 1981).

Uma vez o complexo RNP no interior da célula do hospedeiro, o RNA de polaridade negativa, é transcrito pela RNA polimerase codificando um RNA molde e cinco RNAs mensageiros (RNAm). Estes, por sua vez, são traduzidos nas cinco proteínas virais. A glicoproteína é direcionada para o retículo endoplasmático e então é transportada para a membrana plasmática pelo complexo de Golgi (THOULOUZE et al., 1998). O genoma viral é também replicado para a formação dos novos vírus, inicialmente é feita uma fita molde com polaridade positiva de todo o genoma, as proteínas N, P e L promovem a encapsidação dos novos genomas. A proteína M envolve o complexo RNP e direciona para a membrana plasmática, em seguida as partículas ligam-se à membrana plasmática celular, que dará origem ao envelope viral no qual a glicoproteína está inserida. Os vírus saem da célula por brotamento (OKUMURA; HARTY, 2011).

3.3 Glicoproteína recombinante do vírus da raiva

A expressão do gene da glicoproteína tem sido estudada tanto em células eucarióticas com produção de proteína (BURGER et al., 1991; MCGARVEY et al., 1995) ou expressão *in vivo* (KIENY et al., 1984), quanto em procarióticas (LATHE et al., 1984). A proteína expressa em bactérias falhou na proteção de camundongos após desafio, provavelmente

porque a proteína não foi glicosilada, o que é fundamental para a sua atividade. Neste sentido, sistemas de expressão em células de mamíferos também foram testados. Morimoto, Kawai e Mifune (1992) construíram um vetor derivado de retrovírus contendo o gene da glicoproteína, expressando-a em células de neuroblastoma e BHK-21. Mochizuki et al. (1998) utilizaram HIV-1 (vírus da imunodeficiência humana) defectivo e também observaram produção da glicoproteína do vírus da raiva em células humanas HEK293-T (células embrionárias de rim humano).

Em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, Klepfer et al. (1993), expressaram a glicoproteína utilizando um vetor de expressão sob controle de um promotor indutível (metalotioneína) e um promotor constitutivo (triose desidrogenase). A glicoproteína foi glicosilada e associada à membrana das leveduras, porém extratos de levedura contendo a proteína protegeram animais em desafio intramuscular, mas não no desafio intracerebral de camundongos.

Chen et al. (2012) demonstraram através da construção de um baculovírus recombinante infectando células *Spodoptera frugiperda* (Sf9) com o gene da glicoproteína sob comando do promotor da poliedrina que a proteína expressa manteve as características estruturais e imunogênicas nessas culturas. Tuchiya et al. (1992), verificaram que a proteína produzida por baculovírus recombinante é capaz de se fundir formando complexos em condições de baixo pH. Assim, diferentes sistemas de expressão gênica podem ser mais uma alternativa barata e efetiva para produção de imunobiológicos para diagnósticos e/ou vacinas.

3.4 Expressão de proteínas recombinantes

A tecnologia do DNA recombinante, surgida no início dos anos 70, permitiu a adição de fragmento de ácido nucléico em um hospedeiro e a expressão posterior pelo hospedeiro das proteínas codificadas pelo fragmento introduzido. A produção de vacinas e proteínas farmacêuticas atraiu o interesse de pesquisadores e, com isso, obtiveram-se diferentes sistemas de expressão de vários genes heterólogos. Em geral, o gene de interesse é inserido em um plasmídeo e este é introduzido na célula, a qual se torna então capaz de transcrever o gene e assim gerar as proteínas de interesse (ALVES; CARRONDO; CRUZ, 2008; GREEN; SAMBROOK, 2012).

Duas formas de expressão de proteínas recombinantes em células são: transiente e estável. Na forma transiente, o DNA ou RNA se perde ao longo do cultivo celular, enquanto que o processo de obtenção de linhagens estáveis de expressão demanda períodos longos de

tempo e é bastante laborioso. Apesar disso, a possibilidade de integrar o DNA de interesse de forma estável no genoma celular, garante sua transcrição e tradução por longos períodos, reprodutibilidade do processo e expressão gênica definida. Os vetores empregados em células eucarióticas que se integram ao genoma celular são constituídos de uma completa unidade de transcrição e um marcador genético (genes que codificam enzimas capazes de conferir resistência a antibióticos ou outras drogas) que permite a seleção de células portadoras do DNA inserido. Esses vetores, uma vez construídos, devem ser introduzidos em células para expressar o gene heterólogo (GREEN; SAMBROOK, 2012).

Com relação à expressão transiente, os vetores virais comerciais ou em desenvolvimento se baseiam principalmente em adenovírus, retrovírus, lentivírus, herpesvírus, vírus vaccínia e baculovírus, que permitem a expressão heteróloga em células de mamíferos e em células de inseto (para os baculovirus). Esses sistemas têm vantagens e algumas limitações, como o tempo de expressão, linhagem celular que infectam e biossegurança (HENAO; CORTÉS; NAVAS, 2007).

3.5 Cultivo de células animais

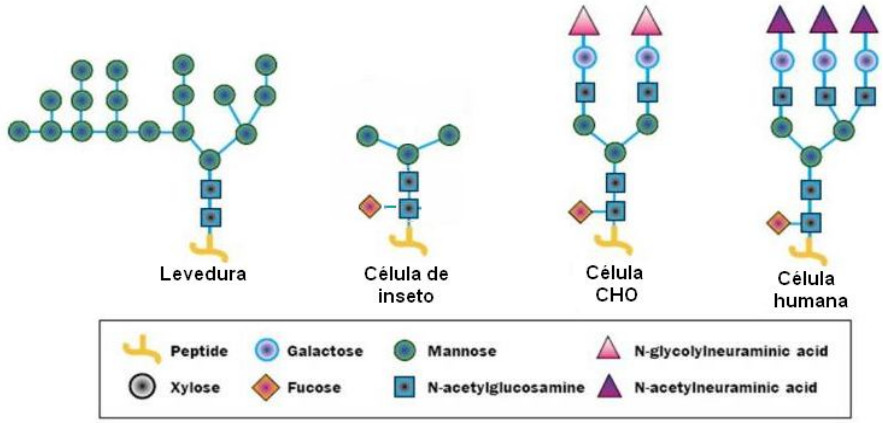
Culturas celulares são amplamente utilizadas pela indústria farmacêutica na produção de proteínas heterólogas para aplicação como fármacos, vacinas e reagentes para kits diagnósticos, através da utilização da biologia molecular. O uso dessa tecnologia se estende também a campos como: transplantes de órgãos, terapias celulares e gênicas, toxicologia, produção de biopesticidas e nanobiotecnologia (IVEY-HOYLE, 1991).

O aprimoramento das técnicas de cultivo permite hoje a propagação *in vitro* de diferentes tipos de células (insetos, humanos, roedores e outros animais). Antes o cultivo de células era proveniente de explante primário de tecidos. Basicamente a cultivo de células animais é semelhante àqueles utilizados para o crescimento de bactérias, fungos e leveduras, mesmo as células animais apresentando características diferentes dos microrganismos (crescimento mais lento, fragilidade mecânica, meios de cultura mais complexos e, às vezes, suporte para crescimento). O cultivo de células animais requer condições de assepsia mais rígidas, pois crescem mais lentamente que muitos contaminantes comuns, como bactérias e fungos (LEO et al., 2008).

Apesar das muitas vantagens da expressão de proteínas em bactérias e leveduras, as proteínas para fins terapêuticos humanos, que requerem modificações pós-traducionais, devem ser corretamente processadas de modo a garantir sua bioatividade. Para

desempenharem corretamente sua atividade biológica algumas proteínas necessitam de modificações pós-traducionais, como acetilação, oligomerização, glicosilação, fosforilação. Com isso, o uso de células animais têm se tornado cada vez mais comum, por apresentarem modificações pós-traducionais mais complexas (PFEIFER, 1998). Abaixo esquema dos diferentes padrões de glicosilação em diferentes células.

Figura 3. Esquema do padrão de glicosilação em diferentes tipos de células.



Adaptado de Varki et al. (2009).

Células de insetos e células de mamíferos apresentam várias similaridades e algumas diferenças com relação ao cultivo. Como células de insetos originam-se de tecidos de órgãos específicos ou embrionários não diferenciados, a mesma linhagem celular pode crescer tanto em suspensão quanto em monocamada. Já a maioria das linhagens de células de mamífero não transformadas crescem exclusivamente aderidas. Ambas requerem assepsia rigorosa durante as transferências celulares, inoculação e propagação em biorreatores. Células de mamífero crescem em temperaturas próximas a 37 °C e a maioria das linhagens necessita de atmosfera de CO_2, já as células de inseto não necessitam de atmosfera de CO_2 e crescem em temperaturas entre 20 e 30 °C (SHIN; CHA, 2002; SHIN; LIM; CHA, 2003).

Células de inseto vêm sendo comumente utilizadas para expressão de proteínas recombinantes por: serem capazes de realizar modificações pós-traducionais, possuir habilidade de expressar altos níveis de proteína exógena e elevada velocidade de crescimento em cultura, apesar de apresentarem limitações nas estruturas de N-glicanos incorporadas às proteínas (RENDIC; WILSON; PASCHINGER, 2008). As células de inseto podem adicionar precursores aos sítios apropriados em um polipeptídeo e também possuem enzimas necessárias (ManI, GnTI e ManII) para modificar oligossacarídeos, a N-acetilglicosamina

(GlcNAc) (BUTLER, 2008). No entanto o processamento estrutural posterior à formação do oligossacarídeo central ($Man_3GlcNAc_2$) é limitado. As enzimas glicosiltransferases ou estão ausentes ou estão em baixo nível de atividade, tornando esse sistema incapaz de sintetizar N-glicanos complexos contendo acido siálico e estruturas tri ou tetra-antenárias. Porém existem estudos que utilizaram manipulação genética em células de inseto para melhorar a maquinaria de glicosilação (BUTLER, 2008; GEISLER; JARVIS, 2009). Outra característica referente às modificações pós-traducionais é que células de inseto apresentam alto teor de manose (CHANG et al., 2003).

A presença da enzima α-1-3-fucosiltransferase em células de inseto é outra diferença associada à produção de proteínas por esse vetor (adição de fucose à proteína). A presença da fucose pode ser reconhecida como antígeno pelo sistema imune de mamíferos (GEISLER; JARVIS, 2009).

Ainda com relação às células de inseto, células de *Spodoptera frugiperda* (Sf) e *Trichoplusia ni* (BTI-TN-5BI-4 ou High-Five™, Life Technologies, Carlsbad, California, EUA) são linhagens utilizadas principalmente para produzir proteínas heteróloga através de infecção por baculovirus recombinante (expressão transiente). Um exemplo de um produto obtido através do sistema de expressão por baculovirus recombinante infectando células High-Five™ e licenciado pelo FDA (em 2010) é o Cervarix® (Glaxo Smith Kline Rixensart, Bélgica), que é uma vacina bivalente preventiva para o câncer do colo do útero que contém proteínas de cepas do papilomavírus humano, consideradas como alto risco para os casos de câncer. Essas glicoproteínas são expressas em VLPs (*vírus like particles*) (VAN DEN BERGH et al., 2014). O medicamento FluBlok® (Protein Sciences Co., Meriden, Connecticut, EUA) que é uma vacina contra o vírus influenza (sistema de baculovirus recombinante infectando células Sf9 e produzindo proteínas heterólogas) também foi aprovado pelo FDA em 2013 (HICKEY et al., 2014). Embora muito eficaz, o sistema de expressão com baculovirus é transiente e pode ser inconveniente para produção em larga escala (MORAES et al., 2012).

3.6 Células de *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2)

O sistema de expressão de proteínas recombinantes baseado na utilização de células de *Drosophila melanogaster* vem sendo cada vez mais utilizado (MORAES et al., 2012). Há cerca de 94 linhagens de células de *Drosophila melanogaster* independentemente cultivadas, das quais 12, aproximadamente, têm sido mais facilmente manipuladas. Para a expressão de

genes heterólogos, duas linhagens de células *Schneider* (S) têm sido bastante utilizadas, as linhagens S2 e S3 (CHERBAS; MOSS; CHERBAS, 1994). Ambas constituem células semi-aderentes derivadas de uma população de moscas *Drosophila melanogaster* em estágio embrionário tardio. A linhagem S2 foi estabelecida em 1969 por *Schneider*, a partir de centenas de embriões com 20 a 24 horas de vida (FRESHNEY, 1992). Essa linhagem pode ser modificada geneticamente e é capaz de expressar proteínas heterólogas de modo estável, sendo facilmente adaptável ao crescimento em suspensão, atingindo altas concentrações, permitindo seu uso em culturas contínuas e facilidade no aumento de escala (GALESI et al., 2008; VENTINI et al., 2010; VIEIRA et al., 2014). Além disso, essas células podem ser transfectadas com promotores indutíveis, que permitem protocolos de bioprocessos com alto rendimento para produção de proteínas recombinantes (LEMOS et al., 2009; MORAES et al., 2012; VENTINI et al., 2010).

O sistema de expressão *Drosophila* (DES®) consiste em vetores de expressão e seleção de células S2 e foi estabelecido nos anos 90 pela empresa Invitrogen (Carlsbad, Califórnia, EUA). Os vetores contêm os elementos necessários para amplificação em bactéria e para a expressão do gene de interesse em células S2, devendo ser integrados ao genoma da célula hospedeira para que ocorra a replicação do cDNA heterólogo e expressão da proteína pela maquinaria celular. Esse sistema combina as vantagens dos sistemas de expressão de células de mamíferos e baculovirus permitindo complexas modificações pós-traducionais, alta densidade celular para o crescimento em suspensão e condições de cultura com baixo custo (IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003; IVEY-HOYLE, 1991).

Uma característica importante das células de inseto S2 é a possibilidade de integração de mais de 1000 cópias do vetor de expressão no genoma celular. Além disso, o vetor pode ser construído gerando possibilidade de expressão e seleção em apenas um evento, não sendo necessário um longo período para amplificação do plasmídeo e seleção das células clonadas para estabelecer uma linhagem celular com altos níveis de expressão do gene introduzido (DEML; WOLF; WAGNER, 1999). Porém, pelo fato das células S2 não crescerem em baixas densidades, de certa forma há uma limitação quanto a seleção de um clone recombinante ou até mesmo uma população recombinante, devido a esse fato foram reportados estudos para melhorar a performance da expressão da proteína recombinante (DOS SANTOS et al., 2009; GALESI et al., 2008; JORGE et al., 2008; LEMOS et al., 2009; VENTINI et al., 2010). Provavelmente os altos níveis de expressão de proteínas já atingidos e reportados na literatura se devem ao uso de promotores fortes e alto número de cópias de plasmídeos integrados ao genoma (BUCKINGHAM et al., 1996; LEMOS et al., 2009; MCCARROLL; KING, 1997).

Células S2 podem ser transfectadas estavelmente usando uma série de plasmídeos contendo promotores constitutivos ou indutíveis. Os vetores mais usados contém o promotor constitutivo do gene da Actina 5C (pAc5) ou o promotor indutível da metalotioneína (pMT, preferido para expressão de proteínas de membrana) ambos de drosófilas (BRILLET et al., 2008). Desta forma, esse sistema combina várias vantagens fisiológicas para bioprocessos, que fazem dele uma ferramenta com grande potencial para a produção de proteínas dentro de uma variedade de aplicações, incluindo a caracterização funcional, perfil farmacológico, simulações moleculares, análises estruturais, ou geração de vacinas. Isto, inclusive, motivou uma edição especial da revista *Cytotechnology* sobre expressão de genes heterólogos em *Drosophila melanogaster* publicada em Maio 2008 (Cytotechnology, 2008).

A linhagem de células S2 apresenta ainda vantagens com relação à velocidade específica de crescimento, apresentando o máximo de 1,20 dia^{-1}, enquanto uma linhagem com células CHO recombinante apresenta um máximo de 0,60 dia^{-1} (VENTINI et al., 2010, 2011) e concentração celular máxima entre 3 – $5x10^7$ cel/mL (BATISTA et al., 2011; PAMBOUKIAN et al., 2008; VENTINI et al., 2010).

Com relação à expressão de proteínas recombinantes pelo sistema células S2, algumas moléculas foram expressas por essas células como, por exemplo, IL-2 humana recombinante, com expressão de 2,3 µg/mL (SHIN; LIM; CHA, 2003), proteína do envelope do vírus da dengue (CLEMENTS et al., 2010), proteína gp120 do HIV (IVEY-HOYLE et al., 1991), sub-unidades de FSH e LH recombinantes (ZMORA et al., 2007). Em todos os casos, a proteína heteróloga foi expressa com bons níveis de rendimento e correta bioatividade. Talvez o estudo mais completo envolvendo o sistema S2 seja a expressão da glicoproteína recombinante do vírus da raiva – cepa *Pasteur* (rRVGP) (ASTRAY et al., 2008; BATISTA et al., 2011; BOVO et al., 2008; DOS SANTOS et al., 2009; GALESI et al., 2008; LEMOS et al., 2009; SWIECH et al., 2008a, 2008b, 2008c; VENTINI et al., 2010; YOKOMIZO et al., 2007). Essa proteína pode ser empregada como componente de vacina ou kit de detecção para a raiva (MORAES et al., 2012) e sua expressão atingiu o máximo de 3 mg/L, 2 µg/10^7 células, em biorreator (VENTINI et al., 2010).

A expressão de proteínas recombinantes heterólogas em células S2 apresenta vantagens quanto ao uso de células de mamíferos em termos de escalonamento e custo de produção. Para que seja alcançado altos rendimentos se faz necessário culturas com alta velocidade de crescimento, o que é mais fácil de alcançar com a linhagem de células S2 do que com linhagens de células de mamíferos transfectadas e comercialmente utilizadas na indústria e adaptadas ao crescimento em suspensão. Para que se atinja altos níveis de

expressão de proteínas heteróloga no sistema S2, e com bioatividade, a escolha de vetores apropriados, condições de cultivo adequadas para o crescimento e expressão, controle e monitoramento dos bioprocessos, são essenciais (MORAES et al., 2012).

3.7 Semliki Forest Virus (SFV)

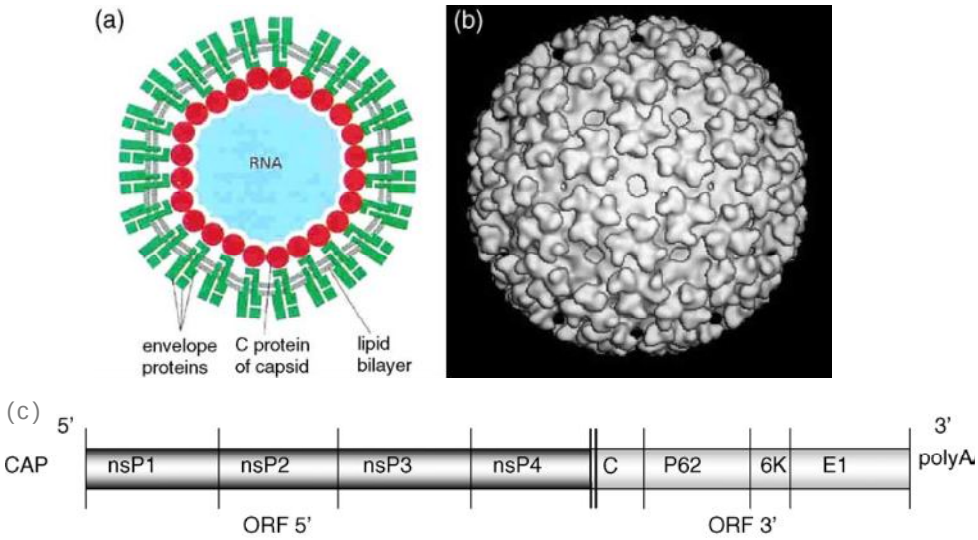
O sistema de expressão utilizando o *Semliki Forest Virus* (SFV) tem sido utilizado para a expressão de moléculas de interesse biotecnológico *in vitro*, e moléculas de interesse médico *in vivo* (NÚÑEZ et al., 2013; RIEZEBOS-BRILMAN et al., 2006). Caracterizado por infectar uma ampla diversidade de células, notadamente as células de mamíferos, o SFV tem sido proposto como sendo um promissor vetor vacinal (RIEZEBOS-BRILMAN et al., 2006). No entanto, pouco ainda está descrito sobre suas propriedades imunológicas e adjuvantes. Nosso grupo no Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan desenvolveu um estudo com SFV recombinantes expressando a RVGP (SFV-RVGP) (BENMAAMAR et al., 2009). Essas partículas carregam a informação genética da glicoproteína do vírus da raiva – cepa *Pasteur* (RVGP).

Vetores virais derivados do SFV podem ter uma ampla gama aplicações, além de apresentar altos níveis de expressão de proteínas em diferentes linhagens celulares. Eles são utilizados em terapia gênica como veículo para a entrega de genes específicos *in vivo*, principalmente na terapia contra o câncer, onde é necessária uma expressão em curto prazo. A sua aplicação em produção de vacinas profiláticas ou terapêuticas, é uma outra linha de pesquisa em desenvolvimento, onde são demonstradas respostas imunes significativas contra doenças virais e tumores (HENAO; CORTÉS; NAVAS, 2007), ativando tanto resposta imune celular quanto resposta imune humoral (RIEZEBOS-BRILMAN et al., 2006).

As características que tornaram os alfavírus candidatos no desenvolvimento de vetores virais são: infecção de várias linhagens celulares, infecção eficiente de células eucariontes (indispensáveis para as modificações pós-traducionais da proteína de interesse), capacidade de produzir altos níveis de proteína utilizando a maquinaria celular quase ao seu favor, replicação do RNA no citoplasma, capacidade de clonagem do genoma, efeito citopático tardio (72 – 96 horas), replicação defectiva, após a infecção a célula infectada morre por apoptose resultando em corpos apoptóticos contendo altos níveis da proteína de interesse, o que pode ser benéfico para a indução de resposta imune via *cross-priming* (COLMENERO et al., 2001; HUCKRIEDE et al., 2004; LUNDSTROM et al., 1999).

O SFV é um vírus do gênero *Alphavirus* pertencente à família *Togaviridae* e é capaz de se replicar em células de vertebrados e invertebrados. Os alfavírus Sinbdis e SFV são amplamente conhecidos como modelo de estudo em biologia celular e molecular. Ambos são considerados como excelentes sistemas de expressão devido a seu genoma se auto amplificar e só requerer a maquinaria traducional da célula do hospedeiro para se replicar (HENAO; CORTÉS; NAVAS, 2007). Os SFVs são partículas esféricas, medindo 65-70 nm de diâmetro. Possuem RNA positivo de fita simples não segmentado, que funciona como RNA mensageiro. Essa fita de RNA positivo é encapsidada (somente uma por vírus) por um único tipo de proteína, a proteína da cápside - C, arranjada em configuração icosahédrica formando o nucleocapsídeo (com 240 proteínas). O nucleocapsídeo é envelopado por uma camada bilipídica, derivada da membrana plasmática da célula hospedeira, com as glicoproteínas E1, E2 e E3 ancoradas nessa membrana, formando 80 heterotrímeros em formato de espícula, e essas proteínas interagem com a proteína C do capsídeo (HENAO; CORTÉS; NAVAS, 2007; VÉNIEN-BRYAN; FULLER, 1994).

Figura 4. Estrutura e genoma do SFV.



(a) Nucleocapsídeo (RNA e cápside) envolto pelo envelope formado pela camada bilipídica e espículas virais projetadas para a superfície do vírus. (b) Espículas virais reproduzidas por crio-eletromicroscopia. (c) Genoma do SFV: a primeira ORF codifica as proteínas não estruturais que formam o complexo replicase e a segunda codifica as proteínas estruturais. Fonte: Alberts et al. (1994) e Riezebos-Brilman et al. (2006).

O SFV possui dois quadros abertos de leitura (ORF – *open reading frames*) e seu genoma codifica 9 proteínas (quatro não estruturais, nsP1 - 4, e cinco estruturais, cápside, p62 – E2 e E3, 6K e E1). O primeiro quadro codifica as proteínas não estruturais que formam o complexo replicase (nsP 1-4). O segundo quadro codifica as proteínas estruturais: proteína do

capsídeo e as proteínas do envelope viral E2 e E3 (precursor P62), 6K e E1. O fato do RNA genômico do alfavírus conter características típicas do RNAm da célula do hospedeiro, como 5'CAP e a cauda de poliadenosina, faz com que ele seja considerado um RNAm bicistrônico contendo duas ORFs (HENAO; CORTÉS; NAVAS, 2007; RIEZEBOS-BRILMAN et al., 2006).

O processo de infecção do alfavírus se inicia com a ligação das proteínas do envelope viral (E2) com as proteínas de superfície da célula, que atuam como receptor na membrana plasmática da célula do hospedeiro. Após a ligação, o vírus invade a célula por endocitose mediada por clatrina e é transportado para endossomos. O pH ácido endossomal promove a fusão das espículas virais do envelope (E1) com as membranas do endossoma. Em seguida, o nucleocapsídeo é liberado no citosol onde é desfeito liberando o genoma viral no citoplasma (LILJESTRÖM; GAROFF, 2001; WAHLBERG et al., 1992).

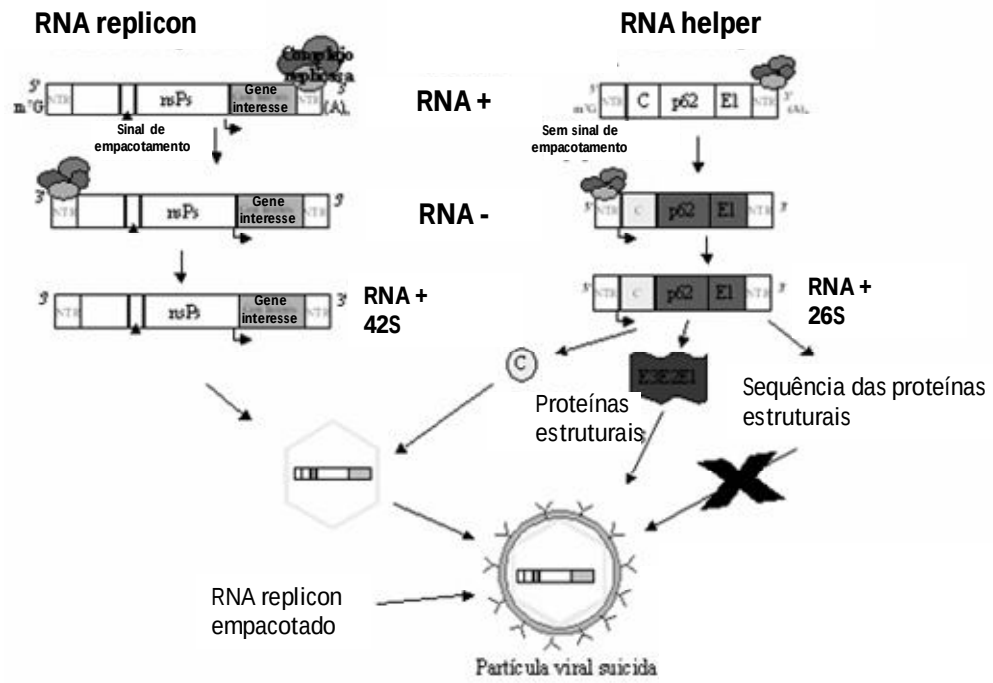
No citoplasma, o RNA genômico do SFV serve como um RNAm, iniciando-se a tradução da primeira ORF (2/3 do RNA viral) e gerando assim uma poliproteína que posteriormente é clivada em 4 proteínas não estruturais (NsP 1-4), essas proteínas formam o complexo replicase (Rep). Este complexo tem a função de iniciar a replicação de fitas completas de RNA negativo, estas fitas antissenso servem de molde para gerar múltiplas copias de RNA positivo do genoma completo (42S), assim como permitem a síntese do RNA sub-genômico (26S), que corresponde ao último terço do genoma e contem a sequencia das proteínas estruturais. As proteínas estruturais são geradas a partir do promotor 26S localizado imediatamente antes do gene das proteínas estruturais, pela Rep. O RNA 26S é traduzido para produzir uma poliproteína estrutural precursora (C-p62-6K-E1), que é clivada co-traducionalmente pela função de protease da proteína C, gerando a proteína C (capsídeo) e o complexo das glicoproteínas do envelope viral (p62, 6K e E1). A proteína C reconhece um sinal de encapsidação que esta na região codificadora para nsP2 e junto com o RNA positivo completo (42S) forma o nucleocapsídeo (KUJALA et al., 2001; LOPEZ et al., 1994; LU; KIELIAN, 2000; QUETGLAS et al., 2010; SKOGING et al., 1996; SUOMALAINEN; LILJESTRÖM; GAROFF, 1992; ZHAO; GAROFF, 1992).

Ao mesmo tempo, o complexo (p62, 6K e E1) é translocado co-traducionalmente ao retículo endoplasmático rugoso e as glicoproteínas são dirigidas à membrana plasmática pelo complexo de Golgi, onde a p62 é clivada em sua forma madura E2 e E3 no golgi tardio. A interação da proteína C do nucleocapsídeo com a cauda da E2 forma uma espícula contendo as proteínas do envelope na camada lipídica da célula do hospedeiro e finalmente a partícula viral é liberada no meio extracelular. A agregação das proteínas do envelope excluem as

proteínas de membrana da célula do hospedeiro (KUJALA et al., 2001; LOPEZ et al., 1994; LU; KIELIAN, 2000; QUETGLAS et al., 2010; SKOGING et al., 1996; SUOMALAINEN; LILJESTRÖM; GAROFF, 1992; ZHAO; GAROFF, 1992).

Para a produção de proteínas heterólogas utilizando o vetor SFV, utiliza-se dois plasmídeos sub-clonados a partir do cDNA do genoma do SFV. O primeiro é o vetor de replicação, que contém o gene das proteínas não estruturais, o sinal de encapsidação e no lugar do gene das proteínas estruturais é inserido o gene de interesse, conservando o promotor sub-genômico 26S, que permite a alta expressão da proteína heteróloga. O segundo plasmídeo contém somente o gene das proteínas estruturais. Para a produção das partículas virais, o vetores são transcritos *in vitro* e são co-transfectados por eletroporação ou lipofecção em células de mamíferos *in vitro*. Desse modo somente o RNA recombinante é encapsidado na partícula viral gerada, o que na prática faz com que essas partículas sejam infecciosas e não replicativas (figura 5). A expressão é transiente e as células infectadas entram em morte por apoptose. O RNA auxiliar oferece a biossegurança de que partículas virais formadas não possuem o RNA que codificam as proteínas estruturais e essas partículas recombinantes de SFV são chamadas de "suicidas". Todo esse processo resulta na formação de aproximadamente 10^9 a 10^{10} partículas infecciosas por mililitro (LILJESTRÖM; GAROFF, 1991).

Figura 5. Representação esquemática da produção do SFV recombinante.



Adaptado de Henao, Cortes e Navas (2007).

Posteriormente, visando aumentar a segurança do sistema, a proteína de envelope viral E2 foi mutada, apresentando capacidade limitada de infecção, de forma que o vírus apenas pode realizar a fusão com a membrana plasmática da célula quando previamente tratado com α-quimiotripsina. Como a α-quimiotripsina é tóxica para as células, precisa ser inativada com aprotinina (BERGLUND et al., 1993). Mais recentemente, foi desenvolvido um sistema SFV que não necessita de ativação enzimática, porém apresenta sensibilidade à temperatura como método de contenção (LUNDSTROM et al., 2003). Há também um sistema que utiliza dois plasmídeos *helpers*, um que contém o gene da proteína C e o outro das glicoproteínas virais (SMERDOU; LILJESTRÖM, 1999).

Quando utilizados para a imunização, os SFV recombinantes, contento o replicon, são injetados no hospedeiro, infectam suas células, liberam o material genético e produzem a proteína de interesse (ASTRAY et al., 2014; LUNDSTROM, 2014).

Ainda que os vetores baseados em SFV tenham uma ampla gama de aplicações, eles possuem algumas características que, até certo ponto, limitam o seu uso. Os níveis extremamente altos de expressão gênica obtidos pelo SFV não são compatíveis com os níveis fisiológicos, além de que a alta toxicidade dos vetores para as células hospedeiras pode limitar a expressão de proteínas repórteres devido a indução de apoptose pela replicação viral. Esse efeito limita os estudos sobre a cinética de expressão e as vias de transdução de sinal envolvidas (LUNDSTROM et al., 1999). Outro fator limitante ao uso do SFV é a transcrição *in vitro* extremamente cara e que requer condições especiais na sua metodologia. Frente a esse ponto foram desenvolvidos vetores de DNA para transcrição *in vivo* chamados de pSCA, que utilizando o promotor do citomegalovírus (CMV) dependente de RNA polimerase II, que conduzem a transcrição *in vivo* a partir do vetor cDNA (DICIOMMO; BREMNER, 1998).

Normalmente os alfavírus são transmitidos de mosquitos para vertebrados, e de volta para o mosquito. Em células de vertebrados, a infecção viral resulta em um *shut-off* do RNAm do hospedeiro e assume o controle da maquinaria de tradução da célula para RNAm virais, resultando elevados títulos virais e, eventualmente, morte celular por apoptose. Nas células do mosquito a replicação viral é mais lenta e frequentemente tem mínimos efeitos na célula. Uma infecção por SFV em humanos resulta desde uma infecção assintomática à presença de febre, por essa característica os alfavírus não são patógenos importantes para seres humanos e sua incidência é muito baixa (RIEZEBOS-BRILMAN et al., 2006).

A tabela a seguir mostra algumas pesquisas que utilizaram o vetor SFV para imunização.

Tabela 1. Estudos de imunização com o vetor SFV.

Antígeno	Modelo animal	Resposta immune	Referência
Chikungunya atenuado	Teste clínico Fase II	Celular	(EDELMAN et al., 2000)
gB e pp65/1E1 CMV	Teste clinico Fase I	Humoral e celular	(BERNSTEIN et al., 2009)
gp160 HIV	Primata	Humoral	(BERGLUND et al., 1997)
HIV sub-tipo A	Camundongo	Celular	(HANKE et al., 2003)
HIV sub-tipo C	Camundongo	Celular e humoral	(SUNDBÄCK et al., 2005)
PrME/NS1 LIV	Camundongo	Humoral e celular	(FLEETON et al., 2000)
PrM/EV MVE	Camundongo	Humoral	(COLOMBAGE et al., 1998)
HA/NP influenza	Camundongo	Humoral e celular	(BERGLUND et al., 1999)
NP influenza	Camundongo	Humoral e celular	(VIGNUZZI et al., 2001)
NS3 HCV	Camundongo	Celular	(BRINSTER et al., 2002)
NS3 HCV	Primata	Celular	(ROLLIER et al., 2005)
rRVGP	Camundongo	Humoral e celular	(ASTRAY et al., 2014)

Abreviações: CMV: citomegalovírus; HIV: vírus da imunodeficiência humana; LIV: Louping ill virus (vírus da encefalomielite ovina); MVE: vírus da encefalite de Murray Valley; NP: nucleoproteína; HA: hemaglutinina; HCV: vírus da hepatite C; rRVGP: glicoproteína recombinante do vírus da raiva – cepa Pasteur.

3.8 Purificação

No processo de produção de uma proteína recombinante, a purificação representa uma das etapas mais complexas e de maior custo. Sua eficiência e consistência são de crucial importância para a qualidade do produto final. Estratégias de purificação efetivas e econômicas devem ser programadas de tal forma que a estrutura e a função da proteína recombinante (atividade biológica) não se alterem e que seja obtido um alto rendimento e grau de pureza (EVANGELISTA DYR; SUTTNAR, 1997; JUNGBAUER; BOSCHETTI, 1994; LESER; ASENJO, 1992; VÁSQUEZ-ALVAREZ; LIENQUEO; PINTO, 2001).

Frequentemente, no processamento de bioprodutos obtidos por cultivos de células animais, o produto de interesse é secretado, apresentando-se de forma adequada à aplicação em equipamentos de purificação após a remoção de células por técnicas de separação sólido-líquido. Porém o produto de interesse pode estar localizado intracelularmente, o que implica

na liberação simultânea de um número considerável de contaminantes intracelulares, além do aumento da viscosidade e da atividade proteolítica no material durante a extração, o que pode tornar a manipulação da amostra mais difícil (MORAES; CASTILHO; BUENO, 2008).

Para o processamento de células animais, que não dispõem de parede celular, as técnicas mais utilizadas para rompimento são as classificadas em suaves e moderadas. As suaves compreendem em lise celular por digestão enzimática, solubilização química ou autólise, uso de homogeneizador manual e de trituradores, já as moderadas envolvem o uso de homogeneizadores de facas e trituração com abrasivos. Em alguns casos a proteína desejada está ligada a membranas ou partículas (a rRVGP estudada nesse trabalho é expressa na membrana celular), ou está agregada, devido ao seu caráter hidrofóbico. Nesses casos faz-se necessário o uso de detergentes na etapa de rompimento e extração celular, a fim de reduzir as interações em todas as etapas do processo de purificação. A ação do detergente é dependente de pH, temperatura e concentração (concentração micelar crítica), essas características são essenciais para evitar a desnaturação ou a desativação da biomolécula de interesse. Proteases também constituem uma ameaça à estabilidade proteica. Uma estratégia simples para proteção contra a degradação proteolítica é a manipulação rápida e em baixas temperaturas. Uma precaução adicional é a adição de inibidores de proteases, principalmente nas etapas de rompimento celular e extração (MORAES; CASTILHO; BUENO, 2008).

A estrutura dos compostos conhecidos como anfifílicos, detergentes ou tensoativos consiste de uma parte hidrofílica unida a uma parte hidrofóbica. Os detergentes são classificados, de acordo com o segmento hidrofílico, em catiônicos, não-iônicos e zwiteriônicos ou anfóteros. A medida em que se eleva a concentração de tensoativo na solução, as moléculas de detergente começam a se auto-agregar para formar estruturas conhecidos como micelas (TANFORD et al., 1974). Dependendo da polaridade, a molécula pode solubilizar no interior micelar, na região superficial ou orientar-se como os monômeros do detergente, nos casos de moléculas anfifílicas (SEPULVEDA; LISSI; QUINA, 1986).

Um dos métodos comumente utilizados para purificação, levando em conta a especificidade de interação com ligantes, é a cromatografia de afinidade. A cromatografia de afinidade é um método de adsorção que explora o reconhecimento entre o ligante imobilizado em uma matriz sólida e a biomolécula a ser separada, com alta especificidade de interação entre as moléculas. Para a eluição das moléculas adsorvidas utiliza-se alteração das condições do meio (pH, força iônica) ou adição de contraligantes que apresentam maior afinidade pelo ligante ou pelo adsorvato (MORAES; CASTILHO; BUENO, 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

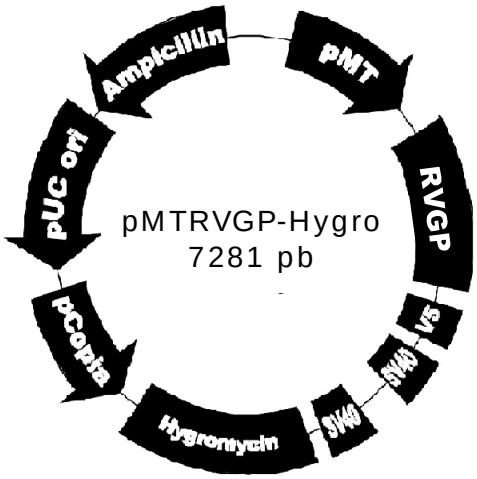
4.1 Preparação da rRVGP expressa em células S2

A denominação da glicoproteína do vírus da raiva como RVGP no nosso trabalho provém da abreviatura do inglês *Rabies Virus Glycoprotein - Pasteur strain* (glicoproteína do vírus da raiva – cepa Pasteur). E a denominação rRVGP, refere-se a glicoproteína recombinante (glicoproteína recombinante do vírus da raiva – cepa *Pasteur*). A cepa Pasteur, PV, é utilizada para preparações vacinais por ter distribuição mundial (KING et al., 2011).

4.1.1 *Estabelecimento da linhagem celular S2MtRVGP-H*

As células S2MtRVGP-H foram obtidas no Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan pela transfecção com um plasmídeo contendo o gene da RVGP (figura 6), promotor indutível da metalotioneína e gene de resistência à higromicina (LEMOS et al., 2009).

Figura 6. Mapa do vetor pMTRVGP-Hygro.



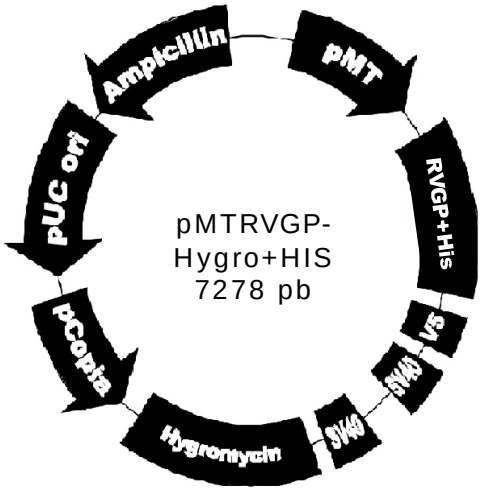
pMT corresponde ao promotor do gene da metalotioneína de drosófila, RVGP ao cDNA da glicoproteína do vírus da raiva, SV40 à seqüência de poli-adenilação do vírus SV40 e V5 ao epítopo da proteína V5. O gene que confere resistência a ampicilina (ampicillin) e a origem de replicação em bactérias (pUC ori) também estão presentes nesses vetores (adaptado de Lemos, 2009).

4.1.2 *Estabelecimento da linhagem celular S2MtRVGP-H-His*

As células S2MtRVGP-H-His foram obtidas pela transfecção de células S2 com um plasmídeo contendo o gene da RVGP (figura 7), cassete de resistência a higromicina,

promotor da metalotioneína e cauda de histidina (6 histidinas). As transfecções foram realizadas utilizando o lipossoma *Cellfectin Reagent* (Life Technologies): $5x10^6$ células S2 selvagens em frasco T-75 foram transfectadas com uma suspensão obtida após a diluição de 2 μg do vetor de expressão em 500 μL de meio SF-900 II SFM, seguida de mistura com 20 μL de *Cellfectin* e 480 μL de SF-900 III SFM (Life Technologies). Após 4 horas de incubação e agitação horizontal com a suspensão de transfecção, a cultura foi incubada por 48 horas a 28 °C com total de 10 mL de meio de cultura. A população celular foi selecionada com adição de 600 μg/mL de higromicina B no meio de cultura. Como controle da transfecção, também foi adicionado higromicina B (na mesma concentração) em uma cultura de células selvagens. Consideramos que o processo de seleção terminou quando todas as células da cultura selvagem estavam mortas, retirando assim a pressão seletiva da cultura modificada.

Figura 7. Mapa do vetor pMTRVGP-Hygro-His.



pMT corresponde ao promotor do gene da metalotioneína de drosófila, RVGP ao cDNA da glicoproteína do vírus da raiva, SV40 à seqüência de poli-adenilação do vírus SV40 e His ao cDNA da cauda de histidina. O gene que confere resistência a ampicilina (ampicillin) e a origem de replicação em bactérias (pUC ori) também estão presentes nesses vetores (Adaptado de Lemos, 2009).

4.1.3 *Cultivo de células S2MtRVGP-H e S2MtRVGP-H-His em biorreator de tanque agitado e manutenção celular*

Para manutenção celular, as células foram ressuspendidas gentilmente e uma alíquota ($5x10^5$ cels/mL) foi transferida para um novo frasco T25 (cultura estática), qsp 5 mL de meio de cultura SF-900 III e mantida à 28 °C. Para preparo do inóculo dos ensaios em biorreator as células cultivadas nos frascos T25 foram transferidas para frasco agitados com volume de

trabalho de 20 mL, inoculo de $5x10^5$ cels/mL, meio SF-900 III, mantidas em agitação rotacional a 100 rpm e temperatura de 28 °C. As culturas foram interrompidas entre 48 e 72 horas (fase exponencial de crescimento) e transferidas para o biorreator.

O desenvolvimento de bioprocessos com a linhagem S2MtRVGP-H foi iniciado durante o projeto de mestrado (VENTINI, 2010), em que foi estabelecido um protocolo de otimização de cultivo, cujos parâmetros para produção da rRVGP em biorreator de tanque agitado BioFlo (New Brunswick, Enfield, Connecticut, EUA) são: 1 L de volume de trabalho, inóculo inicial de $5x10^5$ cel/mL, agitação a 90 rpm, temperatura 28°C, oxigênio dissolvido em 10 % de saturação de ar, aeração por borbulhamento com mistura de N_2, O_2 e ar, vazão de 0,1 L/min, indução com 700µM de $CuSO_4$ em concentração de celular entre $3\text{-}5x10^6$ cel/mL (VENTINI et al., 2010). A produção de rRVGP com as células S2MtRVGP-H-His foi feita com o mesmo protocolo.

4.1.4 *Medida de viabilidade e densidade celular*

Para a análise de viabilidade e densidade de células foi utilizado o método de exclusão do corante azul de tripan, 0,3 M (Merck, Darmstadt, Alemanha), em hemacitômetro (DOYLE; GRIFFTHS, 1998).

4.1.5 *Quantificação da rRVGP produzida*

As amostras obtidas nos ensaios foram separadas em alíquotas de 10^6 células, centrifugadas a 1150 g por 3 minutos para separação das células e armazenadas a -20 °C, em pellet seco ou em solução de armazenamento com glicerol (descrita no item 4.1.7.1).

A rRVGP foi quantificada por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay), método de imunocaptura com placa sensibilizada por anticorpo monoclonal, seguindo a metodologia anteriormente padronizada (ASTRAY et al., 2008).

Como a rRVGP é sintetizada na membrana das células, as amostras foram submetidas a preparação com detergente Nonidet P-40 (0,2%) para que a proteína fosse solubilizada da membrana celular e permanecesse, na conformação trimérica, na micela do detergente. As placas foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal específico para o sítio III antigênico da RVGP em sua conformação trimérica (IgG-D1). O antígeno de referência (vírus da raiva, linhagem *Pasteur*, inativado, purificado, liofilizado, apresentado 10 µg de RVGP) é incubado, previamente diluído, com as amostras (duplicata) e controles negativos (células S2 selvagens).

Após incubação as placas receberam anticorpo monoclonal anti-glicoproteína conjugado com peroxidase (IgG-D1-Po) e após foi adicionado substrato cromógeno (tampão citrato + orto-phenylene diamine, 2 mg/mL). Após a adição do tampão de parada (ácido sulfúrico 4 N) a reação desenvolveu coloração alaranjada e a absorbância foi lida no comprimento de onda de 492 nm em leitor de microplacas (Multiskan MJ, Labsystemsm Helsink, Finlândia). Os cálculos para a obtenção da concentração de RVGP foram realizados através da comparação da absorbância das amostras com a curva de referência.

4.1.6 *Purificação da rRVGP*

4.1.6.1 Análise da rRVGP armazenada

As células S2MtRVGP-H cultivadas em biorreator foram armazenadas em Tampão de Congelamento. Essa solução contém 25 mM TRIS, 25 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM PMSF e 20% de glicerol. A conservação da rRVGP foi testada após 9 e 11 meses de armazenamento através da quantificação da rRVGP por ELISA e comparadas com a amostra sem congelamento.

4.1.6.2 Purificação da rRVGP produzida por células S2MtRVGP-H-His

As células S2MtRVGP-H-His cultivadas em biorreator, contendo a glicoproteína ancorada na membrana celular, foram submetidas a lise mecânica (rompimento das células com homogeneizador do tipo “Homogeneizador de Tecido”) em tampão de lise (25 mM TRIS, 25 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM PMSF), centrifugadas a 12500 g por 30 minutos e o *pellet* contendo os fragmentos de membrana, com a rRVGP ancorada, foram então submetidos a solubilização com tampão de solubilização (25 mM TRIS, 25 mM NaCl, 5 mM MgCl2) + 0,1% de detergente DDM (n-Dodecyl β-D-Maltopyranoside), ou 1% de CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate) ou 1% de OG (n-Octyl β-D-glucopyranoside). Após solubilização as amostras foram filtradas em membrana com porosidade de 0,45 µm.

A segunda etapa de purificação foi feita por Cromatografia Líquida (FPLC - *Fast Protein Liquid Chromatography*, Akta purifier, GE Healthcare, Uppsala, Suécia) pela metodologia de cromatografia de afinidade do tipo *Immobilized metal ion affinity chromatography* (IMAC) com coluna de níquel imobilizado *HisTrap FF Crude* 1 mL (GE Healthcare). A eluição foi feita em gradiente de Imidazol (100-500 mM).

4.1.6.3 Purificação da rRVGP produzida por células BHK-21 infectadas por SFV-RVGP

Células BHK-21 (*Baby Hamster kidney* - clone 21) foram cultivadas em frascos T-25, com meio α-MEM + 10% SFB (soro fetal bovino), 37 °C de temperatura, atmosfera de 5 % de CO_2 e infectadas com SFV-RVGP no Laboratório de Imunologia Viral. As células BHK-21, contendo a glicoproteína ancorada na membrana celular, foram submetidas a lise mecânica em tampão de lise, centrifugadas a 12500 g por 30 minutos e o *pellet* contendo os fragmentos de membrana com a rRVGP ancorada foram então submetidos a solubilização com tampão de solubilização + 0,1% de detergente DDM.

A segunda etapa de purificação foi feita por cromatografia de afinidade em coluna de resina de Níquel (Macherey-Nagel columns, Duren, Alemanha), com incubação da amostra por uma hora a 4 °C. A eluição foi feita em gradiente de Imidazol (100-500 mM).

4.1.6.4 Quantificação de proteínas totais por BCA

Para a dosagem de proteína total foi utilizado o kit *BCA – Protein Assay Kit* (Pierce Biotechnology, Rockford, EUA). Partindo da suspensão celular previamente homogeneizada e centrifugada, foram adicionados 10 µL da amostra ao reagente de reação. As amostras e o padrão diluído (0 – 250 µg/mL de albumina bovina – BSA) foram misturados ao reagente de detecção, incubados a 60 °C por 30 minutos e, após resfriamento a temperatura ambiente, as amostras foram lidas em espectrofotômetro de 562 nm. A concentração das amostras foi determinada através da curva padrão de BSA.

4.1.6.5 Imunodetecção das frações purificadas

Para verificar se a rRVGP foi purificada das amostras realizamos análises de *western-blotting, dot blotting* e SDS-PAGE das frações coletadas da purificação para verificar a presença dos monômeros da rRVGP no tamanho esperado.

Cada fração foi separada por eletroforese (SDS-PAGE 12%, tampão não redutor). Os géis foram corados por prata (Silver Steining Kit, Pierce Biotechnology) e/ou *PageBlue* (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituânia). A outra duplicata do gel foi transferida para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) em Tampão de Transferência (38 mM de glicina, 20% etanol, 0,1% de SDS e 48 mM de Tris-base) durante uma hora a 450 mA. A membrana foi incubada em agitação com anticorpo policlonal anti-glicoproteína do vírus da raiva 1:1000

e posteriormente incubada com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (1:4000) conjugado a peroxidase. A membrana foi revelada por quimioluminescência (ECL, Thermo Fisher Scientific). A membrana foi depositada em cassete fotográfico e exposta a filme fotográfico (X-OMAT AR, Kodak, Sigma-Aldrich, Colorado, EUA) por 30 segundos. O filme foi revelado em câmara escura com revelador fotográfico (GBX, Kodak).

Em paralelo, as frações também foram analisadas por *dot blotting* utilizando sistema de 96 amostras acoplado à bomba de vácuo (50 µL) ou aplicação da amostra direto na membrana de nitrocelulose (3-10 µL). Após, a membrana foi bloqueada e tratada com anticorpo primário (policlonal e monoclonal), anticorpo secundário e revelada de acordo com o procedimento de *western-blotting* já descrito. Para o *dot blotting* também foi utilizado anticorpo primário anti-histidina, na mesma diluição do anticorpo anti-glicoproteína do vírus da raiva.

4.2 Obtenção das partículas de SFV-RVGP e rRVGP de células BHK-21

As partículas virais de SFV recombinante contendo o RNA da RVGP foram obtidas previamente pelo Laboratório de Imunologia Viral conforme descrito por (BENMAAMAR et al., 2009). O cDNA correspondente ao genoma do SFV foi dividido em dois plasmídeos, um auxiliar contendo somente os genes que codificam as proteínas estruturais do vírus (*helper*) e outro contendo os genes das proteínas não estruturais, onde o gene das proteínas estruturais foi substituído pelo cDNA da RVGP obtido a partir do plasmídeo RVGP/PV. As partículas virais foram obtidas através da transfecção por eletroporação dos plasmídeos em células BHK-21.

A rRVGP sintetizada por células BHK-21 infectadas pelo SFV-RVGP foi produzida no Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan e cedida para estudos comparativos de imunogenicidade. Células BHK-21 foram infectadas com SFV-RVGP e após 48 horas de cultivo a cultura foi interrompida e as células, contendo a glicoproteína ancorada à membrana, foram armazenadas.

4.2.1 *Quantificação das partículas virais SFV-RVGP*

As partículas virais SFV-RVGP foram quantificadas por qRT-PCR através de um par de *primers* que amplificam uma região de 145 pares de base da região da proteína não

estrutural 1 (NS-1). Esse protocolo foi estabelecido no laboratório de Imunologia Viral por Puglia et al. (2013).

4.3 Análise da resposta imune de animais imunizados com rRVGP e SFV-RVGP

4.3.1 *Animais utilizados*

Camundongos fêmeas BALB/C com idade de 5 semanas e peso médio de 50 g foram obtidos do Biotério do Instituto Butantan. Os animais foram mantidos em condições padronizadas descritas no Manual prático sobre usos e cuidados éticos de animais de laboratório (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2010). Os protocolos de experimentação foram aprovados pela Comissão de Ética de Utilização de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) de maneira prévia à condução dos experimentos (protocolo 791/11, anexo).

4.3.2 *Protocolo de imunização*

Os animais foram imunizados via intraperitoneal com doses contendo:

- vacina comercial veterinária (Biovet S/A, Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil);
- vírus rábico inativado (cedido pelo Laboratório de Soros Hiperimunes do Instituto Butantan);
- rRVGP produzida por células S2 (ancorada na membrana de células íntegras, ancorada aos fragmentos de membrana, fragmentos de membranas aquecidos à 100 °C ou solubilizada com 0,2% de Nonidet P-40);
- rRVGP solubilizada produzida por células BHK-21 infectadas por SFV-RVGP;
- SFV-RVGP.

Como controles negativos foram utilizados para imunização: solução salina, SFV-RVGP inativado com luz ultravioleta (uv.), SFV-GFP, células S2 selvagem.

Nos grupos contendo vacina, vírus da raiva, rRVGP proveniente de células S2 e BHK-21 foram injetados 1 µg de rRVGP/dose.

Nos grupos SFV-RVGP foram utilizadas três quantidades de vírus: $8,3x10^6$ partículas por dose (que foram capazes de infectar $2x10^6$ células BHK-21 e produzir 1 µg de RVGP em 24 horas), $2,7x10^6$ partículas e $25x10^6$ partículas virais.

A sangria dos camundongos foi realizada via retro-orbital e os protocolos de vacinação obedeceram ao esquema mostrado na Figura 8.

Figura 8. Esquema de imunização dos animais utilizados.

1ª dose	2ª dose	3ª dose	
0d	**7d**	**14d**	**21d**
sangria	sangria	sangria	sangria

Camundongos BALB-C foram imunizados de acordo com o esquema e o sangue periférico foi coletado via retro-orbital conforme indicado.

4.3.3 *Dosagem de anticorpos IgG anti-glicoproteína do vírus da raiva*

A detecção e titulação dos anticorpos IgG anti-glicoproteína do vírus da raiva foram realizados com o Kit de ELISA *Platelia Rabies II* (Bio-Rad, Hercules, California, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Esse método possui glicoproteína viral (glicoproteína extraída de vírus da raiva inativado) aderida à placa, que é reconhecida por anticorpos presentes nos soros imunes. A imunodetecção se dá através da Proteína A de *S. aureus* conjugada com peroxidase. Os controles positivos, calibrados contra padrões da Organização Mundial de Saúde (OMS), permitem uma determinação qualitativa ou quantitativa do título de anticorpos anti-vírus da raiva em soros ou plasma de animais. Os resultados foram expressos em EU/mL (unidades equivalentes) que correlacionam com unidades internacionais (UI/mL).

4.3.4 *Rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT)*

A detecção e titulação dos anticorpos IgG neutralizantes para o vírus da raiva foram determinados pelo Teste de Rápida Inibição de Focus Fluorescente (*Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test* – RFFIT) (SMITH; YAGER; BAER, 1996), modificado por De Moura et al. (2008). Como controle positivo foi utilizado soro humano de referência internacional fornecido pelo *National Institute for Biological Standards and Control* - NIBSC, contendo 30 UI/mL. Amostras do soro dos animais foram diluídas em série utilizando placas de 96 poços, em seguida foram expostas ao vírus da raiva. Os vírus que não foram neutralizados infectaram as células BHK-21 que foram adicionadas após a soroneutralização. Após 22 horas as células foram marcadas com imunoglobulina anti-nucleocapsídeo rábico, conjugada com isotiocianato de fluoresceína e foram observados 10 campos em cada orifício da microplaca

em microscópio de fluorescência invertido. Foi considerado positivo o campo que apresentou um ou mais focos fluorescentes, e assim, se determinou a diluição eficaz do soro que protegeu 50% das células inoculadas contra a infecção pelo vírus rábico (DE50) e os títulos de anticorpos neutralizantes foram expressos em UI/mL. Os cálculos foram efetuados pelo método de Spearman Karber (AUBERT, 1996).

4.3.5 *Dosagem de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-glicoproteína do vírus da raiva*

As amostras de soro dos animais foram analisadas por técnica de ELISA, para a dosagem dos anticorpos IgG1 e IgG2a específicos.

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 34 ng de rRVGP/poço, as amostras foram aplicadas na placa (diluídas seriadamente 1:200 - 6400 em TBS + BSA) e incubadas a 37°C durante 1 hora.

A placa foi incubada com anticorpo anti-IgG1 ou anti-IgG2a (1:1000) por 1 hora a 37°C, foi adicionado o substrato cromógeno OPD diluído em tampão citrato pH 5,6 (IgG1: 0,02% H_2O_2 e 0,2% OPD; IgG2a: 0,04% H_2O_2 e 0,4% OPD) por 30 minutos, em temperatura ambiente e na ausência de luz. A reação foi interrompida com 25 µL de H_2SO_4 4 N. Os valores da absorbância foram determinados em leitor de ELISA a 490 nm para IgG1 e IgG2a. Os resultados foram expressos pela razão da absorbância de anticorpos IgG1 / absorbância de anticorpos IgG2a pelo fato de não termos uma amostra padrão para dosagem quantitativa. Assim, resultados superiores a um (>1) demonstram maior tendência a reposta imune humoral e menor que 1 (<1), maior tendência à resposta imune celular.

4.3.6 *Extração e cultura dos esplenócitos murinos*

Os baços dos camundongos imunizados foram retirados em condições assépticas, macerados e lavados com solução *Ack Lising Buffer* (BioSource International, Camarillo, California, EUA) para lise de hemácias. Em seguida foram ressuspendidas em meio de cultura RPMI (Life Technologies) com 10% de soro fetal bovino, contadas em câmara de *Neubauer* e cultivadas de acordo com o protocolo de cada experimento.

4.3.7 *ELISA para citocinas (IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-10, IL-12)*

Para avaliação da produção de citocinas *in vitro*, os animais foram submetidos à eutanásia após 21 dias da primeira dose de imunização e seus baços foram coletados para

obtenção de esplenócitos. Após maceração do *pool* dos baços (por grupo), lise de hemácias e contagem (já descritas no item 4.3.6), $2x10^6$ células foram distribuídas em cada poço de uma placa de 12 poços. As células foram cultivadas por 72 horas. O sobrenadante da cultura foi retirado e armazenado a -20 °C. A dosagem de citocinas (IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-10 e IL-12) foi realizada segundo protocolo descrito pelo fabricante (BD Biosciences, San Jose, Califórnia, EUA).

4.3.8 *Análises estatísticas*

Para os dados de produção de anticorpos neutralizantes e anti-vírus da raiva foi utilizado o teste T de *Student* entre duas amostras diferentes com intervalo de confiança de 95% ($P<0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Preparação da rRVGP expressa em células S2

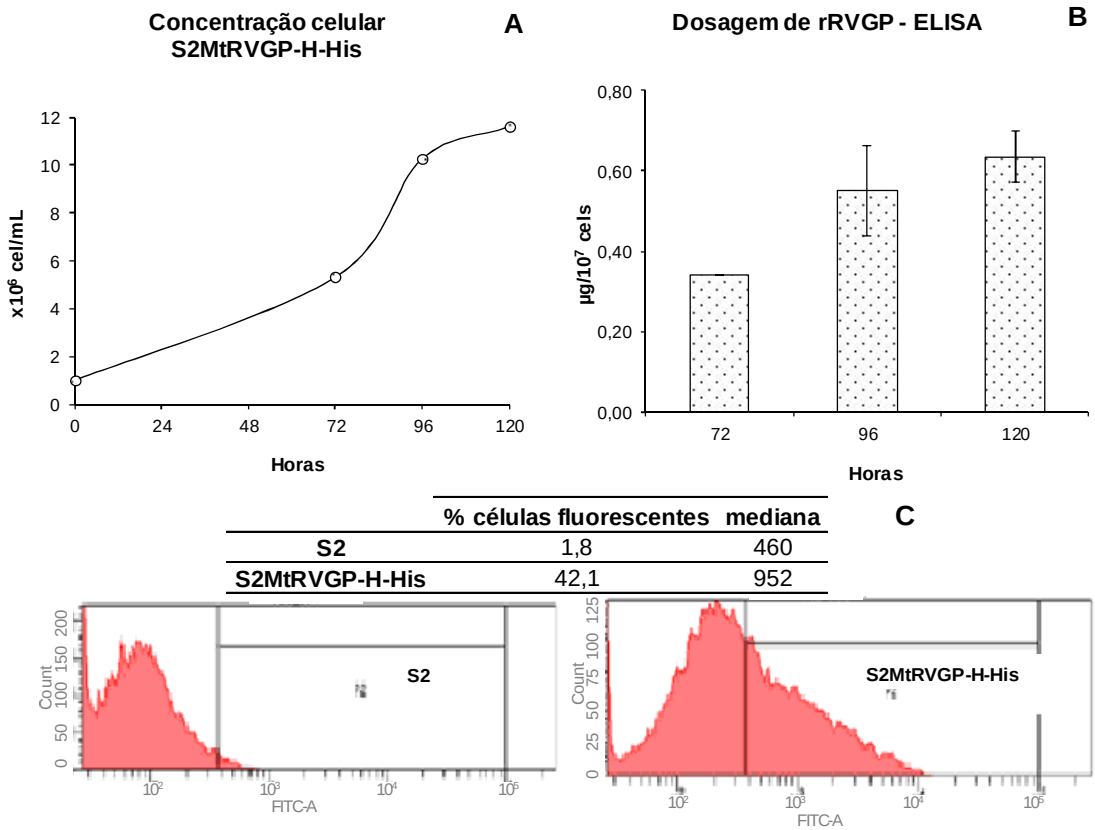
5.1.1 *Estabelecimento da linhagem celular S2MtRVGP-H*

A linhagem S2MtRVGP-H foi estabelecida por Lemos et al. (2009) e foi gentilmente cedida para nossos estudos. Essa linhagem celular foi amplamente estudada durante o trabalho de mestrado (VENTINI, 2010; VENTINI et al., 2010) e realizamos neste trabalho de doutorado ensaios em biorreator para produção da rRVGP para ensaios *in vivo* e de purificação.

5.1.2 *Estabelecimento da linhagem celular S2MTRVGP-H-His*

Após a transfecção das células S2 com plasmídeo contendo o gene da RVGP + sequencia de histidina + cassete de resistência a higromicina, as células S2MtRVGP-H-His foram cultivadas em agitação orbital, induzidas com $CuSO_4$ após 48 horas de cultura e a expressão da rRVGP recombinante foi analisada por ELISA e citometria de fluxo (Figura 9).

Figura 9. Concentração celular do cultivo das células S2MtRVGP-H-His e análise da expressão de rRVGP.



	% células fluorescentes	mediana
S2	1,8	460
S2MtRVGP-H-His	42,1	952

Células S2MtRVGP-H-His cultivadas em agitação orbital, 100 rpm, volume 20 mL, 28 °C, meio de cultura SF-900II, indução 700µM $CuSO_4$ em 48 h de cultivo (n=5). A) Média do crescimento celular. B) Dosagem de rRVGP por ELISA. C) Histogramas das análises de citometria de fluxo em 120 horas de cultivo utilizando anticorpo primário monoclonal anti-glicoproteína do vírus da raiva.

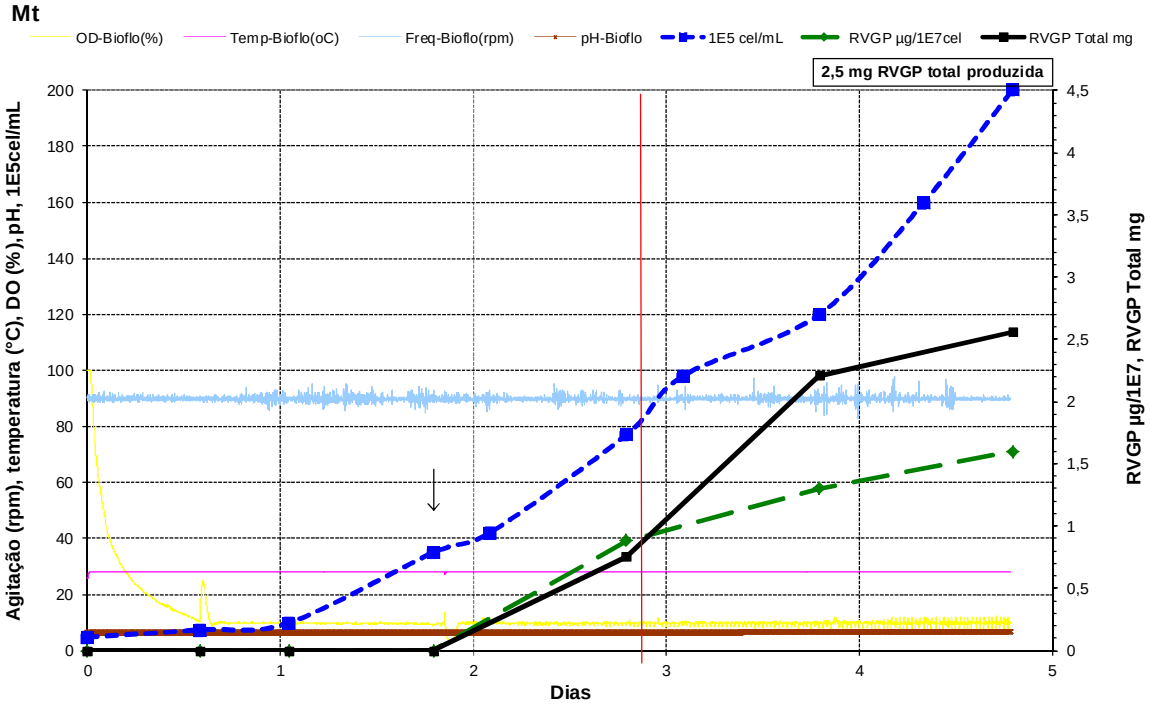
O crescimento celular demonstrado pela nova linhagem transfectada (S2MtRVGP-H-His) foi semelhante ao crescimento de outras linhagens celulares provenientes de células S2 transfectadas e já estudadas no laboratório (1-2x10^7 cel/mL), conforme demonstrado por (VENTINI et al., 2010). A figura 9B e 9C mostram a análise da produção da rRVGP por ELISA e por citometria de fluxo, respectivamente. Tanto a quantificação da rRVGP por ELISA (0,6 µg/10^7 células) quanto a fluorescência detectada pelo ensaio de citometria de fluxo (42%) demonstram que as células foram eficientemente transfectadas e expressam a rRVGP.

5.1.3 *Cultivo de células S2MtRVGP-H e S2MtRVGP-H-His em biorreator de tanque agitado*

As linhagens celulares foram cultivadas em biorreator de tanque agitado, Bioflo 110, para obtenção de quantidades de rRVGP suficientes para estudos de resposta imunológica pela vacinação de camundongos e para a purificação da proteína.

Células S2MtRVGP-H foram cultivadas em biorreator de tanque agitado para produzir rRVGP para os estudos de imunogenicidade. Esse ensaio apresentou Xmax $2x10^7$ cel/mL, produção específica de rRVGP máxima 1,6 µg/10^7 células e 2,5 mg de rRVGP total (Figura 10).

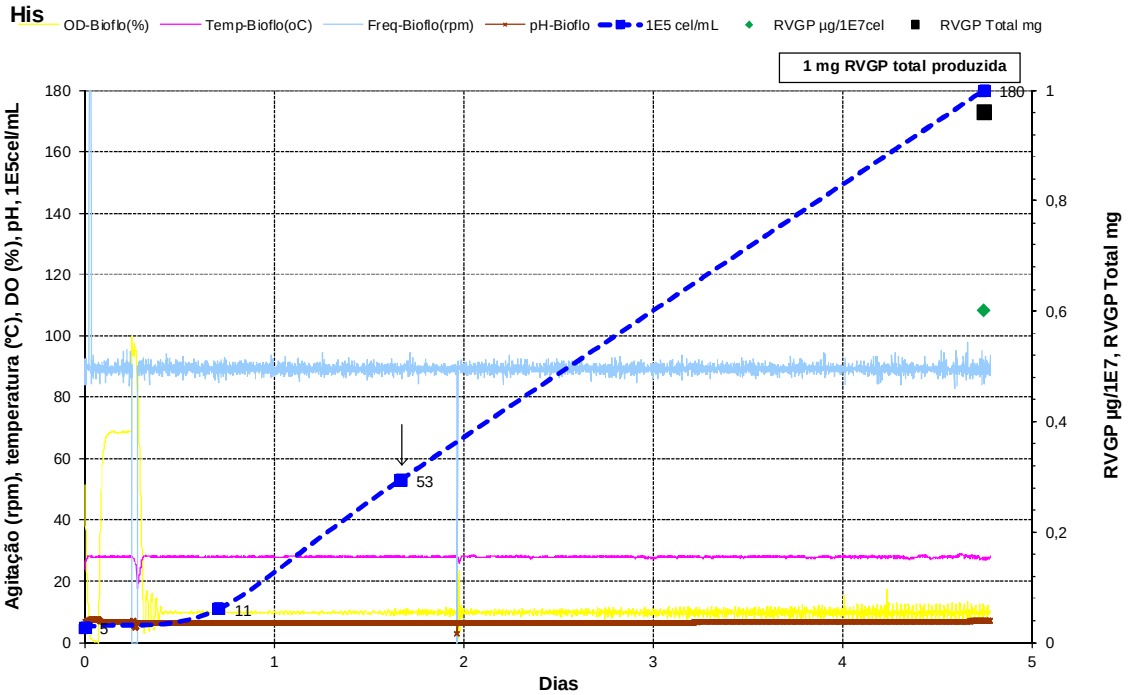
Figura 10. Cultivo de células S2MtRVGP-H em biorreator para produção de rRVGP.



Ensaio em biorreator para obtenção de rRVGP para ensaios de caracterização de imunogenicidade. Ensaios com células S2MtRVGP-H com expressão indutível, biorreator Bioflo 110, volume de trabalho 1L, temperatura 28 °C, 90 rpm, OD 10% (ar, nitrogênio e oxigênio - vazão 0,1 L/min), pH monitorado, inóculo inicial $5x10^5$ cel/mL, indução 2-$5x10^6$ cel/mL com 700 µL $CuSO_4$ (seta).

Células S2MtRVGP-H-His cultivadas em biorreator foram utilizadas para produzir rRVGP com cauda de histidina para ensaios de purificação por IMAC. Esse ensaio apresentou Xmax $1,8x10^7$ cel/mL, produção de rRVGP específica máxima de rRVGP 0,6 µg /10^7 células e 1mg de rRVGP total (Figura 11).

Figura 11. Cultivo de células S2MtRVGP-H-His em biorreator para produção de rRVGP.

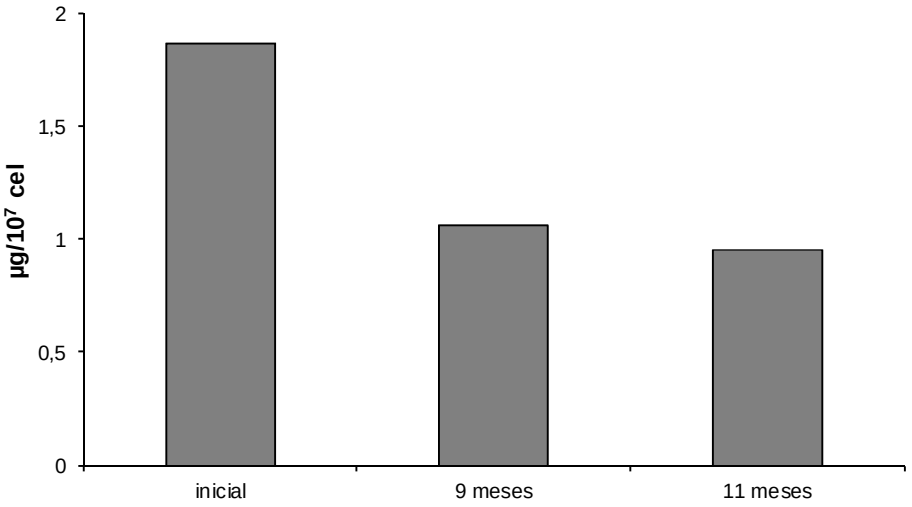


Ensaio em biorreator para obtenção de rRVGP para ensaios de purificação. Ensaios com células S2MtRVGP-H-His com expressão indutível, biorreator Bioflo 110, volume de trabalho 1 L, temperatura 28 °C, 90 rpm, OD 10% (ar, nitrogênio e oxigênio - vazão 0,1 L/min), pH monitorado, inóculo inicial $5x10^5$ cel/mL, indução $2\text{-}5x10^6$ cel/mL com 700 µM $CuSO_4$ (seta).

5.1.4 *Análise da rRVGP armazenada*

Dando continuidade a um processo de armazenamento de proteína já iniciado durante o mestrado (VENTINI, 2010), onde foram testados alguns agentes crioprotetores e estabelecido um protocolo para armazenamento da rRVGP produzida, testamos o mesmo método definido no projeto de mestrado por um período mais longo de armazenamento (9 e 11 meses). O protocolo definido anteriormente foi de armazenar as células íntegras, a -20 °C em tampão de congelamento contendo 20% glicerol e inibidor de protease. Para testar a reprodutibilidade dos resultados, amostras de células S2MtRVGP-H armazenadas por 9 e 11 meses foram analisadas por ELISA (Figura 12).

Figura 12. Quantificação da rRVGP armazenada.



Amostras contendo 10^9 células S2MtRVGP-H foram armazenadas por 9 e 11 meses em tampão de congelamento a -20 °C e quantificadas por ELISA. Para o ELISA, as células foram lisadas mecanicamente com um homogeneizador de tecidos e a rRVGP foi solubilizada dos fragmentos de membrana com 0,2% de NP-40.

O resultado obtido foi semelhante ao que encontramos nos testes realizados em até 6 meses de armazenamento durante o projeto de mestrado com amostras de rRVGP produzida em outras bateladas (diminuição de 40% da proteína quantificada, dados não mostrados). Os resultados obtidos no projeto de mestrado demonstraram que em um primeiro momento ocorre uma perda da rRVGP tanto nas amostras armazenadas em tampão de congelamento quanto em *pellet* seco, depois a glicoproteína se manteve mais estável quando armazenada em tampão de congelamento (VENTINI, 2010). Quando as amostras foram armazenadas em *pellet* seco por até 6 meses apresentaram queda superior a 50% na quantificação da rRVGP (VENTINI, 2010). Esse resultado demonstra que o tampão de congelamento, associado ao armazenamento a -20 °C, é a forma mais adequada para evitar diminuição de mais de 50% da glicoproteína durante a armazenagem durante o período de análise.

5.1.5 *Purificação da rRVGP*

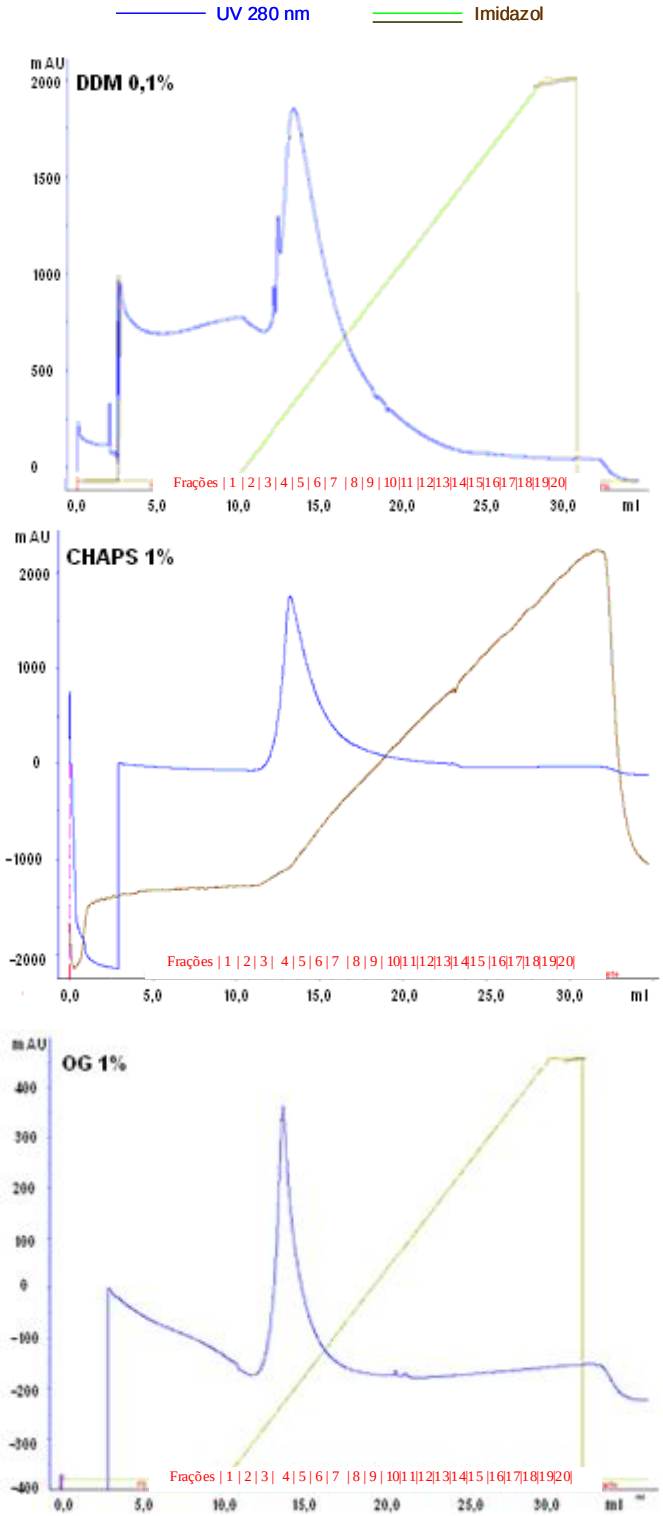
5.1.5.1 Purificação da rRVGP produzida por células S2MtRVGP-H-His

A rRVGP expressa em células S2MtRVGP-H-His foi extraída por métodos de preparação membranária (lise mecânica, ultracentrifugação) e solubilizada com os detergentes DDM, CHAPS ou OG.

Alíquotas iguais da fração membranária (20,8 mg de proteína total) foram tratadas com solução tampão contendo diferentes detergentes (DDM 0,1%, CHAPS 1% ou OG 1%) para a solubilização da rRVGP-histidina, a uma concentração de proteína total de 1 mg/mL. Após a solubilização, as preparações foram filtradas (0,45 µm) e aplicadas à coluna de níquel *crude HisTrap*, para a realização da segunda etapa de purificação pela metodologia de cromatografia de afinidade do tipo IMAC, utilizando equipamento FPLC.

Os cromatogramas obtidos (Figura 13) apresentaram perfis de eluição semelhantes para a RVGP solubilizada em cada um dos três detergentes, apresentando um pico de proteínas entre as frações 3 e 7 do gradiente de eluição (cerca de 75 mM de imidazol até cerca de 200 mM).

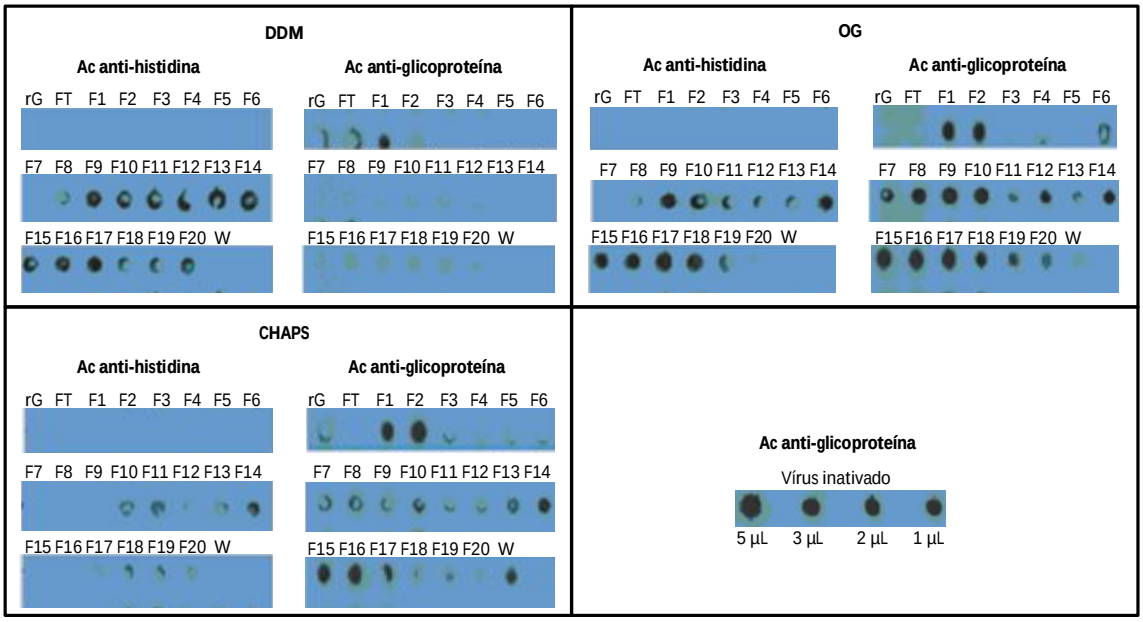
Figura 13. Cromatogramas da purificação da rRVGP-histidina produzida por células S2 em FPLC.



Purificação da rRVGP-histidina produzida por células S2MtRVGP-H-His em coluna *crude HisTrap*, equipamento FPLC. Após o carregamento da amostra, a coluna foi lavada e posteriormente as proteínas foram eluídas em gradiente de imidazol (0 – 500 mM), a um fluxo de 1 mL/min, sendo coletadas 20 frações de 1 mL. DDM, CHAPS e OG: detergentes utilizados em cada partida.

As frações obtidas foram analisadas por *dot blotting* com anticorpo monoclonal anti-histidina, ou anticorpo monoclonal ou policlonal anti-glicoproteína do vírus da raiva. As análises com anticorpo anti-glicoproteína monoclonal não apresentaram resultados pelo fato da rRVGP purificada provavelmente ter perdido sua conformação trimérica, à qual o anticorpo monoclonal é específico. As análises de *dot blotting* com anticorpo monoclonal anti-histidina e policlonal anti-glicoproteína (Figura 14) demonstraram que a solubilização com o detergente OG 1% a 1 mg/mL de proteína foi a condição mais promissora, pois há uma maior intensidade nos pontos das frações para ambos anticorpos. As análises com anticorpos anti-histidina mostraram maior intensidade de sinal correspondem às frações mais tardias da eluição, mostrando maior adsorção à coluna.

Figura 14. Detecção da rRVGP-histidina produzida por células S2 nas frações coletadas após purificação por *dot blotting*.

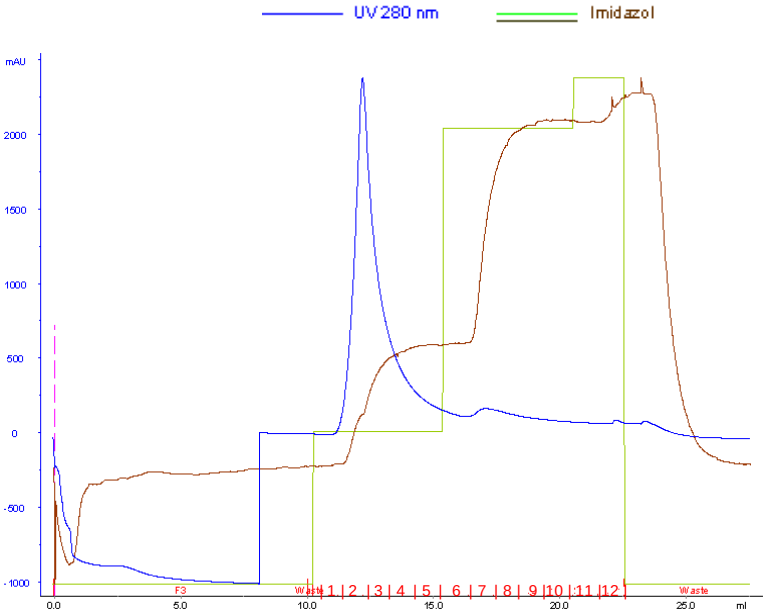


Para todas amostras foram utilizados anticorpo monoclonal anti-histidina e anticorpo policlonal anti-glicoproteína do vírus da raiva. As membranas foram reveladas utilizando a técnica de ECL. Amostras de vírus inativado, em diferentes volumes conforme figura, foram utilizadas como controle positivo. rG: rRVGP solubilizada; FT: *flowtrought*; F1 – 20: frações 1 a 20 da purificação; W: *wash*, DDM, CHAPS e OG: detergentes utilizados em cada purificação.

A partir desses resultados optamos por aplicar uma maior quantidade de amostra à coluna *crude HisTrap*, utilizando apenas o detergente OG 1% para a solubilização. Para isso solubilizamos uma quantidade de 140 mg de preparação de membrana e aplicamos na mesma coluna utilizada anteriormente. A estratégia de eluição também foi alterada, para separar mais evidentemente as frações contendo o pico inicial de proteínas das demais proteínas presentes

que se desligam da matriz a uma concentração maior de imidazol. Para isso foi definida uma etapa de eluição de 150 mM de imidazol (frações 1 a 5) e uma segunda etapa de eluição de 450 mM de imidazol (frações 6 a 10), nas frações 11 e 12 a concentração de imidazol foi equivalente a 500 mM. A estratégia gerou 12 amostras (Figura 15).

Figura 15. Cromatograma da purificação da rRVGP-histidina produzida por células S2 por FPLC, em gradiente de imidazol.



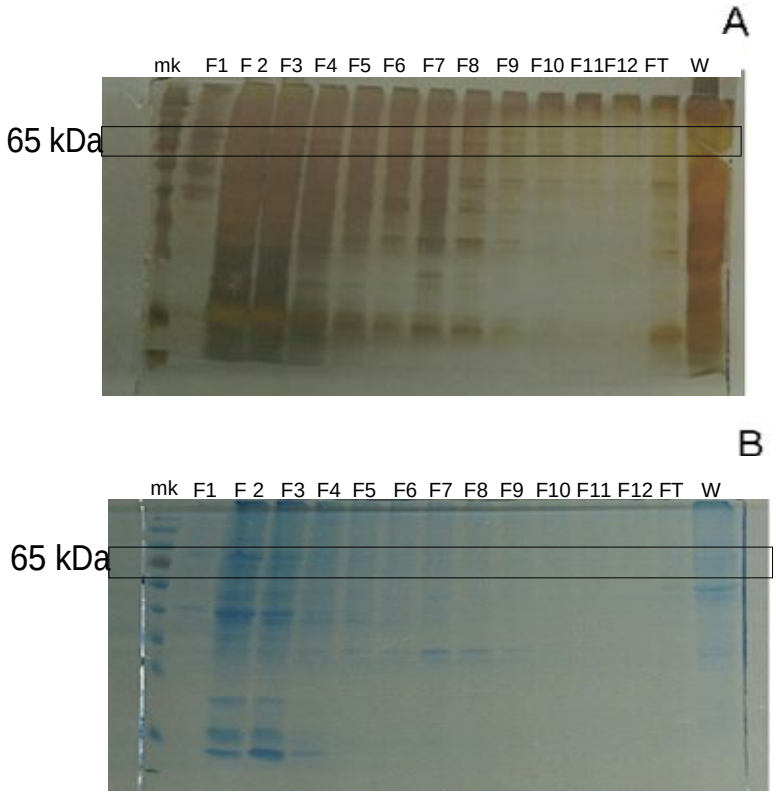
Cromatograma da purificação da rRVGP-histidina produzida por células S2MtRVGP-H-His em coluna *crude HisTrap*, FPLC. Após o carregamento da amostra, a coluna foi lavada e posteriormente as proteínas foram eluídas em duas etapas: imidazol a 150 mM e a 450 mM, a um fluxo de 1 mL/min, na duas ultímas frações a concentração de imidazol foi 500 mM. sendo coletadas 12 frações de 1mL. Utilizado detergente OG 1%.

Pela visualização do cromatograma acima, constata-se um pico de proteínas eluídas nas frações 2 a 5, constituído principalmente de proteínas contaminantes (outras proteínas). No momento da coleta das frações 7 e 8 há o aparecimento de um outro pequeno pico de proteínas, provavelmente associado à rRVGP. Na análise de *western-blotting* detectamos a presença de uma banda forte nessas frações (Figura 17).

Após a eluição, as amostras correspondentes às frações foram analisadas por SDS-PAGE, com coloração por *page blue* ou por prata (Figura 16). Como pode ser observado, há uma grande quantidade de proteínas sendo eluídas nas frações iniciais com 150 mM de imidazol, provavelmente outras proteínas celulares. Posteriormente, a quantidade de proteínas eluídas diminui, sendo que foi possível identificar na fração 7A, pelo gel corado com prata,

uma nova e pequena elevação na quantidade de proteínas eluídas. A marcação nas figuras representa o tamanho esperado dos monômeros da RVGP (~65 kDa).

Figura 16. SDS-PAGE das frações coletadas após purificação da rRVGP-histidina por FPLC, em gradiente de imidazol.

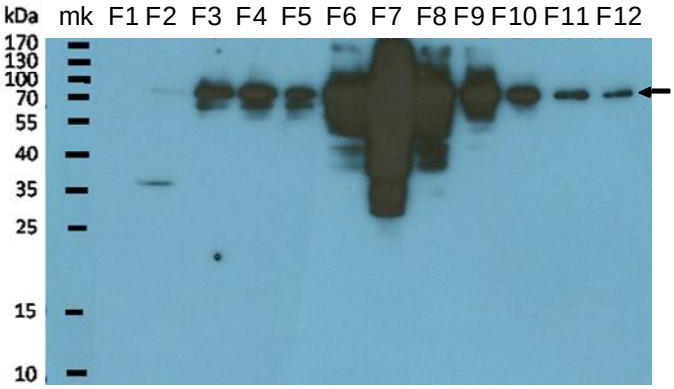


A – gel corado por prata. B – gel corado por *page-blue*. MK: Marcador; F1 – 12: frações 1 a 12; FT: *flowtrough;* W: *wash.*

A figura 17 mostra a detecção da rRVGP pela técnica de *western-blotting* utilizando anticorpo policlonal anti-glicoproteína do vírus da raiva e revelação por técnica de quimiolumiescência (ECL). Foram detectadas diferentes tamanhos da rRVGP nas frações de 2 a 12 entre 30 kDa e 170 kDa. Nas frações 3 a 5 a rRVGP é visível em dois tamanhos (duas bandas) de aproximadamente 70 kDa, sendo a banda superior mais intensa. Nas frações 6 a 9 há um arrasto, onde na fração 7 esse arrasto apresenta maior intensidade. A presença do arrasto (F6 - 9) e duas bandas em torno de 70 kDa (F3 - 5) pode ser devido a produtos de degradação da rRVGP e/ou interações entre duas ou mais moléculas, fazendo com que proteína fosse detectada em alturas diferentes durante o deslocamento da eletroforese. Aparentemente a quantidade de proteína nessa população decresce em direção à fração 12, em

que a rRVGP aparece como uma banda única e bem definida ao redor de 70 kDa (F10 e 12), onde a concentração de imidazol corresponde a 500mM.

Figura 17. Detecção da rRVGP-histidina produzida por células S2 nas frações coletadas após purificação histidina por FPLC, em gradiente de imidazol, por *Western-blotting*.



Detecção da rRVGP produzida por células S2MtRVGP-H-His com anticorpo policlonal anti-glicoproteína do vírus da raiva. A membrana foi revelada utilizando da técnica de ECL. Frações indicadas acima das bandas. MK: Marcador; F1 – 12: frações 1 a 12.

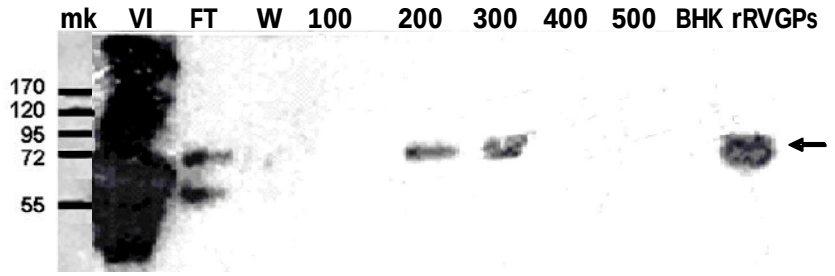
5.1.5.2 Purificação da rRVGP produzida por células BHK-21 infectadas por SFV-RVGP

A rRVGP expressa em células BHK-21, após infecção destas com SFV-RVGP, foi extraída por métodos de preparação membranária (lise mecânica, ultracentrifugação) e solubilizada com detergente DDM 0,1%.

Após a solubilização a amostra foi aplicada à coluna de resina de níquel para a realização da etapa de purificação por IMAC.

Amostras das frações de eluição de IMAC foram submetidas a SDS-PAGE. As proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose para a realização de *western-blotting* **(**Figura 18), com detecção por anticorpo policlonal anti-glicoproteína do vírus da raiva e revelação por técnica de ECL. A rRVGP foi identificada nas frações correspondentes a 200 e 300 mM de imidazol (bandas de aproximadamente 70 kDa). A rRVGP detectada no *flowtrough* demonstra que uma porcentagem da proteína não ficou retida na coluna durante a aplicação.

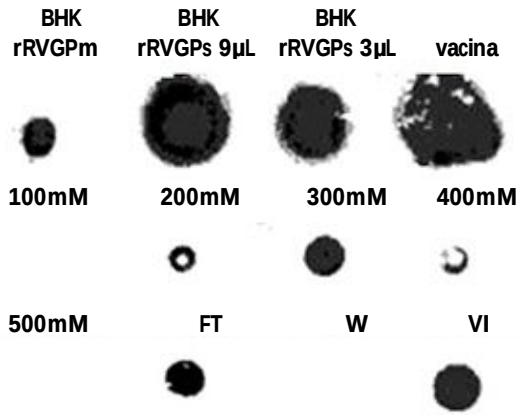
Figura 18. Detecção da rRVGP-histidina produzida por células BHK-21 infectadas por SFV-RVGP nas frações coletadas da cromatografia de afinidade, por *western-blotting*.



As frações foram eluídas em 5 etapas com concentrações diferentes de imidazol (indicadas acima das bandas). A detecção da rRVGP foi feita com anticorpo policlonal e a membrana foi revelada utilizando a técnica de ECL. Mk: marcador; FT: *flowtrought*; W: *wash*; 100 - 500: frações referentes a concentração de imidazol; BHK rRVGPs: rRVGP solubilizada da membrana da célula BHK-21 infectadas por SFV-RVGP. A seta indica a banda referente a rRVGP com aproximadamente 70 kDa.

Todas as frações obtidas foram analisadas por *dot blotting* com anticorpo monoclonal anti-glicoproteína do vírus da raiva. Ao contrário da rRVGP produzida por células S2, a rRVGP produzida por células BHK-21 infectadas por SFV-RVGP foi detectada por anticorpo monoclonal, provavelmente por ter a conformação conservada (trímero) após a purificação (Figura 19).

Figura 19. Detecção por *dot blotting* da rRVGP-histidina produzida por células BHK-21 infectadas por SFV-RVGP nas frações coletadas da cromatografia de afinidade.



Detecção da rRVGP com anticorpo monoclonal anti-glicoproteína do vírus da raiva. A membrana foi revelada utilizando da técnica de ECL. BHK rRVGPm: rRVGP presente na membrana da célula BHK-21 infectadas por SFV-RVGP, lisada; BHK rRVGPs: rRVGP solubilizadada membrana das células BHK-21 infectadas por SFV-RVGP com detergente DDM; vacina: vacina contra raiva; 100 – 500 mM: frações referentes a concentração de imidazol; FT: *flowtrough;* W: *wash;* VI: vírus da raiva inativado.

5.2 Estudo da imunogenicidade da rRVGP produzida por células S2 e SFV-RVGP

Em um primeiro momento os animais foram imunizados via intraperitoneal para definição da forma de administração do antígeno (rRVGP ancorada na membrana de células íntegras, ancorada a fragmentos de membrana ou solubilizada) e número de partículas virais que carregam o RNA da rRVGP (para o SFV-RVGP). Foram administradas doses de agente imunizante contendo ou vacina contra raiva, ou vírus da raiva inativado, ou rRVGP produzida por células S2, ou rRVGP produzida por células BHK-21 infectadas por SFV-RVGP (solubilizada), ou SFV-RVGP. A resposta imune humoral foi avaliada inicialmente por ELISA (dosagem de anticorpos anti glicoproteína do vírus da raiva) em amostras de soro dos animais. Posteriormente, após a definição das melhores formas de administração dos antígenos, comparamos a imunogenicidade da rRVGP produzida por células S2 e SFV-RVGP com controles positivos (vírus inativado, vacina) através da dosagem de anticorpos do tipo IgG por ELISAs e RFFIT (técnica de inibição de focos fluorescentes) em amostras de soro dos animais e ELISA de citocinas do sobrenadante da cultura dos esplenócitos murinos.

5.2.1 *Síntese de anticorpos IgG anti-glicoproteína do vírus da raiva*

Realizamos diversos ensaios *in vivo* avaliando a qualidade e quantidade do antígeno utilizado nas vacinações (rRVGP ou SFV-RVGP).

Em um primeiro protocolo, utilizamos a rRVGP proveniente da expressão em células S2, em três apresentações: presente em células S2 íntegras; em fragmentos de membrana obtidos através de lise mecânica das células; e rRVGP solubilizada, ou seja, não ancorada nos fragmentos de membrana, porém com sua conformação mantida através da interação da rRVGP com a micela do detergente (NP-40) utilizado nos preparos. Também estudamos diferentes quantidades de SFV-RVGP ($2,7x10^6$, $8,3x10^6$ e $25x10^6$ partículas virais por dose, quantificadas por qRT-PCR) para definir as melhores condições de imunização. Utilizamos um esquema de imunização de 3 doses em intervalos semanais. Os resultados foram avaliados pela síntese de anticorpos anti-glicoproteína do vírus da raiva dosados por ELISA no soro dos animais imunizados (Tabela 2).

Tabela 2. Síntese de anticorpos IgG anti-glicoproteína do vírus da raiva no soro dos animais imunizados com rRVGP ou SFV-RVGP. Cinética de produção de anticorpos e definição do tipo de ancoragem da proteína e título viral para vacinação.

		Título de anticorpos		
		ELISA (EU/mL)		
GRUPO	**DOSE (3x)**	**7d**	**14d**	**21d**
S2 rRVGP		0,1 ±0,05	0,4±0,1	2,0±0,6
S2 rRVGPm	1µg	<0,1	0,8±0,4	2,3±0,4
S2 rRVGPs		<0,1	0,5±0,5	2,5±1,6
S2	-	<0,1	<0,1	<0,1
SFV-RVGP	2,7E6 p.v.	<0,1	<0,1	<0,1
SFV-RVGP	8,3E6 p.v.	0,2 ±0,2	1,8±0,5	3,7±1,0
SFV-RVGP	25E6 p.v.	0,1 ±0,1	2,5±0,5	4,6±0,2
SFV-RVGP uv.	-	<0,1	<0,1	<0,1
Vacina	1µg	1,2 ±0,3	3,1±1,1	3,4±1,0

Camundongos BALB-C (n≥3) foram imunizados via intraperitoneal conforme indicado, com três doses de antígeno nos dias 0, 7 e 14. A obtenção do soro foi feita através de sangrias via retro-orbital nos dias 7, 14 e 21 após a primeira imunização. Nas preparações contendo rRVGP foram utilizados 1 µg RVGP/dose e no grupo SFV-RVGP, $2,7x10^6$, $8,3x10^6$ e $25x10^6$ partículas virais/dose. A dose de SFV-RVGP foi determinada por RT-PCR. A dosagem dos anticorpos anti-glicoproteína do vírus da raiva foi feita por ELISA com o kit *Platélia Rabies II*. rRVGP S2: células S2 contendo a rRVGP; rRVGP S2m: fragmentos de membrana de células S2 contendo a rRVGP; rRVGP S2s: rRVGP de células S2 solubilizada com NP-40; S2: células S2 selvagens; SFV-RVGP uv.: suspensão viral exposta 30 minutos em luz ultra violeta; p.v.: partículas virais.

Quando a S2 rRVGP foi utilizada para imunização em fragmentos de membrana ou solubilizada, após a segunda dose de vacina observamos títulos de anticorpos anti-glicoproteína iguais ou superiores ao mínimo exigido pela OMS para a aprovação de uma vacina contra a raiva que é de 0,5 EU/mL, unidades equivalentes a UI/mL (WHO, 2014).

Nas imunizações com SFV-RVGP utilizando baixas concentrações ($2,7x10^6$ partículas virais/dose) não observamos títulos acima de 0,5 EU/mL. Porém, nas concentrações $8,3x10^6$ e $25x10^6$ partículas virais/dose, títulos de anticorpos acima do recomendado foram observados já a partir da segunda dose do agente imunizante.

Conforme esperado, as imunizações com vacina (controle positivo) apresentaram anticorpos acima de 0,5 EU/mL após a primeira dose e os controles negativos (S2 e SFV-

RVGP inativado com luz ultravioleta) não apresentaram níveis de anticorpos anti-glicoproteína detectáveis.

Com base nestes ensaios, passamos aos estudos de imunização dos animais com antígenos contendo: proteína (vacina contra raiva, vírus inativado, rRVGP solubilizada produzida em células S2, rRVGP solubilizada produzida em células BHK-21 infectadas com SFV-RVGP), vetor viral (SFV-RVGP), vacinando os animais com a primeira dose contendo SFV-RVGP e utilizando rRVGP solubilizada de células S2 nas duas outras doses reforço e controles negativos (S2 selvagem, SFV-RVGP inativado com ultravioleta, SFV-GFP e salina, Tabela 3).

Tabela 3. Síntese de anticorpos IgG anti-glicoproteína do vírus da raiva no soro dos animais imunizados. Avaliação de anticorpos por ELISA, RFFIT e comparativo da resposta imune entre os grupos.

		Título de anticorpos		
		ELISA (EU/mL)	**RFFIT (UI/mL)**	**IgG1/IgG2a**
GRUPO	**DOSE (3x)**	**21d**	**21d**	**(razão)**
S2 rRVGPs	1µg	2,5±1,6	1,7±1,7*	1,7±0,7
BHK rRVGPs		3,5±1,0	3,8±1,3	1,8±1,9
SFV-RVGP	8,3E6 p.v.	3,7±1,0	23,8±5,6*	0,7±0,1
SFV-RVGP + S2 rRVGPs	1x 8,3E6 p.v. + 2x 1µg	4,2±0,6	14,8±6,1	N.D.
Vacina	1µg	3,4±1,0	9,5±3,4	1,8±0,3
Virus inativado		2,7±1,8	6,6±6,6	1,4±1,0
S2	-	<0,1	<0,1	<0,1
SFV-RVGP uv.		<0,1	<0,1	<0,1
SFV-GFP		<0,1	<0,1	<0,1
PBS		<0,1	<0,1	<0,1

Camundongos BALB-C (n=5) foram imunizados via intraperitoneal conforme indicado, com três doses de antígeno nos dias 0, 7 e 14, com 1 µg RVGP/dose ou $8,3x10^6$ partículas de SFV-RVGP/dose. A obtenção do soro foi feita através de sangrias via retro-orbital nos dias 7, 14 e 21 após a primeira imunização. Anticorpos anti-glicoproteína do vírus da raiva foram dosados por ELISA com o kit *Platélia* e seus resultados estão apresentados em unidades equivalentes por mililitro (EU/mL). Anticorpos neutralizantes foram dosados do soro dos animais 21 dias após a primeira dose de vacinação, pelo método RFFIT e seus resultados são apresentados em unidades internacionais por mililitro (UI/mL). Anticorpos de classe IgG1 e IgG2a foram dosados do soro dos animais 21 dias após a primeira dose de vacinação e seus resultados são apresentados pela razão do titulo de anticorpos IgG1 / título de anticorpos IgG2a. S2 rRVGPs: rRVGP de células S2 solubilizada com NP-40; BHK-21 rRVGPs: rRVGP de células BHK-21 infectadas com SFV-RVGP e solubilizada com NP-40; SFV-RVGP + 2x S2 rRVGPs: primeira dose com SFV-RVGP e segunda e terceira dose reforço com rRVGP solubilizada de células S2; S2: células S2 selvagens; SFV-RVGP uv.: suspensão viral exposta 30 minutos em luz ultra violeta; SFV-GFP: SFV contendo o mRNA da *green fluorescent protein*; p.v.: partículas virais; N.D.: não determinado. *: diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo vacina ($p<0,05$) analisada pelo teste *t-Student*.

Todos os protocolos de imunização levaram os animais a apresentarem níveis de anticorpos acima de 0,5 UI/mL após o esquema vacinal. Os controles negativos não apresentaram níveis de anticorpos anti-glicoproteína detectáveis.

Os títulos dos anticorpos de 21 dias após a primeira dose de imunização foram analisados pelo teste *t-Student*, em relação ao grupo vacina, onde somente os resultados de

anticorpos neutralizantes (RFFIT) dos grupos S2 rRVGPs e SFV-RVGP foram estatisticamente diferentes do grupo vacina. Porém todos os resultados de produção de anticorpos (21 dias após primeira dose) foram comparados e discutidos entre si, mesmo não apresentando diferença do grupo vacina.

A produção predominante da imunoglobulina IgG1 é associada a uma resposta imunológica do tipo humoral e de IgG2a à uma resposta imune celular. Assim, os valores obtidos de IgG1 / IgG2a > 1, demonstram maior tendência a resposta imune humoral e resultados <1, maior tendência à resposta celular. Conforme esperado, os grupos que não tiveram a apresentação de antígeno sintetizando rRVGP *in vivo* (rRVGP, vacina contra raiva e vírus rábico inativado) apresentaram maior produção de anticorpos da sub-classe IgG1.

A imunização com SFV-RVGP (8.3 x 10^6 partículas/dose) resultou, após três doses, na formação de anticorpos anti-glicoproteína e anti-vírus da raiva em altos níveis e em quantidades similares ELISA) ou superior (RFFIT) às dosadas nos animais imunizados com vacina contra a raiva. Animais imunizados com SFV-RVGP, ou seja, com RNA que codifica *in* vivo a síntese de RVGP, apresentaram maior produção de anticorpos IgG2a.

Os grupos imunizados com SFV-RVGP inativado com luz ultravioleta e SFV-GFP (controles negativos), conforme esperado, não apresentaram níveis de anticorpos contra a glicoproteína do vírus da raiva detectáveis por ELISA, indicando que a resposta imune contra raiva era mediada pelo RNAm contido no SFV-RVGP e não de possíveis rRVGPs presentes na membrana do vírus (no caso do SFV-RVGP).

Quando associamos a imunização com SFV-RVGP (vírus), seguida de reforços com rRVGP (proteína), tabela 3, observamos produção de anticorpos semelhante à obtida com a aplicação de três dose de SFV-RVGP.

Os animais imunizados com preparações contendo SFV-RVGP apresentaram consistentemente uma predominância de anticorpos da sub-classe IgG2a. Em animais imunizados com proteína recombinante ou vírus inativado, a produção de anticorpos da sub-classe IgG1 foi predominante.

Testamos ainda o antígeno rRVGP sob diferentes formas oligoméricas. Quando ele foi injetado nos camundongos ancorado à membrana celular, ou em fragmentos de membrana, foi apresentado na sua conformação trimérica nativa, que é a presente no vírus da raiva. Quando tratamos as amostras de rRVGP à temperatura de 100°C, as ligações de hidrogênio foram quebradas e a rRVGP ficou reduzida a monômeros. Quando essa forma monomérica foi utilizada para imunização não foi detectado nenhum anticorpo anti-glicoproteína nos ensaios (dados não mostrados).

Realizamos ainda uma avaliação da imunização realizada com duas doses (primer + reforço) e observamos a memória imunológica dos diferentes antígenos empregados (tabela 4).

Tabela 4. Síntese de anticorpos IgG anti-glicoproteína e neutralizantes do vírus da raiva no soro dos animais imunizados. Vacinação com duas doses (dias 0 e 14) de rRVGP, SFV-RVGP ou vacina. Dosagem de anticorpos após 20 e 50 dias da primeira imunização.

		Título de anticorpos		
		Platélia (EU/mL)		**RFFIT (UI/mL)**
GRUPO	**DOSE**	**20d**	**50d**	**50d**
Vacina	2x 1µg	6,6±3,7	4,0±2,5	>40
SFV-RVGP	2x 8,3E6 part	2,3±3,2	0,6±0,3	3,6±1,2
SFV-RVGP + S2 rRVGPsol	1x 8,3E6 part + 1x 1µg	1,1±1,5	2,0±2,1	14,3±17,7

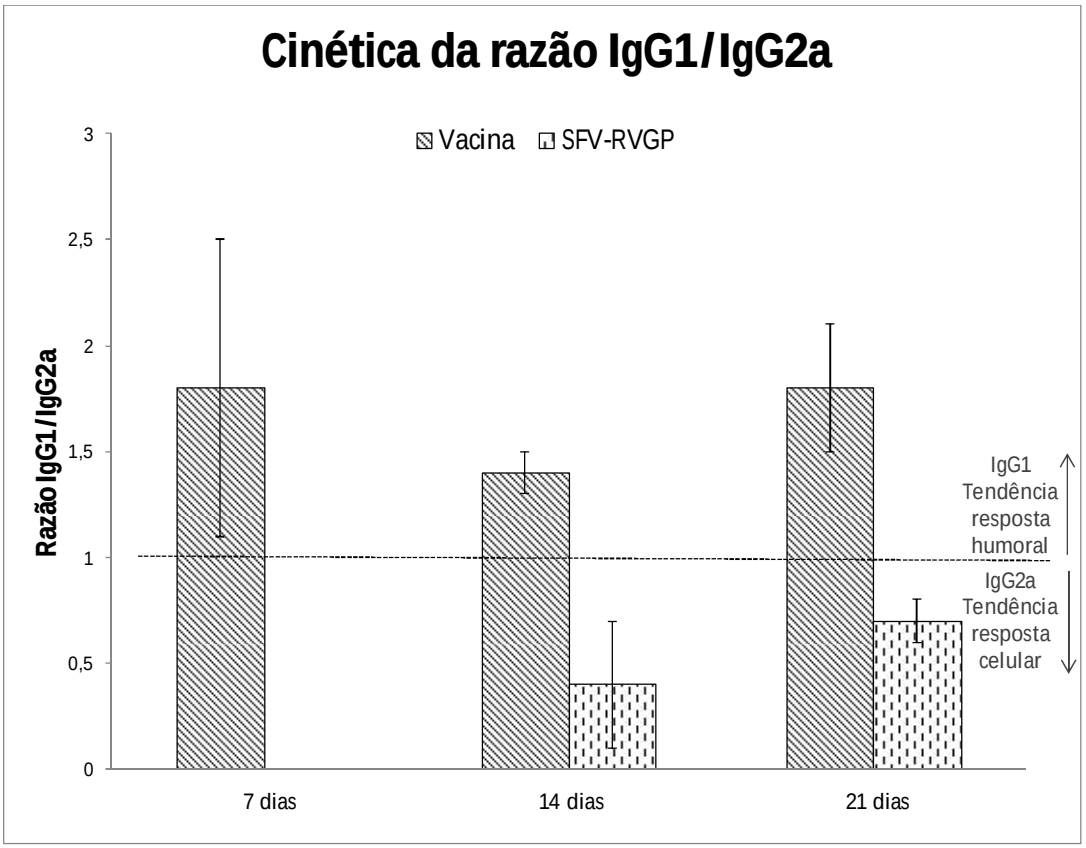
Camundongos BALB/C (n=3) foram imunizados via intraperitoneal conforme indicado, com duas doses de antígeno nos dias 0 e 14. As imunizações com vacina e rRVGPsol continham 1 µg RVGP/dose e as imunizações com SFV-RVGP continham $8{,}3x10^6$ partículas de SFV-RVGP/dose. A obtenção do soro foi feita através de sangrias via retro-orbital nos dias 20 e 50 após a primeira imunização. Anticorpos anti-glicoproteína do vírus da raiva foram dosados 20 e 50 dias do soro dos animais após a primeira dose de vacinação e seus resultados estão apresentados em unidades equivalentes por mililitro (EU/mL), anticorpos neutralizantes foram dosados do soro dos animais somente 50 dias após a primeira dose de vacinação e seus resultados são apresentados em unidades internacionais por mililitro (UI/mL). SFV-RVGP + 2x S2 $rRVGP_{sol}$: primeira dose com SFV-RVGP e segunda dose com rRVGP solubilizada de células S2.

Os resultados do ELISA mostram que após 20 dias da primeira dose a média do título dos animais foi acima do recomendado pela OMS em todos os grupos. Já após 50 dias os resultados de ELISA mostram que alguns animais do grupo vacinado somente com SFV-RVGP tiveram anticorpos acima de 0,5 UI/mL. Pelas análises de RFFIT todos os animais apresentaram anticorpos acima de 0,5 UI/mL.

Com relação a avaliação da resposta imunológica, a cinética de anticorpos dosados por ELISA mostra que os animais imunizados com SFV-RVGP não mostraram elevação ou estabilidade nos níveis de anticorpos IgG produzidos com intervalos de reforço superior a 7 dias. Já o grupo vacina e o grupo SFV-RVGP + reforço com rRVGP, mesmo com reforço superior a 7 dias, houve estabilidade no nível de anticorpos após 50 dias da primeira dose em alguns animais.

Analisamos ainda o padrão de produção de anticorpos do sub-classe IgG1 e IgG2a através da observação da cinética da síntese desses anticorpos em grupos de animais imunizados com vacina contra a raiva e SFV-RVGP (figura 20).

Figura 20. Síntese de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-glicoproteína do vírus da raiva. Cinética da razão IgG1 / IgG2a em animais imunizados com vacina contra raiva ou SFV-RVGP.



Camundongos BALB-C (n=5) foram imunizados via intraperitoneal conforme indicado, com três doses de antígeno nos dias 0, 7 e 14, com 1 µg RVGP/dose ou $8{,}3x10^6$ partículas de SFV-RVGP/dose. A obtenção do soro foi feita através de sangrias via retro-orbital nos dias 7, 14 e 21 após a primeira imunização. Anticorpos anti-glicoproteína do vírus da raiva de classe IgG1 e IgG2a foram dosados do soro dos animais 21 dias e seus resultados são apresentados pela razão do título de anticorpos IgG1 / título de anticorpos IgG2a.

As análises demonstram que nos animais vacinados com proteína associada a adjuvante (vacina comercial) a tendência da resposta imunológica é do tipo humoral (predominância de anticorpos do sub-classe IgG1) como já foi observado e, o nível de anticorpos é similar mesmo após as doses de reforço.

Nos animais vacinados com SFV-RVGP, como já foi descrito, o tipo de resposta imune predominante é o celular (maior quantidade de anticorpos do sub-classe IgG2a),

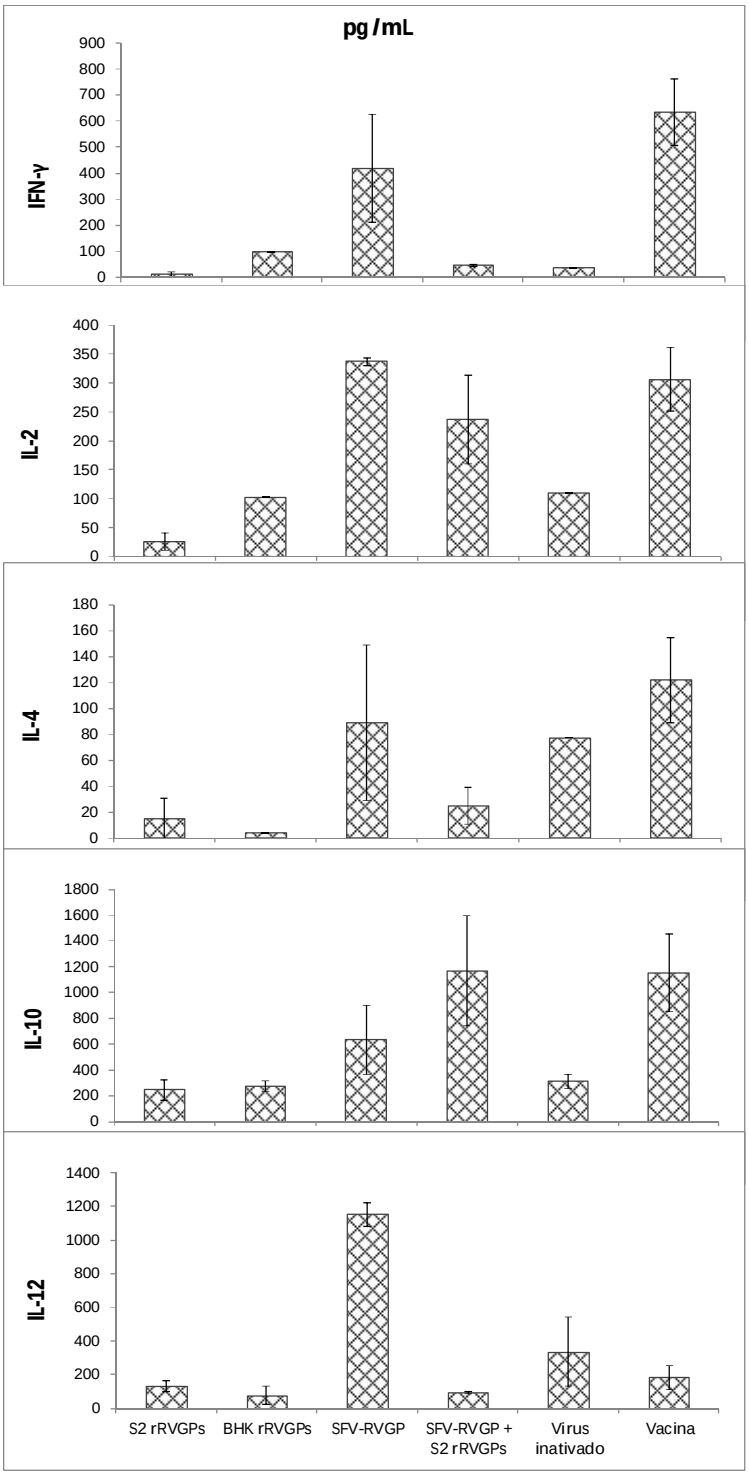
havendo uma tendência de equilíbrio com o decorrer das doses de reforço, porém a predominância ainda é de anticorpos do tipo IgG2a.

5.2.2 *Síntese de citocinas em animais imunizados com RVGP*

Para aprofundar o estudo do tipo de resposta imune predominante durante a imunização com rRVGP analisamos o padrão da expressão de citocinas *ex vivo* por esplenócitos murinos de animais imunizados com rRVGP e/ou SFV-RVGP (Figura 21).

Os resultados mostram que os linfócitos dos animais imunizados com vacina contra raiva e SFV-RVGP apresentaram boa produção de IFN-γ (600 e 400 pg/mL respectivamente, figura 21). Esses níveis de IFN-γ presentes nos cultivos de esplenócitos dos grupos SFV-RVGP e vacina contra raiva indicam que essas imunizações foram capazes de estimular fortemente o sistema imunológico, com potencial resposta Th1 e ativação macrofágica.

Figura 21. Síntese de citocinas em cultura de esplenócitos dos animais previamente imunizados.



Síntese de IFN-y, IL-2, IL-4, IL-10 e IL-12 por esplenócitos de camundongos imunizados. Esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com três doses, conforme indicado, nos dias 0, 7 e 14 (n=3) e retirados dos animais eutanasiados 21 dias após primeira dose, foram colocados em cultura e cultivados somente com meio de cultura. Os sobrenadantes das culturas foram retirados após 72h e analisados para a avaliação da concentração de IFN-γ, IL-2, IL-4, Il-10 e IL-12 por ELISA.

Em nossas análises, exceto nos grupos que foram vacinados com proteína sem adição de adjuvante (rRVGP e vírus inativado), o nível de IL-2 foi superior a 250 pg/mL.

A produção de IL-4 foi entre 20 e 120 pg/mL, exceto nos grupos que receberam somente proteína recombinante.

A síntese de IL-10 foi superior a 600 pg/mL somente nos grupos SFV-RVGP, SFV-RVGP + rRVGP e grupo vacina e a IL-12 foi expressa acima de 1000 pg/mL somente no grupo que recebeu apenas doses de SFV-RVGP.

6 DISCUSSÃO

Este trabalho faz parte e traz contribuições para as linhas de pesquisa desenvolvidas no Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan, em conjunto com outros laboratórios de outras instituições de ensino e pesquisa.

Um dos objetivos dessas linhas de pesquisa, que se relaciona a este trabalho, tem sido o estudo e desenvolvimento de células S2 de *Drosophila melanogaster* geneticamente modificadas, expressando a glicoproteína recombinante do vírus da raiva (rRVGP), para a obtenção de antígeno para fins de diagnóstico ou vacinal. Outro objetivo em comum, com contribuição importante deste trabalho, são os estudos de desenvolvimento de vetores vacinais envolvendo glicoproteínas virais, através da comparação entre imunogenicidade e caracterização da proteína sintetizada pelos diferentes sistemas (*Virus-like particules* – VLPs, SFV-RVGP, S2 rRVGP, vacina de DNA).

Esta tese também está diretamente associada à dissertação que desenvolvi durante o mestrado, em que foram realizados diversos estudos para a definição de um protocolo de cultivo otimizado para o crescimento de células S2 recombinantes e a expressão da rRVGP em biorreator (VENTINI, 2010; VENTINI et al., 2010).

A partir do protocolo estabelecido anteriormente, pudemos dar continuidade aos estudos de caracterização e purificação da rRVGP. Neste trabalho, a produção de rRVGP em biorreator (figura 10) atingiu aproximadamente 2,5 mg/L de rRVGP, comparável ao atingido anteriormente (VENTINI et al., 2010).

A instabilidade de proteínas recombinantes, sobretudo daquelas que apresentam glicosilação, é um problema comum no desenvolvimento, purificação e armazenamento de produtos farmacêuticos recombinantes (BUTLER, 2008). Nesse âmbito testamos a estabilidade da rRVGP produzida por células S2 e armazenada a -20 °C em tampão de congelamento contendo glicerol como agente crioprotetor. Por quase um ano conseguimos armazenar a rRVGP na membrana das células com uma perda de 40%. Duplicatas da mesma amostra foram armazenadas em pellet seco e já em seis meses apresentaram diminuição de mais de 50% da quantidade de rRVGP, o que mostra que nossa estratégia evita perda de mais de 50% da proteína (figura 12).

Para os protocolos de purificação, a escolha dos três detergentes utilizados foi baseada em um estudo com 15 detergentes, onde OG, CHAPS e DDM mostraram os melhores resultados para a solubilização da rRVGP em ensaio de *dot blotting* (BENMAAMAR et al., 2009). Apesar de utilizarmos o NP-40 para a solubilização da rRVGP para análise em ELISA,

por ter sido o detergente que apresentou melhor desempenho para solubilização e quantificação para este método (ASTRAY et al., 2008), em ensaio de *dot blotting* o NP-40 não promoveu uma solubilização semelhante aos outros três detergentes.

Os procedimentos de purificação com os detergentes DDM, CHAPS e OG apresentaram inicialmente em seus cromatogramas, picos de absorbância (frações F2-6, figura 13) correspondentes a proteínas contaminantes. Quando analisadas através do reconhecimento por anticorpo anti-histidina, maiores quantidades de rRVGP foram encontradas nas frações mais tardias de eluição (figura 14), revelando que as caudas de histidina levaram a uma maior adsorção da proteína à coluna de níquel. Porém apenas as frações da purificação feita com OG apresentaram resultado positivo quando analisadas através da detecção por anticorpo policlonal anti-glicoproteína do vírus da raiva. Além disso, os resultados mostraram que a quantidade de rRVGP presente nas frações da purificação com OG 1% era a maior dentre as analisadas (figura 14), seja por marcação anti-histidina ou anti-glicoproteína. Acreditamos que o tamanho da micela tenha influenciado na acessibilidade da cauda de histidina a coluna de níquel, uma vez que a histidina esta localizada na porção C-terminal da proteína, domínio intracitoplasmático, de tamanho reduzido e muito próximo à membrana plasmática e regiões hidrofóbicas da proteína, que certamente estão estabilizadas no interior da micela dos detergentes. Os detergentes utilizados, DDM, CHAPS e OG possuem 12, 10 e 8 carbonos em suas cadeias, respectivamente, variando o tamanho da micela (LIPFERT et al., 2007) e, consequentemente, a acessibilidade da cauda de histidina. Assim como o OG, o detergente NP-40 também possui uma cadeia alifática de 8 carbonos. Como comentado anteriormente, esse detergente vem sendo utilizado há anos com bons resultados na solubilização da rRVGP para fins analíticos. A partir dessas duas observações podemos afirmar que o tamanho da micela originado com essa quantidade de carbono é o melhor para à realização dos estudos com a rRVGP.

A partir desses resultados, uma maior quantidade de rRVGP foi solubilizada utilizando apenas OG 1%, submetida à IMAC, e eluída em dois estágios com tampão contendo 150 e 450 mM de imidazol. Essa condição permitiu que visualizássemos no cromatograma um leve aumento na absorbância (280 nm) referente à detecção de proteína entre as frações 7 e 8 (figura 15). Essas frações, quando analisadas por *western-blotting* (figura 17), apresentaram um “arrasto” na marcação, ao invés de bandas isoladas, o que pode ser associado à degradação da rRVGP ou à interação entre duas ou mais moléculas, formando agregados. Por outro lado, as frações de F10 a F12 mostraram uma única banda de aproximadamente 70 kDa (tamanho esperado para o monômero da rRVGP) na análise de *western-blotting* (figura 17).

Além disso, apresentaram pouca quantidade de proteína contaminante, como demonstrado no gel corado com prata (figura 16). Esse resultado confirma que a estratégia empregada é promissora, afinal existe ao menos uma população de rRVGP que foi adsorvida eficientemente à coluna e pôde ser eluída com boa separação dos contaminantes. São necessários mais alguns testes (variando tampões, pH e concentração de detergentes principalmente) para definir uma estratégia para melhor adsorção da rRVGP à coluna, e consequentemente melhorar sua recuperação.

A purificação da rRVGP sintetizada por células BHK-21 previamente infectadas por SFV-RVGP apresentou resultados diferentes da purificação da rRVGP produzida por células S2. Neste caso a rRVGP foi purificada em sua conformação trimérica (figura 19) e eluída exatamente nas concentrações entre 200-300 mM de imizadol, sendo identificada como apenas uma banda com aproximadamente 70 kDa de peso molecular (figura 18).

As diferenças nos resultados de purificação provavelmente são associadas aos diferentes padrões de modificações pós-traducionais presentes em células de inseto (S2) e células de mamíferos (BHK-21). Células de mamíferos e insetos possuem diferentes padrões de glicosilação, podendo uma proteína glicosilada ter sua bioatividade comprometida se for sintetizada por hospedeiros que não realizam modificações pós-traducionais complexas. As modificações pós-traducionais influenciam no *folding* da proteína interferindo na sua estabilidade e também na acessibilidade aos sítios de ligação (BUTLER, 2008). Pode ser que a rRVGP expressa pelas células S2 não tenha os sítios de ligação aos anticorpos expostos da mesma forma que a rRVGP sintetizada por células BHK-21. Isso também pode ocorrer com a exposição da cauda de histidina. Além de que a estabilidade da S2 rRVGP pode ser inferior a BHK rRVGP.

Mais estudos devem ser dirigidos à purificação da S2 rRVGP, tanto para a tentativa de obtenção da forma trimérica da proteína, quanto para obtenção de uma proteína pura monomérica para futuros estudos de padrões de glicosilação da rRVGP produzida por células de inseto (para a realização desses estudos é necessário que se obtenha os monômeros da RVGP purificados).

Os estudos de imunização contra a raiva foram realizados tendo como antígeno vacinal a rRVGP, produzida em células de inseto (S2) ou mamífero (BHK-21), sintetizadas *in vitro* (infecção de células BHK-21 com SFV-RVGP), ou sintetizada *in vivo* pela infecção das células do hospedeiro pelo SFV-RVGP.

A imunização com diferentes antígenos nos permitiu estudar a tendência da resposta imunológica contra a raiva, em condições diferentes de apresentação do antígeno ao sistema

imunológico. A rRVGP produzida por células S2, quando utilizada para imunização, se constitui em um agente vacinal composto por uma única proteína recombinante, enquanto a vacina contra raiva comercializada, embora também de natureza proteica, é constituída por vírus inativado, contendo também outras proteínas virais, associado ao adjuvante hidróxido de alumínio. Quando utilizamos o SFV-RVGP para imunização, a síntese da rRVGP é feita *in vivo* pelas células do hospedeiro que foram infectadas pelo SFV-RVGP. Neste caso o agente vacinal é um RNA que codifica para a rRVGP. Desta maneira estudamos diferentes formas de estimulo do sistema imune de camundongos. A vacinação com proteína (rRVGP ou vírus inativados) permite uma resposta imune com maior tendência a formação de anticorpos neutralizantes, como é o caso da vacina comercial fabricada com vírus rábico inativado. A vacinação com vetores virais contendo um RNA (SFV-RVGP) envolve uma ativação mais voltada à resposta imune do tipo celular, mas também com formação de anticorpos neutralizantes.

O nível de anticorpos encontrado foi superior ao mínimo exigido pela OMS (>0,5 UI/mL) após a segunda dose de imunização com rRVGP ancorada em fragmentos de membranas de células S2 (S2 rRVGPm) e rRVGP solubilizada a partir da membrana de células S2 (rRVGPs). Isso mostra uma preservação estrutural e biológica da proteína recombinante presente na membrana das células S2. A presença de anticorpos anti-glicoproteína do vírus da raiva nos animais imunizados com rRVGPs demonstra que conseguimos manter as características imunogênicas da proteína mesmo após extraí-la da membrana (tabela 2).

Esse resultado confirma a aplicabilidade da utilização de células de inseto para a produção de rRVGP com fins comerciais. Anteriormente, uma pesquisa com vacinação oral contra raiva em guaxinins, com glicoproteína recombinante do vírus da raiva expressa por células Sf9 infectadas por baculovirus recombinante, demonstrou que a glicoproteína expressa por células de inseto mostrou ser similar a glicoproteína nativa em relação a antigenicidade e imunogenicidade. A glicoproteína do vírus da raiva expressa por células Sf9 também apresentou imunogenicidade quando utilizada para vacinação oral em guaxinins (com duas doses de vacina contendo 100 µg de glicoproteína na primeira dose e 200 µg na segunda, depois de 7 semanas) (FU et al., 1993).

A não detecção de anticorpos anti-glicoproteína do vírus da raiva nos grupos imunizados com SFV-RVGP inativado com luz ultravioleta e SFV-GFP (controles negativos) (tabelas 2 e 3), demonstram que a atividade imunogênica do SFV-RVGP depende realmente de sua entrada nas células do animal imunizado e da transcrição do seu material genético

(RNA que codifica para a RVGP), e não de moléculas de rRVGP eventualmente presentes em seu envelope viral. Isso poderia ocorrer devido ao fato de a rRVGP ser produzida também durante a etapa de produção do vírus, sendo então possível que ela estivesse presente no envelope viral do SFV. Vale aqui enfatizar que existem trabalhos relatando que a interação das proteínas do envelope viral do SFV excluem as proteínas de membrana da célula do hospedeiro (LOPEZ et al., 1994; SKOGING et al., 1996; SUOMALAINEN; LILJESTRÖM; GAROFF, 1992; ZHAO; GAROFF, 1992).

Houve predominância de anticorpos da sub-classe IgG2a de resposta imunológica corresponde à maior tendência da resposta imune do tipo Th1, ou celular (KIM et al., 2014), como foi observado pela razão IgG1/IgG2a (<1) nos animais imunizados com preparações contendo SFV-RVGP (tabela 3). Diferentemente, os grupos imunizados com vacina ou proteína recombinante produziram mais anticorpos IgG1 (IgG1/IgG2a >1), embora a produção de anticorpos IgG2a não tenha sido ausente nesses grupos. De fato, algum estímulo da resposta celular é esperado, já que a glicoproteína do vírus da raiva possui epítopos que envolvem a ativação de linfócitos T citotóxicos durante a infecção viral (DESMÉZIÈRES et al., 1999).

Como os títulos de anticorpos anti-glicoproteína do vírus da raiva foram determinados pela utilização do *Platelia Rabies kit II*, um kit de ELISA comercial, e ainda há controvérsia sobre a relação entre esses títulos e a quantidade de anticorpos neutralizantes, em paralelo dosamos os anticorpos por um dos métodos mais tradicionais de titulação de anticorpos neutralizantes contra o vírus da raiva, a soro neutralização - RIFFIT (SERVAT et al., 2008; WASNIEWSKI et al., 2014), para comprovar se as proteínas produzidas por células S2 e SFV são processadas de maneira semelhante à nativa e induzem a formação de anticorpos neutralizantes. Como já citado, as proteínas produzidas por células de inseto podem apresentar diferenças conformacionais e pós traducionais quando comparadas às proteínas sintetizadas por células de mamíferos, por isso a importância de realizar ensaios de neutralização viral com o soro dos animais imunizados com rRVGP de células S2. Os resultados demonstraram que a titulação por ELISA, com títulos entre 2,5 – 4,2 EU/mL, não possuem diferença significativa quando comparados com o controle positivo (grupo vacina), sendo os menores títulos associados a vacinação com proteína (S2 rRVGP e vírus inativado). Por outro lado, o RFFIT apresentou títulos entre 1,7 – 23,8 UI/mL (sendo os menores resultados também associados a vacinação com as proteínas recombinantes, dados estatisticamente diferentes do grupo controle). Esses dados mostram que os títulos de

anticorpos neutralizantes foram sub-estimados pela titulação realizada por ELISA, algo que já foi observado anteriormente (WASNIEWSKI et al., 2014).

Como os dados mostraram que ao ser utilizada apenas proteína para vacinação os títulos de anticorpos contra o vírus da raiva são menores, a adição de adjuvante às preparações com proteína recombinante, etapa essencial na formulação vacinal, certamente deverá levar a um aumento nestes títulos de anticorpos. Já foi obtido esse tipo de resultado em um trabalho envolvendo vacina contra a raiva, quando camundongos vacinados com glicoproteína recombinante trimérica e solúvel, produzida por células HEK-293T, com e sem o adjuvante Matrix-M (adjuvante baseado em saponina que modula tanto resposta humoral quanto celular), apresentaram título de anticorpos neutralizantes de 1,99 e 12,56 UI/mL, respectivamente, e sobrevivência de 100% em ambos os casos. Os animais vacinados com glicoproteína recombinante monomérica, produzida por células Sf9 infectadas com baculovirus recombinante, também com 1 µg de glicoproteína/dose, com e sem o adjuvante, apresentaram título de anticorpos neutralizantes de 0,18 e 11,67 UI/mL, e sobrevivência 10% e 80%, respectivamente. Vacinas inativadas e proteínas geralmente geram uma resposta imune, celular ou humoral, insuficientes, requerendo uma associação à adjuvantes que sejam capazes de induzir um resposta imunológica protetora (VANDER VEEN; HARRIS; KAMRUD, 2012).

A produção de anticorpos e a resposta imune mediada por células são reconhecidamente importantes para a proteção contra a infecção pelo vírus da raiva (CHOPY et al., 2011; HOOPER et al., 1998; SAXENA et al., 2009; WEN et al., 2011). Nesse contexto analisamos a produção de algumas citocinas (IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IFN-γ) por esplenócitos *ex vivo*, para melhor caracterizar a resposta imunológica dos animais vacinados com SFV-RVGP e proteína recombinante.

A análise das citocinas permite avaliar a tendência da resposta imunológica estimulada por um determinado antígeno. Basicamente, através da proliferação de clones de células CD4+ Th1 e Th2 e do estudo da liberação de citocinas após estímulo com antígeno, é possível definir quais mecanismos imunológicos foram ativados contra o antígeno em estudo.

Células do tipo Th2 são produtoras de IL-4, uma citocina que induz a diferenciação dos linfócitos B e preferencialmente a produção de anticorpos IgG1, resultando em uma resposta imune humoral predominante. A produção de IL-10 também está relacionada à resposta imune humoral, inibindo a ativação de Th1 (NG; OLDSTONE, 2014).

As citocinas produzidas por linfócitos Th1, como o IFN-γ, resultam na produção de anticorpos IgG2a, promovendo uma tendência a resposta imune do tipo celular

(NIMMERJAHN; RAVETCH, 2005). A IL-2 é uma citocina envolvida principalmente na proliferação de linfócitos T e na indução de linfócitos T citotóxicos (CTLs), sendo mais especificamente ligada à resposta imune celular (WALDMANN, 2006). A análise da produção de IL-2 em animais imunizados contra a raiva foi ainda apontada como promissora para ser utilizada correlativamente aos testes NIH, onde a produção é associada a potência das vacinas (JOFFRET et al., 1991), assim como uma medida da imunidade e memória celular (PERRIN et al., 1988). A utilização de IL-2 para a terapia antirraiva, após exposição desse vírus, foi capaz de gerar sobrevivência em animais de laboratório (PERRIN et al., 1988), sendo portanto um fator frequentemente analisado em preparações destinadas à imunização contra a raiva (JOFFRET et al., 1990; KAUR; RAI; BHATNAGAR, 2009). A IL-12 tem como característica ser uma citocina ligada a diferenciação de células Th1 (IMANI FOOLADI et al., 2014).

Preparações vacinais com SFV portador de RNA heterólogo possuem, caracteristicamente, uma ativação da via de resposta celular Th1 com produção de IFN-γ e IL-2 (KLIMP et al., 2001; RAYNER; DRYGA; KAMRUD, 2002; RIEZEBOS-BRILMAN et al., 2006) e, preparações com proteínas associadas ao adjuvante hidróxido de alumínio tradicionalmente ativam resposta Th2, com produção de IL-4 e menor produção de IFN-γ (ULANOVA et al., 2001). Com relação a produção de IFN-γ pelos esplenócitos dos animais vacinados com SFV-RVGP, o resultado encontrado (~450 pg/mL) esta de acordo com um trabalho desenvolvido por Wu et al. (2014). Nesse trabalho o grupo de camundongos que foi vacinado com um pseudotipo recombinante de baculovirus que carrega o cDNA da glicoproteína do vírus da raiva (usando o promotor CMV para células de mamíferos), apresentou 500 pg/mL de IFN-γ produzidos pelos esplenócitos desses animais. Os autores discutem que a glicoproteína pôde ser processada endogenamente como em uma infecção natural ativando o sistema imune a produzir uma resposta específica e persistente, assim como sugere-se para a imunização com o SFV-RVGP.

Quando a produção de IFN-γ *in vitro* pelos animais vacinados com SFV-GFP foi analisada, os resultados encontrados foram baixos (em torno de 140 pg/mL, dados não mostrados), o que de certa forma reforça a importância das características e da qualidade do antígeno vacinal sendo expresso, pois está, neste caso, ligado ao IFN-γ produzido.

Na análise de citocinas houve uma tendência à maior síntese de IL-2 *in vitro* pelos esplenócitos do grupo que foi imunizado com SFV-RVGP (figura 21) e ainda os valores obtidos são semelhantes ao de um grupo que estudou a potência de diferentes vacinas através da produção de IL-2 *in vitro* (JOFFRET et al., 1991). Nesse trabalho, grupos que produziram

maiores concentrações de IL-2, foram os que apresentaram maior título de anticorpos, assim como nossos resultados onde os grupos SFV-RVGP e vacina comercial apresentaram o maior título de anticorpos e produção de IL-2. Comparando também nossos resultados aos de Kaur, Rai e Bhatnagar (2009), com vacina de DNA contra raiva, os valores de IL-2 nos grupos imunizados com SFV-RVGP foram cerca de 15 vezes superior, enquanto que nossas preparações com proteína recombinante tiveram valores semelhantes (~50 pg/mL). A expressão *in vitro* de IL-10 (que inibe células Th1) e IL-12 (que diferencia células Th1) foi de acordo com o descrito na literatura, onde o único grupo que expressou IL-12 acima de 1000 pg/mL foi o dos animais imunizados com SFV-RVGP.

Conforme esperado, o grupo de animais que recebeu a vacina comercial para imunização apresentou maior síntese de IL-10 (maior que 1000 pg/mL), pois a associação de proteína e adjuvante leva a uma maior tendência a reposta humoral. O grupo vacinado com SFV-RVGP e reforço com rRVGP também apresentou níveis de expressão de IL-10 equivalentes a 1000 pg/mL, aumentando a resposta imune do tipo humoral. Quanto aos níveis de IL-4, se compararmos o antígeno vacinal “vacina” e “vírus da raiva inativado”, a diferença entre eles é a presença de adjuvante (hidróxido de alumínio) e conservante, o que explica a maior produção de IL-4 no grupo vacina. Como já foi discutido nesse capítulo, a presença desse adjuvante é tradicionalmente caracterizada pela ativação Th2, com produção de IL-4 (ULANOVA et al., 2001). Os resultados dos grupos que receberam vacina e SFV-RVGP (~100 pg/mL de IL-4) são semelhante aos obtidos por Kaur, Rai e Bhatnagar (2009) utilizando vacina de DNA contra a raiva.

Os animais vacinados somente com proteína, sem adjuvante associado para modular a resposta imune (rRVGP e vírus inativado), não apresentaram uma resposta imunológica tão robusta quanto os animais imunizados com vacina comercial (assunto já abordado nesse capítulo). O grupo vacinado com SFV-RVGP, apesar de não utilizar adjuvante, apresentou também uma resposta imunológica robusta. O fato dos vetores virais recrutarem células dendríticas para o local de imunização durante uma vacinação os torna um agente imuno-estimulador, sendo menos importante o uso de adjuvantes (AMANN et al., 2013; HAIG, 2006; MCGUIRE; JOHNSTON; SYKES, 2012). Com relação ao SFV, durante a transcrição da fita de RNA, são formados RNAs dupla fita, que por sua vez ativam sistema imune inato através do receptor *Toll-like* 3, ativando a produção de IFN (principal citocina envolvida da resposta imune inata contra infecções virais), além de também ativarem e induzirem a maturação de células dendríticas (DCs) (FOURNIER; ZENG; SCHIRRMACHER, 2003; WANG et al., 2002). Esses vírus também infectam outros tipos de células que, devido à

infecção, apresentam morte por apoptose, liberando corpos apoptóticos que, contendo a proteína de interesse, são fagocitados e o antígeno é eficientemente apresentado por MHC classe I, num processo chamado *cross-priming* (SCHULZ et al., 2005). Essas características não foram nosso objetivo de estudo mas podem ter contribuído para a robusta resposta imunológica encontrada em nosso trabalho.

Analisando os esquemas de imunização com SFV-RVGP, vimos que quando os animais foram vacinados somente com uma dose, não observamos produção de anticorpos acima do mínimo exigido pela OMS (0,5 UI/mL, dados não mostrados). No entanto, quando essa mesma preparação foi utilizada para dose reforço, com sete dias de intervalo entre as doses, os níveis de anticorpos aumentaram, principalmente a sub-classe IgG1 (figura 20). Embora isso evidencie um balanço entre as respostas imune celular e humoral, fica ainda mais evidenciado pelos elevados níveis de IFN-γ e IL-12 liberados pelos esplenócitos cultivados *in vitro*, que a resposta celular é predominante nos animais vacinados com SFV-RVGP (figura 21).

A combinação da utilização de SFV-RVGP como dose inicial, seguida de reforço com rRVGP, talvez seja a estratégia de imunização mais adequada e completa, já que os títulos de anticorpos foram semelhantes ao dos animais que receberam três doses de vacina ou SFV-RVGP (tabela 3). Quando estudamos somente duas doses para imunização, a primeira dose com SFV-RVGP e reforço com rRVGP, mesmo após 50 dias da primeira dose o título de anticorpos foi superior 0,5 UI/mL em alguns animais (tabela 4), demonstrando estabilidade na resposta imunológica. Quando as duas imunizações foram feitas somente com SFV-RVGP, com intervalo de 14 dias entre elas, após 50 dias houve declínio no titulo de anticorpos.

Uma vantagem de se usar o vetor SFV para vacinação é que humanos geralmente não possuem anticorpos anti-SFV, o que poderia diminuir a eficiência da imunização (BERGLUND et al., 1999). Berglund et al. (1999) demonstraram que após a imunização de camundongos com SFV recombinante, a resposta imune contra o vetor SFV não impediu o reforço da resposta imune contra a proteína de interesse. Riezebos-Brilman et al. (2006) concluíram que a indução de resposta humoral com imunizações utilizando vetores de alfavírus varia bastante dependendo do antígeno, processamento e apresentação do antígeno e rota de imunização. No entanto, em todos os estudos, uma forte resposta imune celular foi induzida resultando em proteção (parcial ou total) contra os microorganismos específicos (BERGLUND et al., 1997, 1999; RIEZEBOS-BRILMAN et al., 2006).

Uma resposta balanceada, Th1/Th2 é um bom indício de que os animais foram eficazmente imunizados contra a raiva. A tendência ao equilíbrio dos anticorpos IgG1 e

IgG2a nos animais imunizados com SFV-RVGP mostra que esse vetor viral, apesar de ser bem descrito na literatura como ativador de resposta celular (KLIMP et al., 2001; RAYNER; DRYGA; KAMRUD, 2002; RIEZEBOS-BRILMAN et al., 2006) é também um ativador de resposta imunológica do tipo humoral, evidenciando seu uso como um possível agente imunizante. Há pesquisas sobre a importância de ativação de resposta imune humoral e celular nas terapias pré-exposição contra a raiva. Em estudos com animais depletados para células CD4, CD8 e CD4/CD8, Amann et al. (2013) relata que a taxa de sobrevivência ao desafio dos animais depletados foi 33%, 56% e 20%, respectivamente. Evidenciando a importância da indução de ambos os linfócitos na vacinação contra a raiva.

Em resumo, o desenvolvimento deste trabalho demonstrou que a nova linhagem de células S2 expressando a rRVGP com cauda de histidina (S2MtRVGP-H-His) mostrou crescimento celular em biorreator semelhante a outra linhagem que expressa rRVGP sem cauda de histidina.

O protocolo de purificação desenvolvido, que tem como base a metodologia de IMAC, promoveu a purificação da rRVGP monomérica que é importante para os estudos sobre glicosilação desta proteína. Ainda com relação a rRVGP monomérica, estudos recentes que associam monômeros e adjuvantes para vacinação contra raiva apresentaram 90% de sobrevivência após teste desafio (KORAKA et al., 2014), evidenciando a importância dessa preparação principalmente quando levamos em conta a dificuldade de se obter estabilidade da conformação trimérica da glicoproteína depois de purificada.

Nossas preparações, tanto de proteína recombinante quanto SFV-RVGP, quando utilizadas para imunização permitiu que os camundongos BALB/C produzissem anticorpos anti-glicoproteína do vírus da raiva e anticorpos neutralizantes acima do mínimo exigido pela OMS. Vale também ressaltar que as imunizações com SFV-RVGP (3 doses) apresentaram título de anticorpos semelhantes aos animais que receberam a vacina de uso comercial veterinária.

Este trabalho, que representou uma continuidade de projetos anteriores, permitiu mostrar a viabilidade de expressão da glicoproteína recombinante do vírus rábico, tanto *in vitro* como *in vivo*, abrindo promissoras possibilidades de desenvolvimento tecnológico e conceitual para novas vacinas contra raiva.

7 CONCLUSÕES

A produção de rRVGP em biorreator mostrou resultados semelhantes aos obtidos anteriormente (VENTINI, 2010), demonstrando que o protocolo de produção da glicoproteína recombinante em células S2 possui reprodutibilidade suficiente para fornecer material, em quantidade e qualidade adequadas, aos estudos de caracterização antigênica e imunogênica.

A purificação da rRVGP pela metodologia IMAC apresentou resultados promissores. Através dessa técnica, a rRVGP monomérica e trimérica pôde ser parcialmente purificada a partir de preparações membranárias de células S2 e BHK-21, respectivamente.

A produção de anticorpos neutralizantes anti-vírus da raiva (RFFIT) em animais imunizados com rRVGP produzida por células S2 demonstrou a capacidade desse vetor de expressão em produzir proteínas heterólogas com qualidade.

Uma melhor formulação da rRVGP extraída de células S2 ou BHK-21, pela adição de adjuvante imunomodulador, deve elevar o título de anticorpos em animais imunizados com essas preparações, assim como acontece com a vacina comercial quando comparada aos vírus apenas inativados.

A análise das citocinas (IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 e IFN-γ) e a dosagem de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-glicoproteína do vírus da raiva mostraram que o SFV-RVGP induziu, predominantemente uma resposta imune do tipo celular nos camundongos imunizados. Esse dado juntamente com os altos títulos de anticorpos anti-glicoproteína e neutralizantes encontrados, fazem do SFV-RVGP uma potencial preparação para a imunização contra a raiva e para o tratamento pós-exposição ao vírus.

A combinação da vacinação com SFV-RVGP e rRVGP parece ser a mais adequada para imunização contra raiva visto a intensidade e qualidade da resposta imune gerada.

REFERÊNCIAS*

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 3rd ed. New York: Garland Publishing, 1994.

ALVES, P. M. M.; CARRONDO, M. J. T.; CRUZ, P. E. Introdução à ttecnologia de Cultivo de Células Animais. In: MORAES, Â. M.; AUGUSTO, E.; CASTILHO, L. R. (Ed.). **Tecnologia do cultivo de células animais:** de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Roca, 2008. p. 2–13.

AMANN, R. et al. A new rabies vaccine based on a recombinant ORF virus (parapoxvirus) expressing the rabies virus glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 87, n. 3, p. 1618–1630, 2013.

ASTRAY, R. M. et al. Analytical approach for the extraction of recombinant membrane viral glycoprotein from stably transfected Drosophila melanogaster cells. **Biotechnology Journal**, v. 3, n. 1, p. 98–103, 2008.

ASTRAY, R. M. et al. Rabies virus glycoprotein and immune response pattern using recombinant protein or recombinant RNA viral vectors. **Vaccine**, v. 32, n. 24, p. 2829–2832, 2014.

AUBERT, M. F. A. Methods for the calculation of titres. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWISKI, H. (Ed.). **Laboratory Techniques in Rabies**. 4th ed. Geneva: WHO, 1996. p. 445–459 – Appendix n.3.

BATISTA, F. R. X. et al. Behavior of wild-type and transfected S2 cells cultured in two different media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, n. 1, p. 1–13, 2011.

BENMAAMAR, R. et al. High-level expression of rabies virus glycoprotein with the RNA-based Semliki Forest Virus expression vector. **Journal of Biotechnology**, v. 139, n. 4, p. 283–290, 2009.

BERGLUND, P. et al. Semliki Forest virus expression system: production of conditionally infectious recombinant particles. **Bio/technology (Nature Publishing Company)**, v. 11, n. 8, p. 916–920, 1993.

BERGLUND, P. et al. Outcome of immunization of cynomolgus monkeys with recombinant Semliki Forest virus encoding human immunodeficiency virus type 1 envelope protein and challenge with a high dose of SHIV-4 virus. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 13, n. 17, p. 1487–1495, 1997.

BERGLUND, P. et al. Immunization with recombinant Semliki Forest virus induces protection against influenza challenge in mice. **Vaccine**, v. 17, n. 5, p. 497–507, 1999.

*De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TECNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências, elaboração. Rio de Janeiro, 2002

BERNSTEIN, D. I. et al. Randomized, double-blind, Phase 1 trial of an alphavirus replicon vaccine for cytomegalovirus in CMV seronegative adult volunteers. **Vaccine**, v. 28, n. 2, p. 484–493, 2009.

BOVO, R. et al. Kinetic response of a Drosophila melanogaster cell line to different medium formulations and culture conditions. **Cytotechnology**, v. 57, n. 1, p. 23–35, 2008.

BRILLET, K. et al. Using EGFP fusions to monitor the functional expression of GPCRs in the Drosophila Schneider 2 cells. **Cytotechnology**, v. 57, n. 1, p. 101–109, 2008.

BRINSTER, C. et al. Hepatitis C virus non-structural protein 3-specific cellular immune responses following single or combined immunization with DNA or recombinant Semliki Forest virus particles. **The Journal of General Virology**, v. 83, pt. 2, p. 369–381, 2002.

BUCKINGHAM, S. D. et al. Wild-type and insecticide-resistant homo-oligomeric GABA receptors of Drosophila melanogaster stably expressed in a Drosophila cell line. **Neuropharmacology**, v. 35, n. 9-10, p. 1393–1401, 1996.

BURGER, S. R. et al. Stable expression of rabies virus glycoprotein in Chinese hamster ovary cells. **The Journal of General Virology**, v. 72, pt. 2, p. 359–367, 1991.

BUTLER, M. Modificações pós-traducionais em proteínas recombinantes. In: MORAES, Â. M.; CASTILHO, L. R.; AUGUSTO, E. DE F. P. (Ed.). **Tecnologia do cultivo de células animais:** de biofármacos a terapia gênica. Roca, 2008. p. 122–137.

CENNA, J. et al. Immune modulating effect by a phosphoprotein-deleted rabies virus vaccine vector expressing two copies of the rabies virus glycoprotein gene. **Vaccine**, v. 26, n. 50, p. 6405–6414, 2008.

CHANG, G. D. et al. Improvement of glycosylation in insect cells with mammalian glycosyltransferases. **Journal of Biotechnology**, v. 102, n. 1, p. 61–71, 2003.

CHEN, Q. et al. Immune efficacy of rabies virus glycoprotein expressed by baculovirus vector. **Chinese Journal of Virology**, v. 28, n. 5, p. 501–505, 2012.

CHERBAS, L.; MOSS, R.; CHERBAS, P. Transformation techniques for Drosophila cell lines. **Methods in Cell Biology**, v. 44, p. 161–179, 1994.

CHOPY, D. et al. The type I interferon response bridles rabies virus infection and reduces pathogenicity. **Journal of Neurovirology**, v. 17, n. 4, p. 353–367, 2011.

CHULASUGANDHA, P. et al. Cost comparison of rabies pre-exposure vaccination with post-exposure treatment in Thai children. **Vaccine**, v. 24, n. 9, p. 1478–1482, 2006.

CLEMENTS, D. E. et al. Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. **Vaccine**, v. 28, n. 15, p. 2705–2715, 2010.

COLMENERO, P. et al. Recombinant Semliki Forest virus vaccine vectors: the route of injection determines the localization of vector RNA and subsequent T cell response. **Gene Therapy**, v. 8, n. 17, p. 1307–1314, 2001.

COLOMBAGE, G. et al. DNA-based and alphavirus-vectored immunisation with prM and E proteins elicits long-lived and protective immunity against the flavivirus, Murray Valley encephalitis virus. **Virology**, v. 250, n. 1, p. 151–163, 1998.

COX, J. H.; DIETZSCHOLD, B.; SCHNEIDER, L. G. Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. **Infection and Immunity**, v. 16, n. 3, p. 754–759, 1977.

CYTOTECHNOLOGY. v. 57, n. 1, 2010. Disponível em: <https://www.deepdyve.com/browse/journals/cytotechnology/2008/v57/i1>. Acesso em: 12 nov. 2014.

DEBRÉ, R.; CELLERS, J. Clinical Virology. The Evaluation and Management of Human Viral Infections. **Annals of Internal Medicine**, v. 74, n. 3, p. 461–461, 1971.

DELAGNEAU, J.-F.; PERRIN, P.; ATANASIU, P. Structure of the rabies virus: Spatial relationships of the proteins G, M1, M2 and N. **Annales de l'Institut Pasteur / Virologie**, v. 132, n. 4, p. 473–493, 1981.

DEML, L.; WOLF, H.; WAGNER, R. High level expression of hepatitis B virus surface antigen in stably transfected Drosophila Schneider-2 cells. **Journal of Virological Methods**, v. 79, n. 2, p. 191–203, 1999.

DE MOURA, W. C. et al. Validation of a virus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulins in a two-center study. **Journal of Virological Methods**, v. 154, n. 1-2, p. 7–13, 2008.

DESMÉZIÈRES, E. et al. Lyssavirus glycoproteins expressing immunologically potent foreign B cell and cytotoxic T lymphocyte epitopes as prototypes for multivalent vaccines. **The Journal of General Virology**, v. 80, pt. 9, p. 2343–2351, 1999.

DICIOMMO, D. P.; BREMNER, R. Rapid, high level protein production using DNA-based Semliki Forest virus vectors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 29, p. 18060–18066, 1998.

DIETZSCHOLD, B. et al. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 1, p. 70–74, 1983.

DOS SANTOS, A. S. et al. Rabies virus glycoprotein expression in Drosophila S2 cells: influence of re-selection on protein expression. **Biotechnology Journal**, v. 4, n. 11, p. 1578–1581, 2009.

DOYLE, A.; GRIFFTHS, J. The cell: selection and standardization. In:_____. **Cell and tissue culture:** laboratory procedures in biotechnology. Wiley and Sons, 1998. p. 35 –52.

EDELMAN, R. et al. Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine TSI-GSD-218. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 6, p. 681–685, 2000.

ERTL, H. C. et al. Induction of rabies virus-specific T-helper cells by synthetic peptides that carry dominant T-helper cell epitopes of the viral ribonucleoprotein. **Journal of Virology**, v. 63, n. 7, p. 2885–2892, 1989.

EVANGELISTA DYR, J.; SUTTNAR, J. Separation used for purification of recombinant proteins. **Journal of Chromatography, Biomedical Sciences and Applications**, v. 699, n. 1-2, p. 383–401, 1997.

FEHLNER-GARDINER, C. et al. Comparing ONRAB® AND RABORAL V-RG® oral rabies vaccine field performance in raccoons and striped skunks, New Brunswick, Canada, and Maine, USA. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 48, n. 1, p. 157–167, 2012.

FLEETON, M. N. et al. Recombinant Semliki Forest virus particles expressing louping ill virus antigens induce a better protective response than plasmid-based DNA vaccines or an inactivated whole particle vaccine. **The Journal of General Virology**, v. 81, pt. 3, p. 749–758, 2000.

FOURNIER, P.; ZENG, J.; SCHIRRMACHER, V. Two ways to induce innate immune responses in human PBMCs: paracrine stimulation of IFN-alpha responses by viral protein or dsRNA. **International Journal of Oncology**, v. 23, n. 3, p. 673–680, 2003.

FRESHNEY, R. I. **Animal cell culture:** a practical approach. Oxford [England]; New York: IRL Press at Oxford University Press, 1992.

FUJII, H. et al. Target cells of cytotoxic T lymphocytes directed to the individual structural proteins of rabies virus. **Microbiology and Immunology**, v. 38, n. 9, p. 721–726, 1994.

FU, Z. F. et al. Rabies virus nucleoprotein expressed in and purified from insect cells is efficacious as a vaccine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 5, p. 2001–2005, 1991.

FU, Z. F. et al. Oral vaccination of racoons (Procyon lotor) with baculovirus-expressed rabies virus glycoprotein. **Vaccine**, v. 11, n. 9, p. 925–928, 1993.

GALESI, A. L. L. et al. Growth of recombinant Drosophila melanogaster Schneider 2 cells producing rabies virus glycoprotein in bioreactor employing serum-free medium. **Cytotechnology**, v. 57, n. 1, p. 73–81, 2008.

GAUDIN, Y. et al. Rabies virus glycoprotein is a trimer. **Virology**, v. 187, n. 2, p. 627–632, 1992.

GEISLER, C.; JARVIS, D. Insect cell glycosylation patterns in the context of biopharmaceuticals. In: WALSH, G. (Ed.). **Post-translational Modification of Protein Biopharmaceuticals**. [s.l.] Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009. p. 165–191.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning:** a laboratory manual. 4th ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

GUPTA, P. K. et al. Immunogenic and antigenic properties of recombinant soluble glycoprotein of rabies virus. **Veterinary Microbiology**, v. 108, n. 3-4, p. 207–214, 2005.

HAIG, D. M. Orf virus infection and host immunity. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 19, n. 2, p. 127–131, 2006.

HANKE, T. et al. Construction and immunogenicity in a prime-boost regimen of a Semliki Forest virus-vectored experimental HIV clade A vaccine. **The Journal of General Virology**, v. 84, n. Pt 2, p. 361–368, 2003.

HENAO, L. F.; CORTÉS, F.; NAVAS, M. C. Semliki Forest Virus: a viral vector with multiple applications. **Colombia Médica**, v. 38, n. 2, p. 159–169, 2007.

HICKEY, J. M. et al. Mechanism of a decrease in potency for the recombinant influenza a virus hemagglutinin H3 antigen during storage. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 3, p. 821–827, 2014.

HOOPER, D. C. et al. Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system. **Journal of Virology**, v. 72, n. 5, p. 3711–3719, 1998.

HUCKRIEDE, A. et al. Induction of cytotoxic T lymphocyte activity by immunization with recombinant Semliki Forest virus: indications for cross-priming. **Vaccine**, v. 22, n. 9-10, p. 1104–1113, 2004.

HU, R. L. et al. Experimental immunization of cats with a recombinant rabies-canine adenovirus vaccine elicits a long-lasting neutralizing antibody response against rabies. **Vaccine**, v. 25, n. 29, p. 5301–5307, 2007.

IKONOMOU, L.; SCHNEIDER, Y.-J.; AGATHOS, S. N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, n. 1, p. 1–20, 2003.

IMANI FOOLADI, A. A. et al. Cellular immunity survey against urinary tract infection using pVAX/fimH cassette with mammalian and wild type codon usage as a DNA vaccine. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, v. 3, n. 2, p. 185–193, 2014.

IVEY-HOYLE, M. et al. Envelope glycoproteins from biologically diverse isolates of immunodeficiency viruses have widely different affinities for CD4. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 2, p. 512–516, 1991.

IVEY-HOYLE, M. Recombinant gene expression in cultured Drosophila melanogaster cells. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 2, n. 5, p. 704–707, 1991.

JOFFRET, M. L. et al. Enhancement of interleukin-2 activity by liposomes. **Vaccine**, v. 8, n. 4, p. 385–389, 1990.

JOFFRET, M. L. et al. Appraisal of rabies vaccine potency by determination of in vitro, specific interleukin-2 production. **Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization**, v. 19, n. 2, p. 113–123, 1991.

JOHNSON, N.; CUNNINGHAM, A. F.; FOOKS, A. R. The immune response to rabies virus infection and vaccination. **Vaccine**, v. 28, n. 23, p. 3896–3901, 2010.

JORGE, S. A. C. et al. Expression of the hepatitis B virus surface antigen in Drosophila S2 cells. **Cytotechnology**, v. 57, n. 1, p. 51–59, 2008.

JUNGBAUER, A.; BOSCHETTI, E. Manufacture of recombinant proteins with safe and validated chromatographic sorbents. **Journal of Chromatography, Biomedical Applications**, v. 662, n. 2, p. 143–179, 1994.

KAUR, M.; RAI, A.; BHATNAGAR, R. Rabies DNA vaccine: no impact of MHC class I and class II targeting sequences on immune response and protection against lethal challenge. **Vaccine**, v. 27, n. 15, p. 2128–2137, 2009.

KIENY, M. P. et al. Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. **Nature**, v. 312, n. 5990, p. 163–166, 1984.

KIM, S.-H. et al. Newcastle Disease Virus Vector Producing Human Norovirus-like Particles Induces Serum, Cellular, and Mucosal Immune Responses in Mice. **Journal of Virology**, 2014.

KING, A. M. et al. **Virus Taxonomy:** Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Waltham, MA: Elsevier, 2011.

KLEPFER, S. R. et al. Characterization of rabies glycoprotein expressed in yeast. **Archives of Virology**, v. 128, n. 3-4, p. 269–286, 1993.

KLIMP, A. H. et al. Activation of peritoneal cells upon in vivo transfection with a recombinant alphavirus expressing GM-CSF. **Gene Therapy**, v. 8, n. 4, p. 300–307, 2001.

KORAKA, P. et al. A recombinant rabies vaccine expressing the trimeric form of the glycoprotein confers enhanced immunogenicity and protection in outbred mice. **Vaccine**, 2014.

KOSER, M. L. et al. Rabies virus nucleoprotein as a carrier for foreign antigens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 25, p. 9405–9410, 2004.

KUJALA, P. et al. Biogenesis of the Semliki Forest virus RNA replication complex. **Journal of Virology**, v. 75, n. 8, p. 3873–3884, 2001.

LATHE, R. F. et al. M13 bacteriophage vectors for the expression of foreign proteins in Escherichia coli: the rabies glycoprotein. **Journal of Molecular and Applied Genetics**, v. 2, n. 4, p. 331–342, 1984.

LAWSON, K. F.; CRAWLEY, J. F. The ERA Strain of Rabies Vaccine. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 36, n. 4, p. 339–344, 1972.

LECOCQ, J. P. et al. New rabies vaccine: Recombinant DNA approches. In: KOPROWSKI, H. (Ed.). **Koprowski World'S Debt to Pasteur**. John Wiley & Sons Inc, 1985. p. 259–271.

LEMOS, M. A. N. et al. Rabies virus glycoprotein expression in Drosophila S2 cells. I: design of expression/selection vectors, subpopulations selection and influence of sodium butyrate and culture medium on protein expression. **Journal of Biotechnology**, v. 143, n. 2, p. 103–110, 2009.

LEMOS, M. A. N. **Construção e transfecção de vetores plasmidiais contendo o gene da glicoproteína do vírus da raiva (GPV) em células de Drosophila melanogaster**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

LEO, P. et al. Células animais: conceitos básicos. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E.; CASTILHO, L. R. (Ed.). **Tecnologia do cultivo de células animais:** de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Roca, 2008. p. 15 – 41.

LESER, E. W.; ASENJO, J. A. Rational design of purification processes for recombinant proteins. **Journal of Chromatography**, v. 584, n. 1, p. 43–57, 1992.

LILJESTRÖM, P.; GAROFF, H. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. **Bio/technology (Nature Publishing Company)**, v. 9, n. 12, p. 1356–1361, 1991.

LILJESTRÖM, P.; GAROFF, H. Expression of proteins using Semliki Forest virus vectors. In: AUSUBEL, F. M. et al. **Current protocols in molecular biology**. 2001. Chap. 16, p. Unit16.

LIPFERT, J. et al. Size and shape of detergent micelles determined by small-angle X-ray scattering. **The Journal of Physical Chemistry. B**, v. 111, n. 43, p. 12427–12438, 2007.

LOPEZ, S. et al. Nucleocapsid-glycoprotein interactions required for assembly of alphaviruses. **Journal of Virology**, v. 68, n. 3, p. 1316–1323, 1994.

LUNDSTROM, K. et al. Semliki Forest virus vectors for in vitro and in vivo applications. **Gene Therapy and Molecular Biology**, v. 4, p. 23–31, 1999.

LUNDSTROM, K. et al. Novel Semliki Forest virus vectors with reduced cytotoxicity and temperature sensitivity for long-term enhancement of transgene expression. **Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 7, n. 2, p. 202–209, 2003.

LUNDSTROM, K. Alphavirus-based vaccines. **Viruses**, v. 6, n. 6, p. 2392–2415, 2014.

LU, Y. E.; KIELIAN, M. Semliki forest virus budding: assay, mechanisms, and cholesterol requirement. **Journal of Virology**, v. 74, n. 17, p. 7708–7719, 2000.

MAINGUY, J. et al. Oral rabies vaccination in raccoons: comparison of ONRAB® and RABORAL V-RG® vaccine-bait field performance in Québec, Canada and Vermont, USA. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 49, n. 1, p. 190–193, 2013.

MALERCZYK, C. et al. Duration of immunity: an anamnestic response 14 years after rabies vaccination with purified chick embryo cell rabies vaccine. **Journal of Travel Medicine**, v. 14, n. 1, p. 63–64, 2007.

MASATANI, T. et al. Rabies Virus Nucleoprotein Functions to Evade Activation of the RIG-I-Mediated Antiviral Response. **Journal of Virology**, v. 84, n. 8, p. 4002–4012, 2010.

MCCARROLL, L.; KING, L. A. Stable insect cell cultures for recombinant protein production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 5, p. 590–594, 1997.

MCGARVEY, P. B. et al. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. **Bio/Technology (Nature Publishing Company)**, v. 13, n. 13, p. 1484–1487, 1995.

MCGUIRE, M. J.; JOHNSTON, S. A.; SYKES, K. F. Novel immune-modulator identified by a rapid, functional screen of the parapoxvirus ovis (Orf virus) genome. **Proteome Science**, v. 10, n. 1, p. 4, 2012.

MESLIN, F.-X.; BRIGGS, D. J. Eliminating canine rabies, the principal source of human infection: what will it take? **Antiviral Research**, v. 98, n. 2, p. 291–296, 2013.

MIFUNE, K.; OHUCHI, M.; MANNEN, K. Hemolysis and cell fusion by rhabdoviruses. **FEBS Letters**, v. 137, n. 2, p. 293–297, 1982.

MOCHIZUKI, H. et al. High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. **Journal of Virology**, v. 72, n. 11, p. 8873–8883, 1998.

MORAES, A. M. et al. Drosophila melanogaster S2 cells for expression of heterologous genes: From gene cloning to bioprocess development. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 613–628, 2012.

MORAES, Â. M.; CASTILHO, L. R.; BUENO, S. M. A. Processos de purificação de produtos. In: **Tecnologia do cultivo de células animais:** de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Roca, 2008. p. 289–317.

MORIMOTO, K.; KAWAI, A.; MIFUNE, K. Comparison of rabies virus G proteins produced by cDNA-transfected animal cells that display either inducible or constitutive expression of the gene. **The Journal of General Virology**, v. 73, pt. 2, p. 335–345, 1992.

NG, C. T.; OLDSTONE, M. B. A. IL-10: achieving balance during persistent viral infection. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 380, p. 129–144, 2014.

NIEDERHÄUSER, S. et al. A synthetic peptide encompassing the G5 antigenic region of the rabies virus induces high avidity but poorly neutralizing antibody in immunized animals. **Vaccine**, v. 26, n. 52, p. 6749–6753, 2008.

NIMMERJAHN, F.; RAVETCH, J. V. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. **Science**, v. 310, n. 5753, p. 1510–1512, 2005.

NÚÑEZ, E. G. F. et al. Semliki forest virus as a vector: pros and cons for its use in biopharmaceuticals production. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 5, p. 859–866, 2013.

OKUMURA, A.; HARTY, R. N. Rabies virus assembly and budding. **Advances in Virus Research**, v. 79, p. 23–32, 2011.

OSAKADA, F.; CALLAWAY, E. M. Design and generation of recombinant rabies virus vectors. **Nature Protocols**, v. 8, n. 8, p. 1583–1601, 2013.

PAMBOUKIAN, M. M. et al. Insect cells respiratory activity in bioreactor. **Cytotechnology**, v. 57, n. 1, p. 37–44, 2008.

PÉREZ, O.; PAOLAZZI, C. C. Production methods for rabies vaccine. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 340–347, 1997.

PERRIN, P. et al. Interleukin-2 production in vitro: a new approach to the study of rabies vaccine immunogenicity as appraised by testing different glycoprotein presentations. **Vaccine**, v. 6, n. 4, p. 331–338, 1988.

PERRIN, P.; THIBODEAU, L.; SUREAU, P. Rabies immunosome (subunit vaccine) structure and immunogenicity. Pre- and post-exposure protection studies. **Vaccine**, v. 3, n. 3, p. 325–332, 1985.

PFEIFER, T. A. Expression of heterologous proteins in stable insect cell culture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 518–521, 1998.

PUGLIA, A. L. P. et al. Quantitative RT-PCR for titration of replication-defective recombinant Semliki Forest virus. **Journal of Virological Methods**, v. 193, n. 2, p. 647–652, 2013.

QUETGLAS, J. I. et al. Alphavirus vectors for cancer therapy. **Virus Research**, v. 153, n. 2, p. 179–196, 2010.

RAVISH, H. S. Pre-exposure prophylaxis against rabies in children: Safety of purified chick embryo cell rabies vaccine (Vaxirab N) when administered by intradermal route. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 10, n. 2, p. 319–320, 2014.

RAYNER, J. O.; DRYGA, S. A.; KAMRUD, K. I. Alphavirus vectors and vaccination. **Reviews in Medical Virology**, v. 12, n. 5, p. 279–296, 2002.

REGENMORTEL, M. H. V. VAN et al. **Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego; San Francisco; New York etc.: Academic Press, 2000.

RENDIC, D.; WILSON, I. B. H.; PASCHINGER, K. **The Glycosylation Capacity of Insect Cells**. v. 81, p. 7–21, 2008.

RIEZEBOS-BRILMAN, A. et al. Recombinant alphaviruses as vectors for anti-tumour and anti-microbial immunotherapy. **Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 35, n. 3, p. 233–243, 2006.

ROJAS-ANAYA, E. et al. Expression of rabies virus G protein in carrots (Daucus carota). **Transgenic Research**, v. 18, n. 6, p. 911–919, 2009.

ROLLIER, C. et al. Modulation of vaccine-induced immune responses to hepatitis C virus in rhesus macaques by altering priming before adenovirus boosting. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 5, p. 920–929, 2005.

RUPPRECHT, C. E. et al. Evidence for a 4-dose vaccine schedule for human rabies post-exposure prophylaxis in previously non-vaccinated individuals. **Vaccine**, v. 27, n. 51, p. 7141–7148, 2009.

SAKAMOTO, S. et al. Studies on the structures and antigenic properties of rabies virus glycoprotein analogues produced in yeast cells. **Vaccine**, v. 17, n. 3, p. 205–218, 1999.

SAXENA, S. et al. Induction of immune responses and protection in mice against rabies using a self-replicating RNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 1-2, p. 36–44, 2009.

SCHULZ, O. et al. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. **Nature**, v. 433, n. 7028, p. 887–892, 2005.

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Manual Prático sobre Usos e Cuidados Éticos de Animais de Laboratório**, 2010.

SEPULVEDA, L.; LISSI, E.; QUINA, F. Interactions of neutral molecules with ionic micelles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 25, n. 1, p. 1–57, 1986.

SERVAT, A. et al. Inter-laboratory trial to evaluate the reproducibility of a new ELISA to detect rabies antibodies in vaccinated domestic and wild carnivores. **Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization**, v. 36, n. 1, p. 19–26, 2008.

SHAKIN-ESHLEMAN, S. H. et al. N-linked glycosylation of rabies virus glycoprotein. Individual sequons differ in their glycosylation efficiencies and influence on cell surface expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 15, p. 10690–10698, 1992.

SHIN, H. S.; CHA, H. J. Facile and statistical optimization of transfection conditions for secretion of foreign proteins from insect Drosophila S2 cells using green fluorescent protein reporter. **Biotechnology Progress**, v. 18, n. 6, p. 1187–1194, 2002.

SHIN, H. S.; LIM, H. J.; CHA, H. J. Quantitative monitoring for secreted production of human interleukin-2 in stable insect Drosophila S2 cells using a green fluorescent protein fusion partner. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 1, p. 152–157, 2003.

SISSOËFF, L. et al. Stable trimerization of recombinant rabies virus glycoprotein ectodomain is required for interaction with the p75NTR receptor. **The Journal of General Virology**, v. 86, n. Pt 9, p. 2543–2552, 2005.

SKOGING, U. et al. Aromatic interactions define the binding of the alphavirus spike to its nucleocapsid. **Structure** (London, England: 1993), v. 4, n. 5, p. 519–529, 1996.

SMERDOU, C.; LILJESTRÖM, P. Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki forest virus particles. **Journal of Virology**, v. 73, n. 2, p. 1092–1098, 1999.

SMITH, J. S.; YAGER, P. A.; BAER, G. M. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWISKI, H. (Ed.). **Laboratory Techniques in Rabies**. 4th ed. Geneve: WHO, 1996. p. 181–192.

SUNDBÄCK, M. et al. Efficient expansion of HIV-1-specific T cell responses by homologous immunization with recombinant Semliki Forest virus particles. **Virology**, v. 341, n. 2, p. 190–202, 2005.

SUOMALAINEN, M.; LILJESTRÖM, P.; GAROFF, H. Spike protein-nucleocapsid interactions drive the budding of alphaviruses. **Journal of Virology**, v. 66, n. 8, p. 4737–4747, 1992.

SUWANSRINON, K. et al. Survival of neutralizing antibody in previously rabies vaccinated subjects: a prospective study showing long lasting immunity. **Vaccine**, v. 24, n. 18, p. 3878–3880, 2006.

SWIECH, K. et al. Characterization of growth and metabolism of Drosophila melanogaster cells transfected with the rabies-virus glycoprotein gene. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 49, pt. 1, p. 41–49, 2008a.

SWIECH, K. et al. Enhanced production of recombinant rabies virus glycoprotein (rRVGP) by Drosophila melanogaster S2 cells through control of culture conditions. **Cytotechnology**, v. 57, n. 1, p. 67–72, 2008b.

SWIECH, K. et al. Bioreactor culture of recombinant Drosophila melanogaster S2 cells: characterization of metabolic features related to cell growth and production of the rabies virus glycoprotein. **Cytotechnology**, v. 57, n. 1, p. 61–66, 2008c.

TANFORD, C. et al. Molecular characterization of proteins in detergent solutions. **Biochemistry**, v. 13, n. 11, p. 2369–2376, 1974.

THOULOUZE, M. I. et al. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. **Journal of Virology**, v. 72, n. 9, p. 7181–7190, 1998.

TUCHIYA, K. et al. Characterization of rabies virus glycoprotein expressed by recombinant baculovirus. **Virus Research**, v. 25, n. 1-2, p. 1–13, 1992.

ULANOVA, M. et al. The Common vaccine adjuvant aluminum hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 2, p. 1151–1159, 2001.

VAN DEN BERGH, J. M. J. et al. HPV vaccine stimulates cytotoxic activity of killer dendritic cells and natural killer cells against HPV-positive tumour cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 2014.

VANDER VEEN, R. L.; HARRIS, D. L. H.; KAMRUD, K. I. Alphavirus replicon vaccines. **Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2012.

VARKI, A. et al. (Ed.). **Essentials of glycobiology**. 2nd. ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.

VÁSQUEZ-ALVAREZ, E.; LIENQUEO, M. E.; PINTO, J. M. Optimal synthesis of protein purification processes. **Biotechnology progress**, v. 17, n. 4, p. 685–696, 2001.

VÉNIEN-BRYAN, C.; FULLER, S. D. The organization of the spike complex of Semliki Forest virus. **Journal of molecular biology**, v. 236, n. 2, p. 572–583, 1994.

VENTINI, D. C. **Desenvolvimento de bioprocessos com células S2 e CHO em biorreatores para produção de proteínas**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

VENTINI, D. C. et al. Recombinant rabies virus glycoprotein synthesis in bioreactor by transfected Drosophila melanogaster S2 cells carrying a constitutive or an inducible promoter. **Journal of Biotechnology**, v. 146, n. 4, p. 169–172, 2010.

VENTINI, D. C. et al. Improved bioprocess with CHO-hTSH cells on higher microcarrier concentration provides higher overall biomass and productivity for rhTSH. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 4, p. 401–409, 2011.

VIEIRA, P. B. et al. Culturing Drosophila melanogaster (S2) in a chemostat. **Biotechnology Letters**, p. 1–6, 2014.

VIGNUZZI, M. et al. Naked RNA immunization with replicons derived from poliovirus and Semliki Forest virus genomes for the generation of a cytotoxic T cell response against the influenza A virus nucleoprotein. **The Journal of General Virology**, v. 82, pt. 7, p. 1737–1747, 2001.

WAHLBERG, J. M. et al. Membrane fusion of Semliki Forest virus involves homotrimers of the fusion protein. **Journal of Virology**, v. 66, n. 12, p. 7309–7318, 1992.

WALDMANN, T. A. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 8, p. 595–601, 2006.

WANG, L. et al. Noncoding RNA danger motifs bridge innate and adaptive immunity and are potent adjuvants for vaccination. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 8, p. 1175–1184, 2002.

WANG, X. et al. Oral immunisation of mice with a recombinant rabies virus vaccine incorporating the heat-labile enterotoxin B subunit of Escherichia coli in an attenuated Salmonella strain. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 2, p. 675–681, 2012.

WASNIEWSKI, M. et al. Evaluation of a rabies ELISA as an alternative method to seroneutralisation tests in the context of international trade of domestic carnivores. **Journal of Virological Methods**, v. 195, p. 211–220, 2014.

WEN, Y. et al. Rabies virus expressing dendritic cell-activating molecules enhances the innate and adaptive immune response to vaccination. **Journal of Virology**, v. 85, n. 4, p. 1634–1644, 2011.

WHITE, J.; MATLIN, K.; HELENIUS, A. Cell fusion by Semliki Forest, influenza, and vesicular stomatitis viruses. **The Journal of Cell Biology**, v. 89, n. 3, p. 674–679, 1981.

WIKTOR, T. J. et al. Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 22, p. 7194–7198, 1984.

WOJCZYK, B. S. et al. The role of site-specific N-glycosylation in secretion of soluble forms of rabies virus glycoprotein. **Glycobiology**, v. 8, n. 2, p. 121–130, 1998.

WOJCZYK, B. S. et al. N-glycosylation at one rabies virus glycoprotein sequon influences N-glycan processing at a distant sequon on the same molecule. **Glycobiology**, v. 15, n. 6, p. 655–666, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Rabies**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/>. Acesso em: 6 jun. 2014.

WU, Q. et al. Rabies-virus-glycoprotein-pseudotyped recombinant baculovirus vaccine confers complete protection against lethal rabies virus challenge in a mouse model. **Veterinary Microbiology**, v. 171, n. 1-2, p. 93–101, 2014.

WU, X.; SMITH, T. G.; RUPPRECHT, C. E. From brain passage to cell adaptation: the road of human rabies vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, v. 10, n. 11, p. 1597–1608, 2011.

XIANG, Z. Q. et al. Protection of non-human primates against rabies with an adenovirus recombinant vaccine. **Virology**, v. 450-451, p. 243–249, 2014.

YAMADA, K. et al. Addition of a single N-glycan to street rabies virus glycoprotein enhances virus production. **Journal of General Virology**, v. 94, pt. 2, p. 270–275, 2013.

YOKOMIZO, A. Y. et al. Rabies virus glycoprotein expression in Drosophila S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. **Biotechnology Journal**, v. 2, n. 1, p. 102–109, 2007.

ZHAO, H.; GAROFF, H. Role of cell surface spikes in alphavirus budding. **Journal of Virology**, v. 66, n. 12, p. 7089–7095, 1992.

ZMORA, N. et al. Production of recombinant channel catfish (Ictalurus punctatus) FSH and LH in S2 Drosophila cell line and an indication of their different actions. **The Journal of Endocrinology**, v. 194, n. 2, p. 407–416, 2007.

APÊNDICES – Artigos de periódicos

Apêncice I – Artigo: *"Rabies virus glycoprotein and immune response pattern using recombinant protein or recombinant RNA viral vectors"*.

Apêndice II – Artigo: *"Semliki Forest Virus as a Vector: Pros and Cons for Its Use in Biopharmaceuticals Production"*.

Apêndice III – Artigo: *"A multivariate calibration procedure for UV/VIS spectrometric monitoring of BHK-21 Cell Metabolism and Growth"*.

Apêndice IV – Artigo: *"Influence of aeration-homogenization system in stirred tank bioreactors, dissolved oxygen concentration and pH control mode on BHK-21 cell growth and metabolism"*.

Apêndice V – Artigo: *"Improved Bioprocess with CHO-hTSH Cells on Higher Microcarrier Concentration Provides Higher Overall Biomass and Productivity for rhTSH"*.

Author's personal copy

Vaccine 32 (2014) 2829–2832

Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

Rabies virus glycoprotein and immune response pattern using recombinant protein or recombinant RNA viral vectors

Renato M. Astray, Daniella C. Ventini, Vera L.L. Boldorini, Fernanda G. Silva, Mayra P. Rocca, Carlos A. Pereira*

Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Butantan, Av. Vital Brazil 1500, 05503-900 São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 2 March 2014

Keywords:
Rabies
Vaccine
Immune response
Protein
RNA

ABSTRACT

The present study shows the humoral and cellular aspects of immune response generated by a recombinant rabies virus glycoprotein (rRVGP) as compared to those generated by viral vector carrying the RNA coding for this protein (*RVGP-RNA*). The rRVGP was synthesized by stably transfected *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2) cells and the *RVGP-RNA* was carried by a recombinant Semiliki Forest Virus (SFV-RVGP). The data show that protein as well as the RNA vaccine was capable of inducing reasonably acceptable levels of antibodies as compared to the optimized commercial whole virus vaccine. As expected, the RNA vaccine was clearly more effective than the protein vaccines in inducing a cellular immune response, as evaluated by the IgG2a/IgG1 ratio and synthesis of interferon gamma (IFNγ) and interleukin 2 (IL2). Our study supports the importance of vaccine designing taking into consideration the concept of DNA/RNA ability to induce an effective cell immune response.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Immunological and virological concepts raised from the development of successful viral vaccines should be carefully considered and must serve as a basis for new viral vaccines development [1–5].

In Fig. 1 we summarize the immune response exerted by different types of classical or experimental viral vaccines. As shown, both natural viral infection and attenuated viral vaccines are capable of inducing a strong humoral and cellular immune response. The humoral immune response to viruses is based essentially on antibody synthesis against structural viral proteins (S) upon stimulation by exogenous antigens involving peptides within endosomes with MHC II presentation to $CD4^+$ helper T cells. The cellular immune response is based essentially on $CD8^+$ specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) to structural (S) and non structural (NS) viral proteins synthesized "in vivo" involving the endoplasmic reticulum and in association to MHC I. So, an attenuated viral vaccine, when possible, is the best way for immunization due to the broad immune response generated, mimicking the natural infection without leading to disease. In fact, this is the case of the first viral vaccines developed which led to the eradication of small pox and protection against rabies. Still today very good vaccines are produced using attenuated strains. Nevertheless for safety and quality control reasons or unavailability of attenuated viral strains this approach is not always recommended or possible. Inactivated viral vaccines, although efficient for several viral diseases induce a suitable humoral immune response against S viral proteins but weak cellular immune response. Also, no immune response is elicited against NS viral proteins since there is no viral infection and replication upon immunization.

Recent developments of human viral vaccine candidates involve "recombinant protein vaccines", "virus like particles (VLP) vaccines" and "DNA/RNA vaccines" [1–3]. In the first two cases, as it is for inactivated viral vaccines, essentially the humoral immune response is induced upon immunization. On the other hand experimental "DNA vaccines" induce a strong cellular immune response but a weak humoral one. Although there is no "DNA vaccines" on the human vaccine market they are logically envisaged to be employed as "therapeutic vaccines" for already infected people or against viral induced tumor since they would elicit a CTL response which can efficiently clear the virus or tumor cells [6]. In contrast, inactivated viral vaccines are essentially "prophylactic vaccines" and can hardly be therapeutic since the viral infection is mostly cleared by CTLs and less by antibodies produced by these vaccines.

In order to compare the pattern of immune response induced by a viral recombinant protein to its RNA we have immunized mice with recombinant rabies virus glycoprotein (rRVGP) synthesized by Drosophila S2 cells and Semiliki Forest Virus (SFV) carrying the RNA coding for the rabies virus glycoprotein (SFV-RVGP) (Fig. 2).

* Corresponding author. Tel.: +55 11 26279623.
E-mail address: carlos.pereira@butantan.gov.br (C.A. Pereira).

http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.029
0264-410X/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Author's personal copy

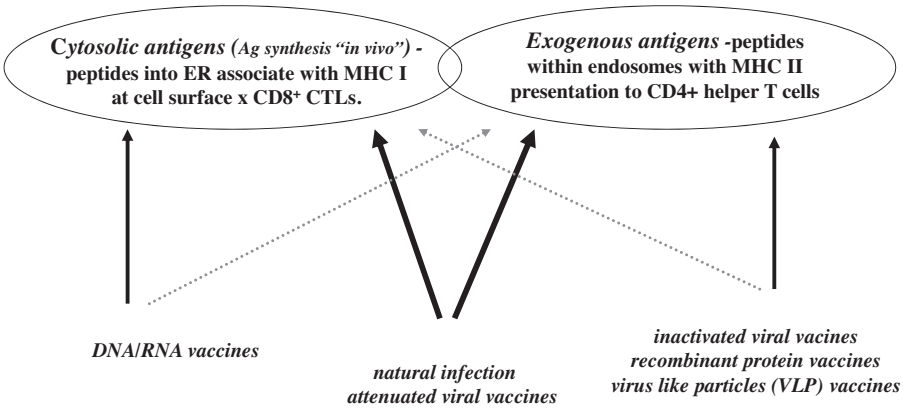


Fig. 1. Viral vaccines: immune response to cytosolic and exogenous antigens. ER, endoplasmic reticulum; MHC, Major Histocompatibility Complex; CD, Cluster of Differentiation; CTL, cytotoxic T lymphocytes.

Both systems have already been described in detail in previous publications [7,8]. Briefly, S2 cells (DES®, Invitrogen) were transfected with the RVGP cDNA under the control of an inducible (metallothionein – Mt) promoter [9]. A selected cell population was adapted to growth in suspension in serum-free medium SF900II® (Invitrogen). Cell cultures were then performed in 100 mL shake flasks (Schott) and 1 L bioreactors (BioFlo 110) at 100 rpm and 28 °C. The RVGP expression was induced with the addition of 500 μM of $CuSO_4$ and evaluated by ELISA, the samples (10^6 cells) being centrifuged (1000 × g/3 min), the supernatant discarded, the pellet washed once with PBS with sucrose 320 mM, centrifuged again (3000 × g/1 min), and frozen immediately at −20 °C [10].

For the SFV expression system [8], the RVGP gene was cloned into a modified pSFV2genC expression vector. BHK-21 cells were co-transfected with expression and helper RNA vectors and SFV-RVGP particles were obtained. They were titrated by qRT-PCR and used to infect BHK-21 cells in order to evaluate RVGP expression which was confirmed by qRT-PCR, western blotting, ELISA and flow cytometry [11–13].

Groups of ten BALB/c mice from the Instituto Butantan animal facility, weighting 11–14 g, were immunized intraperitoneally with commercial rabies vaccine (Fort Dodge), ultra violet (UV) inactivated rabies virus as prepared for vaccine production in VERO cells [14], RVGP from transfected S2 cells or from BHK21 cells infected with SFV-RVGP and SFV-RVGP. Control group were inoculated with PBS. The amount of RVGP in samples was measured by ELISA [11] and each dose contained 3 μg of RVGP. Animals were immunized at days 0, 7 and 14 and sacrificed at day 21. Serum sample were obtained at days 0, 7, 14 and 21 for evaluation of anti-RVGP antibodies by ELISA (Platelia, Bio-Rad) and the titer of anti-RVGP antibodies was expressed as equivalent units per mL (EU/mL). Anti-RVGP IgG1 and IgG2a were determined by an ELISA standardized in our

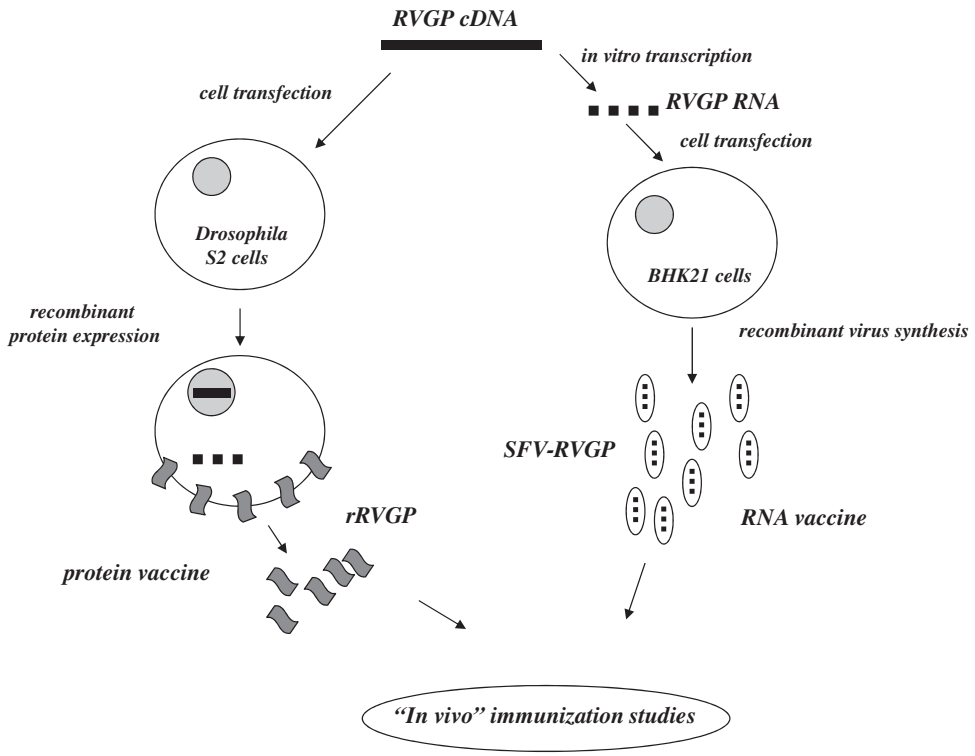


Fig. 2. RVGP expression systems for "in vivo" immunization. RVGP, rabies virus glycoprotein; Drosophila S2 cells, *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells; SFV-RVGP, recombinant Semiliki Forest Virus carrying the mRNA coding for RVGP; BHK21, Baby Hamster Kidney cells 21.

Author's personal copy

Table 1
Immune response elicited by rabies virus antigens.

	RVGP antibodies (EU/mL)			IgG2a/IgG1	IFNy	IL2
	7d	14d	21d	21d	Ratio (specific/non specific)	Ratio (specific/non specific)
Rabies vaccine	0.35	3.65	7.15	0.40	1.08 (846/782)	1.22 (566/461)
UV-rabies virus	0.25	3.19	5.03	0.70	1.30 (47/36)	1.69 (112/66)
RVGP(S2)	0.11	0.95	3.71	0.70	1.90 (19/10)	1.0 (<10/<10)
RVGP(SFV)	0.14	1.36	2.98	0.55	1.0 (<10/<10)	1.0 (<10/<10)
SFV-RVGP	0.10	1.43	4.97	1.65	3.19 (1242/389)	3.17 (609/192)
SFV-RVGP + RVGP (SFV)	0.20	2.51	5.52	10.0	11.67 (1004/86)	3.40 (225/66)
PBS	0	0	0	–	1.0 (<10/<10)	1.0 (<10/<10)

Mice were intraperitoneally (ip) immunized at days 0, 7 and 14 with SFV-RVGP or RVGP or rabies vaccine or UV-inactivated rabies virus containing 3 μg of RVGP. Serum sample were obtained at days 7, 14 and 21 for evaluation of anti-RVGP antibodies (EU/mL). Spleen cells were obtained at day 21 and cultivated for determination of IFNy and IL2 (pg/mL). RVGP (S2): recombinant rabies virus glycoprotein (RVGP) from stable transfected S2 cells. RVGP (SFV): recombinant rabies virus glycoprotein (RVGP) from BHK21 cells infected with SFV-RVGP. Data shown represent the mean average of at least 3 independent experiments.

laboratory using anti-mouse antibodies (Life Technologies) and expressed as a IgG2a/IgG1 ratio. For the evaluation of interferon gamma (IFNγ) and interleukin 2 (IL2), spleen cells were obtained at day 21 and cultivated with RPMI medium with 10% FBS (Life Technologies) in 24 well microplates. Cells were then treated with inactivated virus (with 0.4 μg of RVGP) for evaluation of specific stimulation or concanavalin A (2.5 μg) for evaluation of non specific stimulation. After 72 h IFNγ and IL2 were quantified in supernatants by ELISA (OptEIA, BD) and expressed as a ratio specific/non specific stimulation).

Immunization data presented in Table 1 show that the commercial rabies vaccine induced high antibody titers 14 days after immunization. The UV-rabies virus, which consists on a pre-formulated rabies vaccine (no adjuvant) induced also high antibody titers 14 days after immunization. Both RVGP antigens, from S2 cells or BHK21 cells, although capable of inducing a level of antibody formation higher than 0.5 EU/mL, led to an humoral immune response lower than those observed for the whole virus antigens (commercial vaccine and UV-rabies virus). The RNA immunization (SFV-RVGP) led to final titers (day 21) comparable to those induced by whole virus antigens and was slightly improved by the addition of RVGP (SFV-RVGP + RVGP group). Striking differences were observed between the response pattern elicited by protein and RNA antigens regarding cell immune response markers. SFV-RVGP was capable of inducing higher IgG2a/IgG1 ratio as well as specific/non specific ratio for IFNγ and IL2 clearly showing the balance toward a Th1 pattern of cell based immune response. These values were significantly strengthened when animals were immunized with SFV-RVGP + RVGP (SFV). Also remarkable is the finding that the commercial rabies vaccine is capable of inducing a high non specific immune response in proliferation assays as compared to not formulated antigens, indicating an important role of the adjuvant in eliciting an overall response to vaccination. Assays of protection against experimental rabies virus infection have shown the functional role of recombinant RVGP [15] as well as high degree of protection induced by SFV-RVGP (data not shown).

Based on the above experimental findings it is clear that an antigen design is determinant to induce a broad immune response which in turn may have outstanding importance in conferring a full protection upon immunization. Following this rational and based on the knowledge acquired on virus biology and bio safety concerns, a viral antigen to be rationally envisaged would be the construction of a virus like particle (VLP), which has been proved to be efficient, packaging recombinant RNA or DNA coding for NS proteins. This complex antigen would contain only molecules (proteins and nucleic acids) of the target virus and enable the immunization against S and NS viral proteins as well as eliciting humoral and cellular immune responses. This complex viral antigen ("VLP/RNA" or "VLP/DNA" vaccine) would mimic the attenuated viral vaccines, with the advantages of being prepared in a well controlled bioprocess and constituting a chemically defined antigen. In fact, such an approach of constructing viral particles with heterologous genes exists already, as viral vectors, for protein expression in cell cultures and also for gene therapy. It has been recently reviewed as "Viral vectors as vaccine platforms: deployment in sight" [16].

In conclusion, the aim of the present study, using the well known rabies system, was to show experimentally that proteins and nucleic acids are capable of eliciting complementary immune responses. The proposed approach of combining proteins and nucleic acids in a vaccine design could be viewed as a process of "rebuilding attenuated vaccines" in a well controlled and defined process.

Conflict of interest

We have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

Acknowledgements

This work was financially supported by grants from FAPESP (2009/09327-7), CNPq (142729/2010-8) and Butantan Foundation. C.A. Pereira is recipient of a CNPq 1A senior fellowship.

References

[1] Josefsberg JO, Buckland B. Vaccine process technology. Biotechnol Bioeng 2012;109:1443–60.
[2] Li L, Saade F, Petrovsky N. The future of human DNA vaccines. J Biotechnol 2012;162:171–82.
[3] Ulmer JB, Mason PW, Geall A, Mandl CW. RNA-based vaccines. Vaccine 2012;30:4414–8.
[4] Rueckert C, Guzmán CA. Vaccines. From empirical development to rational design. PLoS Pathog 2012;8(11 (November)):e1003001, http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003001 [Epub 8 November 2012].
[5] Rappuoli R, Mandl CW, Black S, De Gregorio E. Vaccines for the twenty-first century society. Nat Rev Immunol 2011;11:865–72.
[6] Quetglas JI, et al. Alphavirus vectors for cancer therapy. Virus Res 2010;153:179–96.
[7] Moraes AM, Jorge SAC, Astray RM, Suazo CAT, Calderón Riquelmec CE, Augusto EFP, et al. *Drosophila melanogaster* S2 cells for expression of heterologous genes: from gene cloning to bioprocess development. Biotechnol Adv 2012;30:613–28.
[8] Benmaamar R, Astray RM, Wagner R, Pereira CA. High-level expression of rabies virus glycoprotein with the RNA-based Semliki Forest Virus expression vector. J Biotechnol 2009;139:283–90.
[9] Lemos MAN, Santos AS, Astray RM, Pereira CA, Jorge SAC. Rabies virus glycoprotein expression in Drosophila S2 cells. I. Design of expression/selection vectors, subpopulations selection and influence of sodium butyrate and culture medium on protein expression. J Biotechnol 2009;143:103–10.
[10] Ventini DC, Astray RM, Lemos MAN, Jorge SAC, Calderon C, Suazo CAT, Tonso A, Pereira CA. Recombinant rabies virus glycoprotein synthesis in bioreactor by transfected *Drosophila melanogaster* S2 cells carrying a constitutive or an inducible promoter. J Biotechnol 2010;146:169–72.

Author's personal copy

[11] Astray RM, Augusto E, Yokomizo AY, Pereira CA. Analytical approach for extraction of recombinant membrane viral glycoprotein from stably transfected *Drosophila melanogaster* cells. Biotechnol J 2008;3:98–103.
[12] Astray RM, Jorge SAC, Lemos MAN, Yokomizo AY, Boldorini VLL, Puglia ALP, et al. Kinetic studies of recombinant rabies virus glycoprotein (RVGP) cDNA transcription and mRNA translation in *Drosophila melanogaster* S2 cell populations. Cytotechnology 2013;65:829–38.
[13] Santos MG, Jorge SAC, Brillet K, Pereira CA. Improving heterologous protein expression in transfected Drosophila S2 cells as assessed by EGFP expression. Cytotechnology 2007;54:15–24.
[14] Frazzati-Gallina N, Paoli RL, Mourão-Fuches RM, Jorge SAC, Pereira CA. Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers. J Biotechnol 2001;92:67–72.
[15] Yokomizo AY, Jorge SAC, Astray RM, Fernandes I, Ribeiro OG, Horton DSPQ, et al. Rabies virus glycoprotein expression in Drosophila S2 cells I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. Biotechnol J 2007;2:102–9.
[16] Rollier CS, Reyes-Sandoval A, Cottingham MG, Ewer K, Hill AVS. Viral vectors as vaccine platforms: deployment in sight. Curr Opin Immunol 2011;23:377–82.

Vol.56, n.5: pp. 859-866, September-October 2013
ISSN 1516-8913 Printed in Brazil

BRAZILIAN ARCHIVES OF
BIOLOGY AND TECHNOLOGY
AN INTERNATIONAL JOURNAL

Semliki Forest Virus as a Vector: Pros and Cons for Its Use in Biopharmaceuticals Production

Eutimio Gustavo Fernández Núñez[1,2*], Soraia Attie Calil Jorge[3], Renato Mancini Astray[3], Alexandre Gonçalves de Rezende[3], Bruno Labate Vale da Costa[4], Daniella Cristina Ventini Monteiro[1,3], Carlos Augusto Pereira[1,3] and Aldo Tonso[1]

[1]Laboratório de Células Animais; Departamento de Engenharia Química; Escola Politécnica; Universidade de São Paulo; São Paulo - SP - Brasil. [2]Departamento de Ciências Biológicas; Faculdade de Ciência e Letras; Universidade Estadual Paulista "Julho de Mesquita Filho"; Assis - SP - Brasil. [3]Laboratório de Imunologia Viral; Instituto Butantan; São Paulo - SP - Brasil. [4]Laboratório de Biotecnologia Industrial; Núcleo de Bionanomanufatura; Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo; São Paulo - SP - Brasil

ABSTRACT

The number of biopharmaceuticals for medical and veterinarian use produced in mammalian cells is increasing year after year. All of them are obtained by stable recombinant cell lines. However, it is recognized that transient gene expression produces high level expression in a short time. In that sense, viral vectors have been extensively used for producing recombinant proteins on lab-scale. Among them, Semliki Forest virus is commonly employed for this purpose. This review discusses the main aspects related to the use of Semliki Forest virus technology as well as its advantages and drawbacks which limit currently its utilization in biopharmaceutical industry on large-scale.

Key words: BHK-21, Large-scale bioprocesses, Mammalian cells, Recombinant proteins, SFV, Transient expression

INTRODUCTION

Mammalian cells have become the major host for recombinant proteins used as biopharmaceuticals with medical and veterinarian applications (Baldi et al. 2007; Conceição et al. 2007). The main factor related to this extensive application is the need of post-translational modifications in order to guarantee the full bioactivity of these macromolecules. Such changes are only accurately performed by the mammalians cells (Walsh 2010).

Currently, there are two established strategies in biopharmaceutical industry and academy to produce heterologous proteins: the use of stable cell lines, or transient gene expression (Kerrigan et al. 2011). The first one is achieved through the insertion of the recombinant gene(s) into the host genome. This approach is useful to produce recombinant protein for extended cultivation times. However, the identification and characterization processes of these cell lines are expensive and prolonged (De Jesus and Wurm 2011). On the other hand, when rapid assessment of many proteins, or several variants of a single protein is required, transient gene expression is the strategy of choice. Furthermore, short upstream processes (1-14 days) are related with transient gene expression (De Jesus and Wurm 2011).

In transient gene expression, non-viral (plasmid vectors) and viral expression vectors have been designed for transferring the genes to mammalian cells. The reasons, which define the expression

*Author for correspondence: eutimiocu@yahoo.com

vector selection for this purpose are: the recombinant protein application, the host cell, bioprocess time, productivity and safety (Baldi et al. 2007). The purity and recovery of plasmid DNA encoding for interest protein are limiting aspects when non-viral expression vectors are chosen (Geisse and Henke 2005). In general, the major concern for using virus as an expression vector is their infective nature, which involves biological risks (Sakamoto et al. 1999). However, the utilization of replication-deficient viral vectors such as Semliki Forest virus (SFV) and Sindbis virus vectors avoids this problem while allowing rapid and high-level gene delivery (Lundstrom et al. 2001a). This review defines the main advantages and drawbacks of SFV utilization for biopharmaceutical production in the mammalian cells and the present and near future challenges for a wide application of this viral vector on large-scale.

TRANSIENT GENE EXPRESSION IN MAMMALIAN CELLS FOR RECOMBINANT PROTEIN PRODUCTION ON LARGE-SCALE

The transient gene expression used on large-scale for recombinant protein production is a relatively new technology. In the past, the volumetric productivities reached by transient gene expression were not competitive with those from the stable cell lines (Hacker et al. 2009). However, recently, productivity up to 1 g/l with HEK-293 cells transfected with plasmid DNA in 14 days bioprocess has been reported (Backliwal et al. 2008). This report encourages new transient gene expressions in order to establish these processes at higher volumetric scales (100-1,000 l range). Beyond, the technical problems related to this gene expression way in the mammalian cells, there are two limiting events for its consolidation in biopharmaceutical industry:

1. At the present time, there is no therapeutic protein using transient gene expression in mammalian cells that has got regulatory approval.
2. There is a perception in the industry that large-scale transient gene expression is not reproducible.

Both elements could be overcome by targeting a protein with high value, which does not require a large amount of recombinant protein to meet the market demands and by developing robust processes on small-scale using scalable devices, respectively (Hacker et al. 2009). The experience with baculovirus-insect cell expression system for commercial manufacture of various veterinary and human vaccines could be also used to solve the current limitations in mammalian cells systems (Cox 2012).

So far, the non-viral vector methods have been the methods of choice for transient gene expression (Matasci et al. 2008). The recombinant gene is usually cloned in a plasmid DNA and transfected into the single-cell suspension culture. Only three DNA delivery methods for introducing plasmids in mammalian cells have been shown to be promising for large-scale operations: calcium phosphate DNA co-precipitation, polyethyleneimine or liposome DNA complexes and electroporation. These DNA transfer systems have demonstrated transfection efficiencies of more than 70%. After DNA delivery, cells are maintained in the culture for protein production during a limited time span, usually 5-10 days (Wurm and Bernard 1999).

Transient gene expression by viral vectors is carried out introducing the recombinant gene of interest in viruses. The transfer of exogenous DNA or RNA into animal cells, in general, as part of viral particle is named as transduction. The advantage of viral transduction over transfection with naked plasmid DNA includes the high efficiency of gene transfer because a natural delivery process is used. The tendency of many viruses to block the host cell protein synthesis and favor the expression of viral genes is also important for heterologous genes expression, which can increase bioprocess productivity. Besides, different viruses can achieve different transformation objectives: short-term infections with high-level transient expression, long-term expression by maintaining the genome as a latent episomal replicon, or stable integration of DNA into the host cell genome (Twyman 2005). The disadvantages of virus as gene transfer vectors include more complex cloning strategies compared to plasmid vectors, the biosafety problems related to bioprocesses with virus and health risks after recombinant protein administration associated to possible presence of viral vector (Twyman 2005; Lee et al. 2005). Many efforts have been addressed to overcome these problems in viral vectors (Lundstrom et al. 2001b; Chen et al. 2011).

Among the viral vectors for recombinant protein expression in the mammalian cells are vaccinia

virus (Pradeau-Aubreton et al. 2010), adenovirus (Pham et al. 2006), alphaviruses (Venezuelan Equine Encephalitis virus and Sindbis virus and the SFV) (Quetglas et al. 2010). Despite of the fact that the Baculovirus expression system is a well established methodology in insect cells for producing eukaryotic proteins (Koroleva et al. 2010; Trowitzsch et al. 2010; Gomez-Casado 2011), the use of vectors based on this virus (BacMam) has also demonstrated efficiency in the mammalian cells (Kost et al. 2005).

SEMLIKI FOREST VIRUS (SFV)

SFV is a single positive-strand RNA virus with an envelope structure. The first part (5'end) of genome encodes the nonstructural proteins, while the second part (3'end) encodes the structural proteins (Dudek and Knipe 2006). Its genome has been introduced into two plasmid vectors as cDNA copies. The expression vector contains the SFV nonstructural genes (nsP1-4), the strong subgenomic SFV 26S promoter and a multilinker cloning region to introduce the foreign genes for recombinant protein expression. The SFV structural proteins are provided from the helper vector, including the envelope and capsid proteins (Liljeström and Garoff 1991). Co-transfection of *in vitro* transcribed recombinant and helper RNA can generate around 10^9-10^{10} recombinant viral particles/ml. These particles have the capacity to infect a wide range of mammalian and other animal cell lines (Lundstrom 2003a). The electroporation is the method of choice for SFV RNAs co-transfection but lipid-mediated transfection can be applied alternatively with relatively good results (Lundstrom 2010).

Because of the presence of RNA packing signal only in the recombinant RNA, no helper RNA will be packaged, which generates replication-deficient particles, increasing vector's biosafety features. To decrease the infection risks, a mutation was inserted in the region encoding the viral spike proteins, inhibiting host entry. Therefore, viral vector could be no-infectious during the storage period and could only be activated *in vitro* by cleavage with α-chymotrypsin (Berglund et al. 1993; Benmaamar et al. 2009). After host cells infection, rapid and high-level transgene expression is obtained. Different proteins have been successfully expressed from the SFV vector. Yields of 10^9 heterologous protein molecules per cell, representing around 25% of the total cellular protein yields have been obtained by this viral vector (Lundstrom 2003a).

The SFV vectors have become increasingly attractive because of their characteristics of rapid expression of high amounts of recombinant protein. After infection, the RNA replication in the host cell cytoplasm results in measurable transgene expression as early as 2 h after the infection. In spite of the great potential for widespread use of SFV for recombinant protein production, two major drawbacks are related to this viral vector: the strong cytotoxic effect on host cells and the short-term expression pattern. In addition, SFV infection of cell culture has been demonstrated to induce apoptosis. Solving, or mitigating these problems would expand even more the applications range of this alphavirus vector (Lundstrom 2002; Hassaine et al. 2006).

RECOMBINANT PROTEIN PRODUCTION BY SEMLIKI FOREST VIRUS VECTOR ON LAB-SCALE

On lab-scale, the SFV vector has been widely used for obtaining sufficient amounts of recombinant proteins for cellular, or molecular assays, pharmacological tests and structural studies (Hoffmann et al. 2001; Werten et al. 2002; Cabaniols et al. 2009). Most of them are functional membrane proteins, receptors (Shukla et al. 2006; Eifler et al. 2007), enzymes (Bikker et al. 1997) and viral proteins (Benmaamar et al. 2009). High volumetric protein expression levels and yields have been obtained by the modified SFV in the mammalian cells, up to 10 mg l^{-1} and 100-300 pmol mg^{-1} of total proteins, for G protein-coupled receptors (Shukla et al. 2007; Sevastsyanovich et al. 2009). The yield enhancement by the use of SFV vector comparing to stable cell lines and other transient transfections could be 20 fold higher (Shukla et al. 2007).

Currently, the studies for improving the SFV as high efficient protein producer vector are, or should be addressed to its genetic modification in order to extend the expression time in the host cells and optimizing the culture parameters during the infection and expression processes such as the host cell lines, temperature, pH, infection and post-infection times and multiplicity of infection (ratio of virus to target cell). The efforts in genetic modifications of the SFV are focused on mutations

in alphavirus replicase to render this vector less cytopathic (Casales et al. 2010). Host cell lines more used for protein transient expressions with this alphavirus are Baby Hamster Kidney (BHK-21), Chinese Hamster Ovary (CHO-K1) and Human Embryonic Kidney (HEK293) in both adherent and suspension cultures (Lundstrom 2003a; Lundstrom 2010). For a single protein expression, the selection of the cell line could be performed through a comparison among available cell lines keeping constant the remaining parameters of cell culture in small volume systems (Blasey et al. 1997; Hassaine et al. 2006).

Deterministic and empiric models definition as well as optimization of the bioprocess parameters on small-scale have not been detailed enough for this expression system. Works in this field could improve the protein expression using the SFV. Probably, the low number of paper on this subject is justified because most of the time, SFV system has been used on lab-scale without seeking to develop subsequently a large-scale bioprocess. For example, a study on temperature demonstrated that the cultures grown at 33°C showed an increase of 10-20 fold expression for luciferase and the expression time could be prolonged (up to 50 h) when compared to 37°C cultures (Schlaeger and Lundstrom 1998). For variables such as the pH and multiplicity of infection, the investigated ranges in literature are 6.4-7.8 and 30-400, respectively. The protein expression has shown to be very sensitive to small pH changes over the course of bioprocess and directly related to the multiplicity of infection (Blasey 1997; Blasey 2000). Nevertheless, a modification of pharmacological profile for some recombinant receptors was observed when the cells were infected with increased concentration of virus (Lundstrom 2003b). This could be a consequence of a saturation of right protein synthesis capacity in host cells. Thus, in future, more detailed studies considering the bioprocess variables should be performed on small-scale. This could be possible if the SFV is definitively established on large-scale processes.

CELL CULTURE STRATEGIES FOR OBTAINING RECOMBINANT PROTEINS BY THROUGH SEMLIKI FOREST VIRUS SYSTEM

Among the alpha virus, only SFV has been used for large-scale recombinant protein production, which showed its popularity because the principles of this kind of vectors are the same. As a rule the cell culture used for transduction should be in exponential growth phase to generate maximal expression levels. To scale-up the Semiliki Forest virus technology, it is absolutely essential to establish efficient infection and expression conditions in suspension cultures of the mammalian cells. In that sense, for reducing the cell costs and to facilitate the purification of recombinant proteins, CHO, HEK293 and BHK lines were adapted in suspension growth in serum-free medium without the decrease in expression level (Lundstrom 2003b). For high volume cultures, compromises need to be made between the optimal virus concentration and feasible virus production. The main disadvantage of applying the SFV system for the large-scale production of the protein is the high cost of virus stock production related to *in vitro* transcription process (Lundstrom 2010) (Fig. 1). In order to reduce the cost for virus preparation, alpha virus packaged cell lines have been developed (Polo et al. 1999; Blasey et al. 2000). This approach could simultaneously increase the production of viral particles.

There are a few studies related to SFV utilization on large-scale protein production by the utilization of bioreactors, spinner (1l) and agitated tank (11.5l) for producing the enzymes (bacterial β-galactosidase and human cyclooxygenase-2) and 5-HT3 receptor (Blasey et al. 1997; Blasey et al. 2000) The culture strategies to perform these bioprocesses were fed-batch and external medium exchange (Fig. 2).

In the fed-batch process, the SFV was inoculated in 10-20% bioreactor volume and BHK cells were kept in contact with the virus for 90 min, and then fresh culture medium was added to complete the bioreactor volume. The bioprocess after the infection step lasted 20 h. High level protein expression (16 mg l^{-1}) was generated in a short time (Blasey et al. 1997). On the other hand, in external medium exchange process, 90% of exhausted culture medium used for the BHK batch cell culture was changed by fresh medium by external cross-flow filtration with a hollow fiber microfilter. Then the BHK cells were infected with the modified SFV for 24 h (Fig. 2).

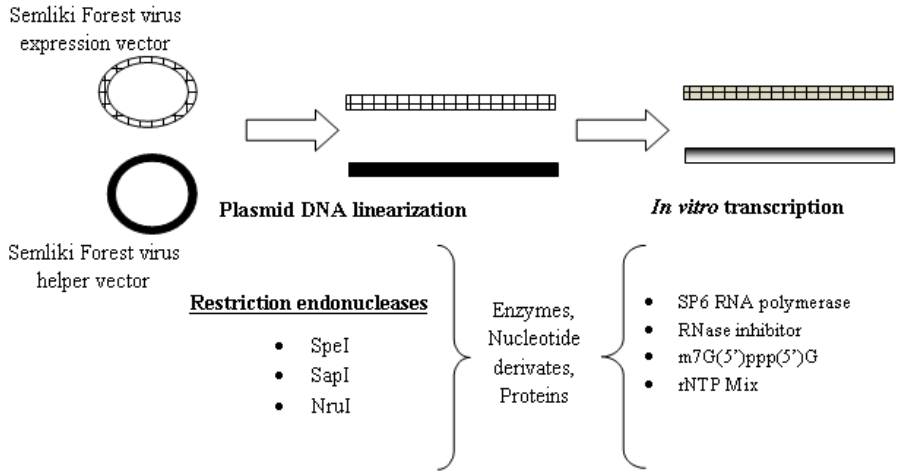


Figure 1 - *In vitro* transcription process for Semliki Forest virus vector and its more costly reagents.

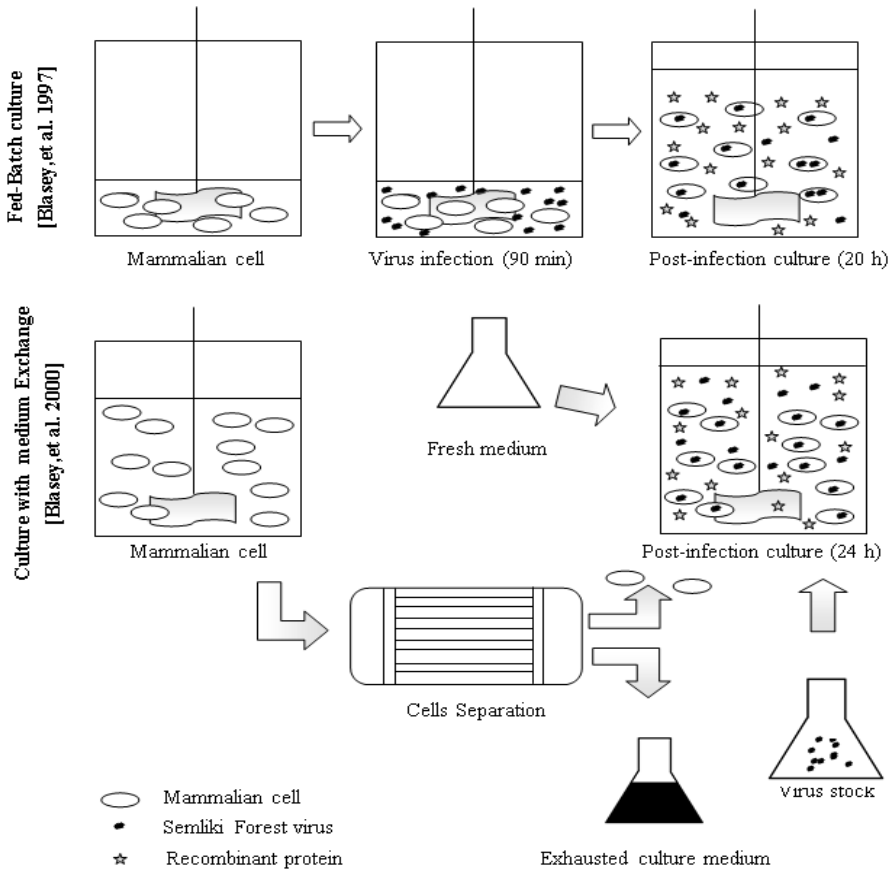


Figure 2 - Culture strategies for transduction and protein expression with Semliki Forest virus on large-scale.

This strategy allowed the expression of 15 mg of 5-HT3 receptors per 11.5 l batch (Blasey et al. 2000). The volumetric productivities for both the processes were higher than those usually obtained for bioprocess with stably transfected mammalian cells (> 0.05 mg l^{-1} for human membrane protein) (Chaudhary et al. 2011). Despite these good performances of this viral vector in the expression

of associated and integral membrane proteins (used in the pharmacological studies), besides the costs of RNA *in vitro* transcription, one of the main challenges related to the SFV vector applications in biopharmaceuticals production is the understanding of metabolic patterns during the infections in order to define the suitable culture medium and bioprocess strategies for improving the volumetric productivity. Then, the SFV vector could achieve equivalent performance with stable cell lines (>1 g l^{-1}).

Another problem, which limits the use of this transient expression vector in high volume bioreactors is virus transduction into the cell because of high cost and low efficiency. In this regard flow electroporation could be an interesting option (Parham et al. 1998). On the other hand, from the analytical point of view, the difficulties related to the establishment of accurate techniques for viral particles quantification (Calgua et al. 2011) could delay the standardization of biopharmaceutics manufacturing based on the SFV vector.

CONCLUSIONS

The SFV, as also the rest of viral vectors for protein transient expression, has been underutilized on large-scale, despite of its high expression level on small-scale. Four most critical aspects should be considered in order to establish definitively this vector as a suitable alternative for biopharmaceutical in high volume bioreactors: reduced cost for the production of virus, suitable culture medium and feed strategies over the course of post-infection stage and transduction process, as well as the precise method for viral particles quantification.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo for post-doctoral fellowship (2010/52521-6) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for scientific grant. First author gratefully acknowledges Relma Tavares de Oliveira Fernández and PhD. Rodolfo Valdés, for the inspiration to write this paper. Carlos A Pereira is recipient of a senior 1A CNPq fellowship.

REFERENCES

Backliwal G, Hildinger M, Chenuet S, Wulhfard S, De Jesus M, Wurm FM. Rational vector design and multi-pathway modulation of HEK 293E cells yield recombinant antibody titers exceeding 1 g/l by transient transfection under serum-free conditions. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(15): e96.

Baldi L, Hacker DL, Adam M, Wurm FM. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnol Lett.* 2007; 29(5): 677-684.

Benmaamar R, Astray RM, Wagner R, Pereira CA. High-level expression of rabies virus glycoprotein with the RNA-based Semliki Forest Virus expression vector. *J Biotechnol.* 2009; 139(4): 283-290.

Berglund P, Sjöberg M, Garoff H, Atkins GJ, Sheahan BJ, Liljeström P. Semliki Forest virus expression system: production of conditionally infectious recombinant particles. *Biotechnology.* 1993; 11(8): 916-920.

Bikker H, Baas F, de Vijlder J-JM. Molecular analysis of mutated thyroid peroxidase detected in patients with total iodide organification defects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82(2): 649-653.

Blasey HD, Brethon B, Hovius R, Vogel HH, Tairi AP, Lundström K, et al. Large scale transient 5-HT3 receptor production with the Semliki Forest Virus Expression System. *Cytotechnology.* 2000; 32(3): 199-208.

Blasey HD, Lundström K, Tate S, Bernard AR. Recombinant protein production using the Semliki Forest Virus expression system. *Cytotechnology.* 1997; 24(1): 65-72.

Cabaniols JP, Mathis L, Delenda C. Targeted gene modifications in drug discovery and development. *Curr Opin Pharmacol.* 2009; 9(5): 657-663.

Calgua B, Barardi CR, Bofill-Mas S, Rodriguez-Manzano J, Girones R. Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. *J Virol Methods.* 2011: 171(1): 1-7.

Casales E, Aranda A, Quetglas JI, Ruiz-Guillen M, Rodriguez-Madoz JR, Prieto J, et al. A novel system for the production of high levels of functional human therapeutic proteins in stable cells with a Semliki Forest virus noncytopathic vector. *N Biotechnol.* 2010; 27(2): 138-148.

Chaudhary S, Pak JE, Pedersen BP, Bang LJ, Zhang LB, Ngaw SM, et al. Efficient expression screening of human membrane proteins in transiently transfected Human Embryonic Kidney 293S cells. *Methods.* 2011; 55(4): 273-280.

Chen CY, Lin CY, Chen GY, Hu YC Baculovirus as a gene delivery vector: recent understandings of molecular alterations in transduced cells and latest applications. *Biotechnol Adv.* 2011; 29: 618-631.

Conceição MM, Tonso A, Freitas CB, Pereira CA. Viral antigen production in cell cultures on microcarriers Bovine parainfluenza 3 virus and MDBK cells. *Vaccine.* 2007; 25(45): 7785-7795.

Cox MMJ. Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine* 2012; 30(10): 1759-1766.

De Jesus M, Wurm FM. Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011; 78(2): 184-188.

Dudek T, Knipe DM. Replication-defective viruses as vaccines and vaccine vectors. *Virology.* 2006; 344(1): 230-239.

Eifler N, Duckely M, Sumanovski LT, Egan TM, Oksche A, Konopka JB, et al. Functional expression of mammalian receptors and membrane channels in different cells. *J Struct Biol.* 2007; 159(2): 179-193.

Geisse S, Henke M. Large-scale transient transfection of mammalian cells: a newly emerging attractive option for recombinant protein production. *J Struct Funct Genomics.* 2005; 6(2-3): 165-170.

Gomez-Casado E, Gomez-Sebastian S, Núñez MC, Lasa-Covarrubias R, Martínez-Pulgarín S, Escribano JM. Insect larvae biofactories as a platform for influenza vaccine production. *Protein Expr Purif.* 2011; 79(1): 35-43.

Hacker DL, De Jesus M, Wurm FM. 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells - where do we go from here? *Biotechnol Adv.* 2009; 27(6): 1023-1027.

Hassaine G, Wagner R, Kempf J, Cherouati N, Hassaine N, Prual C, et al. Semliki Forest virus vectors for overexpression of 101 G protein-coupled receptors in mammalian host cells. *Protein Expr Purif.* 2006; 45(2): 343-351.

Hoffmann M, Verzijl D, Lundstrom K, Simmen U, Alewijnse AE, Timmerman H, et al. Recombinant Semliki Forest virus for over-expression and pharmacological characterisation of the histamine H(2) receptor in mammalian cells. *Eur J Pharmacol.* 2001; 427(2): 105-114.

Kerrigan JJ, Xie Q, Ames RS, Lu Q. Production of protein complexes via co-expression. *Protein Expres Purif.* 2011; 75(1): 1-14.

Koroleva NN, Spirin PV, Timokhova AV, Rubtzov PM, Kochetkov SN, Prasolov VS, et al. Baculovirus vectors for efficient gene delivery and expression in mammalian cells. *Mol Biol.* 2010; 44(3): 479-487.

Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 2005; 23(5): 567-575.

Lee JS, Hadjipanayis AG, Parker MD. Viral vectors for use in the development of biodefense vaccines. *Adv Drug Deliver Rev.* 2005; 57(9): 1293-1314.

Liljeström P, Garoff H. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Nat Biotechnol.* 1991; 9(12): 1356-1361.

Lundstrom K, Schweitzer C, Rotmann D, Hermann D, Schneider EM, Ehrengruber MU. Semliki Forest virus vectors: efficient vehicles for in vitro and in vivo gene delivery. *FEBS Letters.* 2001a; 504(3): 99-103.

Lundstrom K, Rotmann D, Hermann D, Schlaeger EJ. Safety aspects related to recombinant protein expression from Semliki Forest virus vectors. *Cytotechnology.* 2001b; 35(3): 213-221.

Lundstrom K. Expression of Mammalian Membrane Proteins in Mammalian Cells Using Semliki Forest Virus Vectors. In: Mus-Veteau I, editor. Heterologous Expression of Membrane Proteins, Methods in molecular Biology. New York: Humana Press; 2010. p. 149-164.

Lundstrom K. Semliki Forest virus vectors for rapid and high-level expression of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2003a; 1610(1): 90-96.

Lundstrom K. Semliki Forest Virus Vectors for Large-Scale Production of Recombinant Proteins. In: Machida CA, editor. Viral vectors for gene therapy. Methods and Protocols, New Jersey: Humana Press; 2003b.p. 525-544.

Lundstrom K. Semliki forest virus-based expression for versatile use in receptor research. *J Recept Signal Tr.* 2002; 22 (1-4): 229-240.

Matasci M, Hacker DL, Baldi L, Wurm, FM. Recombinant therapeutic protein production in cultivated mammalian cells: current status and future prospects. *Drug Discov Today Technol.* 2008; 5(2-3): 37-42.

Parham JH, Iannone MA, Overton LK, Hutchins JT. Optimization of transient gene expression in mammalian cells and potential for scale-up using flow electroporation. *Cytotechnology.* 1998; 28(1-3): 147-155.

Pham PL, Kamen A, Durocher Y. Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein. *Mol Biotechnol.* 2006; 34(2): 225-237.

Polo JM, Belli BA, Driver DA, Frolov I, Sherril S, Hariharan MJ, et al. Stable alphavirus packaging cell lines for Sindbis virus and Semliki Forest virus-derived vectors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(8): 4598-4603.

Pradeau-Aubreton K, Ruff M, Garnier JM, Schultz P, Drillien R. Vectors for recombinational cloning and gene expression in mammalian cells using modified vaccinia virus Ankara. *Anal Biochem.* 2010; 404(1): 103-105.

Quetglas JI, Ruiz-Guillen M, Aranda A, Casales E, Bezunartea J, Smerdou C. Alphavirus vectors for cancer therapy. *Virus Res.* 2010; 153(2): 179-196.

Sakamoto S, Ide T, Tokiyosi S, Nakao J, Hamada F, Yamamoto M, et al. Studies on the structures and antigenic properties of rabies virus glycoprotein analogues produced in yeast cells. *Vaccine.* 1999; 17(3): 205-218.

Schlaeger EJ, Lundstrom K. Effect of temperature on recombinant protein expression in Semliki Forest virus infected mammalian cell lines growing in serum- free suspension cultures. *Cytotechnology.* 1998; 28(1-3): 205-211.

Sevastsyanovich Y, Alfasi S, Cole J Recombinant protein production: a comparative view on host physiology. *N Biotechnol.* 2009; 25 (4): 175-180.

Shukla AK, Haase W, Reinhart C, Michel H. Biochemical and pharmacological characterization of the human bradykinin subtype 2 receptor produced in mammalian cells using the Semliki Forest virus system. *Biol Chem.* 2006; 387(5): 569-576.

Shukla AK, Haase W, Reinhart C, Michel H. Heterologous expression and comparative characterization of the human neuromedin U subtype II receptor using the methylotrophic yeast Pichia pastoris and mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(5): 931-942.

Trowitzsch S, Bieniossek C, Nie Y, Garzoni F, Berger I. New baculovirus expression tools for recombinant protein complex production. *J Struct Biol.* 2010; 172(1): 45-54.

Twyman RM. Gene transfer to animal cells. New York: Garland BIOS Scientific Publishers; 2005.

Walsh G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. *Drug Discov Today.* 2010; 15(17-18): 773-780.

Werten PJ, Rémigy HW, de Groot BL, Fotiadis D, Philippsen A, Stahlberg H, et al. Progress in the analysis of membrane protein structure and function. *FEBS Letters.* 2002; 529(1): 65-72.

Wurm F, Bernard A. Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. *Curr Opin Biotechnol.* 1999; 10(2): 156-159.

Received: June 13, 2012;
Accepted: July 05, 2013.

A Multivariate Calibration Procedure for UV/VIS Spectrometric Monitoring of BHK-21 Cell Metabolism and Growth

Jaci Leme[†]
Laboratório Especial de Pesquisa e Desenvolvimento em Imunológicos Veterinários, Instituto Butantan. Av. Vital Brasil, 1500, Butantã, 05503-900, São Paulo, SP–Brazil

Eutimio Gustavo Fernández Núñez[†]
Dept. de Engenharia Química, Laboratório de Células Animais, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Luciano Gualberto, trav. 3, 380, Butantã, 05508-900, São Paulo, SP–Brazil

Dept. de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Campus-Assis, Avenida Dom Antonio 2100, Bairro Parque Universitário, 19806-900, Assis, SP – Brasil

Letícia de Almeida Parizotto
Dept. de Engenharia Química, Laboratório de Células Animais, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Luciano Gualberto, trav. 3, 380, Butantã, 05508-900, São Paulo, SP–Brazil

Wagner Antonio Chagas, Erica Salla dos Santos, and Aline Tojeira Prestia Caricati
Laboratório Especial de Pesquisa e Desenvolvimento em Imunológicos Veterinários, Instituto Butantan. Av. Vital Brasil, 1500, Butantã, 05503-900, São Paulo, SP–Brazil

Alexandre Gonçalves de Rezende
Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Butantan. Av. Vital Brasil, 1500, Butantã, 05503-900, São Paulo, SP–Brazil

Bruno Labate Vale da Costa
Dept. de Engenharia Química, Laboratório de Células Animais, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Luciano Gualberto, trav. 3, 380, Butantã, 05508-900, São Paulo, SP–Brazil

Laboratório de Biotecnologia Industrial, Núcleo de Bionanomanufatura, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, Av. Prof. Almeida Prado 532 Cid. Universitária - Butantã, 05508-901, São Paulo, SP–Brazil

Daniela Cristina Ventini Monteiro, Vera Lucia Lopes Boldorini, Soraia Attie Calil Jorge, and Renato Mancini Astray
Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Butantan. Av. Vital Brasil, 1500, Butantã, 05503-900, São Paulo, SP–Brazil

Carlos Augusto Pereira
Dept. de Engenharia Química, Laboratório de Células Animais, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Luciano Gualberto, trav. 3, 380, Butantã, 05508-900, São Paulo, SP–Brazil

Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Butantan. Av. Vital Brasil, 1500, Butantã, 05503-900, São Paulo, SP–Brazil

Celso Pereira Caricati
Laboratório Especial de Pesquisa e Desenvolvimento em Imunológicos Veterinários, Instituto Butantan. Av. Vital Brasil, 1500, Butantã, 05503-900, São Paulo, SP–Brazil

Aldo Tonso
Dept. de Engenharia Química, Laboratório de Células Animais, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Luciano Gualberto, trav. 3, 380, Butantã, 05508-900, São Paulo, SP–Brazil

DOI 10.1002/btpr.1847
Published online December 19, 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

Monitoring mammalian cell culture with UV–vis spectroscopy has not been widely explored. The aim of this work was to calibrate Partial Least Squares (PLS) models from off-line UV–vis spectral data in order to predict some nutrients and metabolites, as well as viable cell concentrations for mammalian cell bioprocess using phenol red in culture medium. The BHK-21 cell line was used as a mammalian cell model. Spectra of samples taken from batches performed at different dissolved oxygen concentrations (10, 30, 50, and 70% air saturation), in two bioreactor configurations and with two strategies to control pH

[†]Both authors contributed equally to this work.
Correspondence concerning this article should be addressed to E. G. Fernández Núñez at eutimiocu@yahoo.com.

© 2013 American Institute of Chemical Engineers

were used to calibrate and validate PLS models. Glutamine, glutamate, glucose, and lactate concentrations were suitably predicted by means of this strategy. Especially for glutamine and glucose concentrations, the prediction error averages were lower than 0.50 ± 0.10 mM and 2.21 ± 0.16 mM, respectively. These values are comparable with those previously reported using near infrared and Raman spectroscopy in conjunction with PLS. However, viable cell concentration models need to be improved. The present work allows for UV–vis at-line sensor development, decrease cost related to nutrients and metabolite quantifications and establishment of fed-batch feeding schemes. © 2013 American Institute of Chemical Engineers *Biotechnol. Prog.*, 30:241–248, 2014
Keywords: UV–vis spectroscopy, partial least squares, BHK-21, cell culture monitoring

Introduction

Since 2004, when Food and Drug Administration launched the Process Analytical Technology (PAT), biopharmaceutical companies were encouraged to adopt modern bioprocess monitoring techniques based on on-line or at-line analysis of key variables. This initiative is useful for early detection of faults, as a consequence, to maximize the probability of high quality products at the end of the process.[1] The concepts associated to PAT can be also applied during the initial stages of bioprocess development at the lab scale, both in academic and industrial contexts, to characterize and validate them.[2]

Multivariate data analysis is considered to be a helpful tool within PAT because of its potential for expanding understanding and reducing development bioprocess time.[3] Multivariate techniques, such as Principal Component Analysis and Partial Least Squares (PLS), reduce the high number of dimensions of the collected data over the course of batches. Thus, they enable the identification of correlations between relevant variables.[4]

At present, few process-related variables (pH, temperature, dissolved oxygen concentration, biovolume, and cell density) can be monitored using in situ probes.[5,6] Hence, to access to the real-time evolution of cell metabolism, the development of new PAT methods for metabolic parameters are needed. The combinations of spectroscopic methods and multivariate data analysis in animal cell cultures have been used to simultaneously provide on-line, at-line and off-line information about several bioprocess variables, including culture medium composition (nutrients and metabolites) and living cells number.[1,7–9] Among spectroscopic techniques, near infrared spectra has been widely exploited with this purpose.[1,10] Specifically, in mammalian cell culture, nuclear magnetic resonance, fluorescence and Raman spectroscopies have been also used for monitoring nutrients, metabolites and viable cell concentration.[11,12] The lack of use of ultraviolet-visible spectroscopy in mammalian cell bioprocess could be justify by the poor information of UV–vis spectra due to the broad and unspecific bands obtained, the inability to detect higher energy electronic levels in molecules, as well as the spectral interferences of a second, dispersed phase (cells and gas bubbles) because of light scattering effects.[10]

Most of the biopharmaceuticals are complex recombinant proteins, for this reason, mammalian cells are the hosts of choice because they ensure the correct post-translational modifications to confer function and safety.[13] This kind of animal cells has been also frequently used for viral vaccine production.[14] Among mammalian cells, the BHK-21 cell line has found applications in veterinarian viral vaccines and heterologous protein production, even in the transient mode.[15,16]

Many media formulations for mammalian cell culture often contain an optional pH indicator, phenol red. This dye provides a useful, visual but qualitative mode for monitoring metabolism within a culture device.[17]

The aim of this work was to calibrate a PLS model for glutamine, glutamate, glucose, lactate, and viable cell concentration based on off-line ultraviolet-visible spectra for BHK-21 suspension cell culture in bioreactors. This study could represent an important step for developing non-invasive on-line metabolic monitoring devices for BHK-21 cell bioreactors.

Material and Methods

Cell line and culture medium

BHK-21 (C-13) cells (Sigma-Aldrich ECACC Cell Lines, Lyon, France) adapted to single cell suspension culture were kindly supplied by Dr. Renaud Wagner from Ecole Superieure Biotechnologie de Strasbourg, France. The culture medium for this cell line had the following composition by volume: Iscove's Modified Dulbecco Medium with glutamine and Phenol red (IMDM, catalog number 12200-036, Gibco, NY) 45.5%, High glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, catalog number 12100-046, Gibco, NY) 45.5%, heat inactivated fetal bovine serum (Catalog number 10082-147, Gibco, Grand Island, NY) 5%, 10% m/v Pluronic F-68 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) aqueous solution 2%, and 4 mM glutamine (Sigma-Aldrich, Tokyo, MO) aqueous solution 2%.

Inoculum preparation

One milliliter of BHK-21 cells (2×10^6 cell/mL) was thawed and placed in a 75 cm^2 tissue culture flask (vertical position) with 30 mL of culture medium for growing. Four days afterwards, the cell suspension was used to inoculate (0.12×10^6 cell/mL) consecutively other tissue culture flasks with 25 and 75 cm^2; enough culture medium was added to reach final cellular suspensions of 10 and 30 mL, respectively. Inoculum for bioreactors was generated from 100 and 250 mL spinner flasks (Bellco Glass, Vineland, NJ), with working volumes of 50 and 100 mL, respectively; the stirring speed was maintained at 30 rpm (Sci-Era quard drive stirrer system with a stirrer, Bellco Biotechnology, Vineland, NJ). Spinners were previously seeded (0.25×10^6 cell/mL) from 75 cm^2 tissue culture flask in the exponential phase. After 72 h, the inoculums for bioreactors were ready; the cell concentration and viability in spinners were 4.27×10^6 cell/mL $\pm 0.85 \times 10^6$ cell/mL and 100%, respectively. All the procedures described in this section were performed into an incubator (Thermoforma 3110, Marietta, OH) at 37°C and 5% of carbon dioxide atmosphere.

Bioreactor cultures

Batch experiments in bioreactors were carried out in a 5 L Celligen (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) without

aeration cage and 2 L Bioflo 110 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) at 37°C, agitation at 80 rpm. Bioreactors operated with 2 and 1 L working volumes, respectively, with initial cell concentration of 0.25×10^6 cell/mL.

Using a variable gas mixture (carbon dioxide, air, oxygen, and nitrogen), different controlled dissolved oxygen concentrations were assessed: for Celligen (400 mL/min volumetric gas flow), 10, 30, and 50% of air saturation was used and for the experiments performed in the Bioflo 110 (200 mL/min volumetric gas flow), 10, 30, 50, and 70% were used. The pH for both bioreactors was also controlled at 7.2 just with CO_2 until it was possible, according to buffering capacity of $NaHCO_3$-CO_2 system.

Additional experiments were performed in duplicate in Bioflo 110 at 30 and 50% air saturation controlling pH at 7.2 during whole batch time, adding gas CO_2 or $NaHCO_3$ solution (8% m/v) when necessary. Temperature, pH and dissolved oxygen over the course of batch cultures were acquired online using a homemade LabVIEW program (National Instruments, Austin, TX).

Cell counting

The cells were counted using Neubauer improved counting chamber (Precicolor HBG, Germany) with proper sample dilution with Phosphate Buffer Saline. Cell viability was quantified in parallel using the trypan blue dye exclusion method.[18]

Nutrient and metabolite analysis

Five milliliter samples at different times during batches were taken (8 or 9 samples for each batch). They were centrifuged at 750*g* for 4 min at 4°C (Sorvall Biofuge Primo R Centrifuge, Thermo Electron Corp. Germany). Subsequently, supernatants were filtered through 0.22 μm filter (Millex-GV filter unit, Sao Paulo, Brazil) and frozen at −20°C until spectral, nutrients and metabolites analysis.

Glucose, lactate, glutamine, and glutamate (g/L) concentrations from supernatant samples were measured using enzyme-coupled reaction and electrochemical detection, in YSI 2700 select bioanalyzer (YSI Life Sciences, Yellow Springs, OH).

UV–vis spectrum analyses

Samples were thawed and equilibrated at room temperature. Then, they were dissolved 10-fold in deionized water. Dissolved samples were pipetted in disposable polymethylmethacrylate UV–vis cuvettes (1.5 mL, Kartell, Noviglio, Italy). Deionized water was used as blank. UV–vis spectra of samples from 280 to 800 nm (1 nm width pass) were performed in Biomate 3 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Absorbance data were recorded via hyperterminal of an external computer. Subsequently, data were exported to Micosoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond) for graphing and further processing.

PLS modeling

Seventy (5 batches, 43 experimental points) and seventy six (3 batches, 26 experimental points) percent of the collected samples were used to calibrate a PLS models for batches performed without and with $NaHCO_3$ solution addition, respectively. The remaining data were used for model validation; experiments carried out at 50 % air saturation in both bioreactors were used to validate PLS models adjusted for batches without base solution addition, whereas one of the batches performed at 50% air saturation with $NaHCO_3$ solution addition was used for model validation in bioconversion with base solution addition to control pH.

The X matrix included sample absorbances within the spectral range under study. On the other hand, Y matrix was composed by the glucose, lactate, glutamine, glutamate, and viable cell concentrations. PLS modeling was performed in SIMCA 13 demo version software (Umetrics, Umea, Sweden). The validation of PLS models was done by means of statistical significance evaluation of intercept and slope in simple linear models for predicted and actual values of parameters under consideration. The software used with this purpose was Statgraphics Plus 5.0 (Statistical Graphics Corporation, VA). The graphs were set in Microsoft Excel 2007.

Results

The UV–vis spectra for supernatant samples of BHK cell cultures were characterized for three peaks with maximum absorbance around 286, 422, and 560 nm (Figures 1–3). The 286 nm peak did not show a clear relation with batch time. However, as a rule 422 nm peak increased as time increased, contrary performance for 560 nm peak was observed. However, from 600 nm no changes in absorbance were observed.

In the final moments of the batches with $NaHCO_3$ solution addition to control pH, the decrease of absorbance at 560 nm was not as marked as those for batches without pH control at the end of experiment (generally, after the second day of cell cultures; Figures 1–3).

The spectral data was well correlated with glutamine, glutamate, glucose, and lactate concentrations, together with the natural logarithm of viable cell concentration for both pH control modes. Six and four PLS components were necessary to model satisfactory batches performed without and with base solution, respectively. Values of R^2 (percent of variation of the training set –Y with PLS- explained by the model) and Q^2 (percent o f the variation of the training set – Y with PLS – predicted by the model according to cross validation), both with and without base solution addition, were >0.5 (Table 1).

The validation of PLS models were confirmed by the statistical significance of simple linear model between observed and predicted values ($P < 0.05$, data not shown) and the intercept (0) and slope (1) values of these linear models (Table 2). Statistically similar values ($P > 0.05$) for intercept and slope to 0 and 1, respectively, it is an evidence that the present chemometric method do not have signal interference and predicted values for parameters under consideration are similar to actual values.

The accuracy of PLS models was assessed by means of prediction error, the errors for glutamine and glutamate concentrations were <0.5 mM. The error range for glucose and lactate was in the 1.51–3.08 mM range. Viable cell concentration error for batches with pH control during the whole batch was two-fold higher than those related to batches without $NaHCO_3$ addition (Table 3). In general, similar predictions for glutamine, glutamate, glucose and lactate were observed for a batch performed without $NaHCO_3$ addition

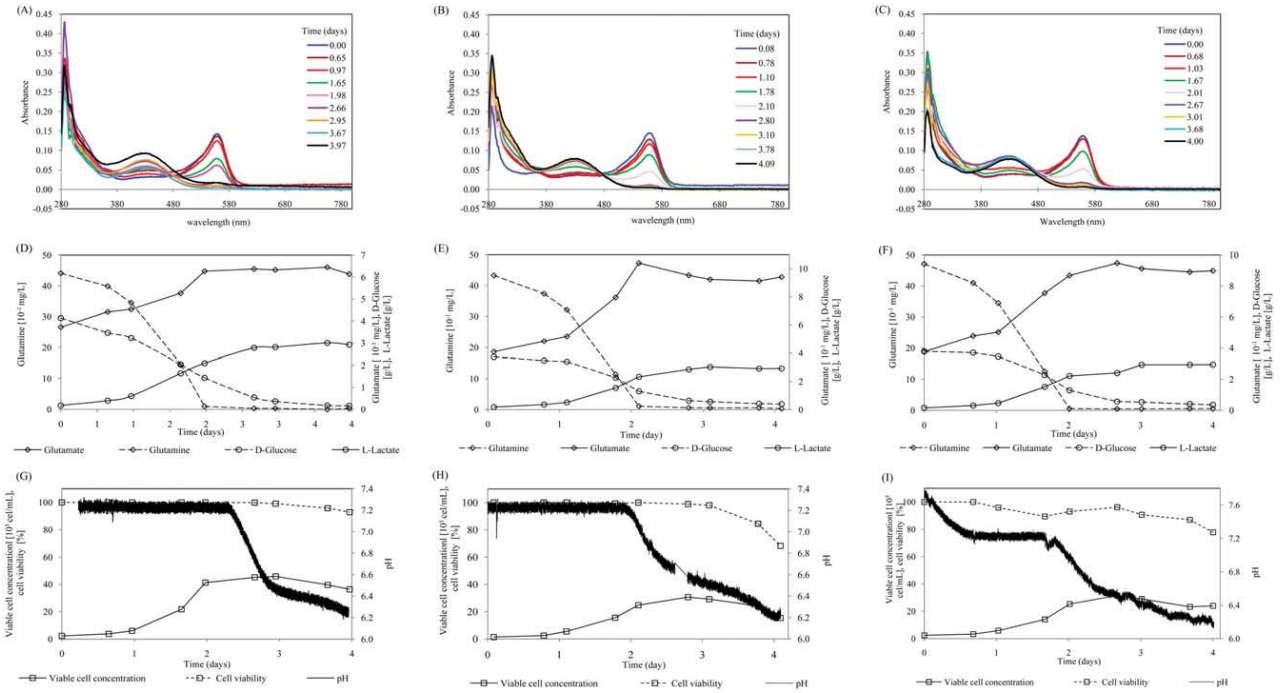


Figure 1. UV–vis Spectral (A–C), nutrients and metabolites (D–F), and pH profile and growth data (G–I) of samples from batches performed without base solution addition (pH control) at 10, 30, and 50% dissolved oxygen in Celligen bioreactor, respectively.

(Figure 4) respect to a batch with total time pH control (Figure 5; Table 3).

Discussion

Determinations of some substances or even biomedia characterization with specific analytical techniques are usually expensive, both on-line and off-line quantifications. The global direct methods for these purposes were developed to overcome this trouble; they are a combination of a hard part, for sensing and a soft part, for data treatment.[19] The UV–vis spectroscopy is one of the hard candidates that has been successfully tested for in situ determination, notwithstanding its use has been mainly used in wastewater characterization.[19,20]

UV–vis radiation has much more energy than infrared radiations, the most utilized electromagnetic spectrum range in bioprocess substances and biomass monitoring.[21] The UV–vis radiation absorption by a substance causes the excitation and transition of the outer electrons of the atomic or molecular orbitals. Therefore, rotational and vibrational levels of molecular orbitals are overlapped on the electronic levels, generating absorption spectra with broad bands. Besides, UV–vis spectra of aqueous samples are affected by presence of a second, dispersed phase (such as: bubbles or cells in bioreactors), because of light scattering effects.

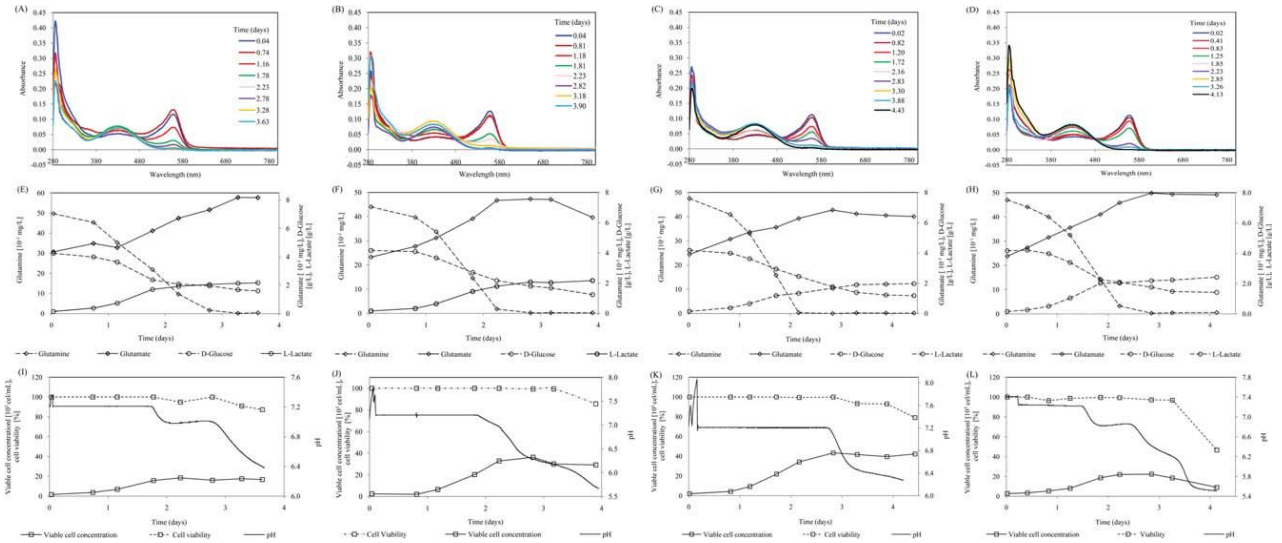


Figure 2. UV–vis Spectral (A–D), nutrients and metabolites (E–H), and pH profile and growth data (I–L) of samples from batches performed without base solution addition (pH control) at 10, 30, 50, and 70% dissolved oxygen in Bioflo 110 bioreactor, respectively.

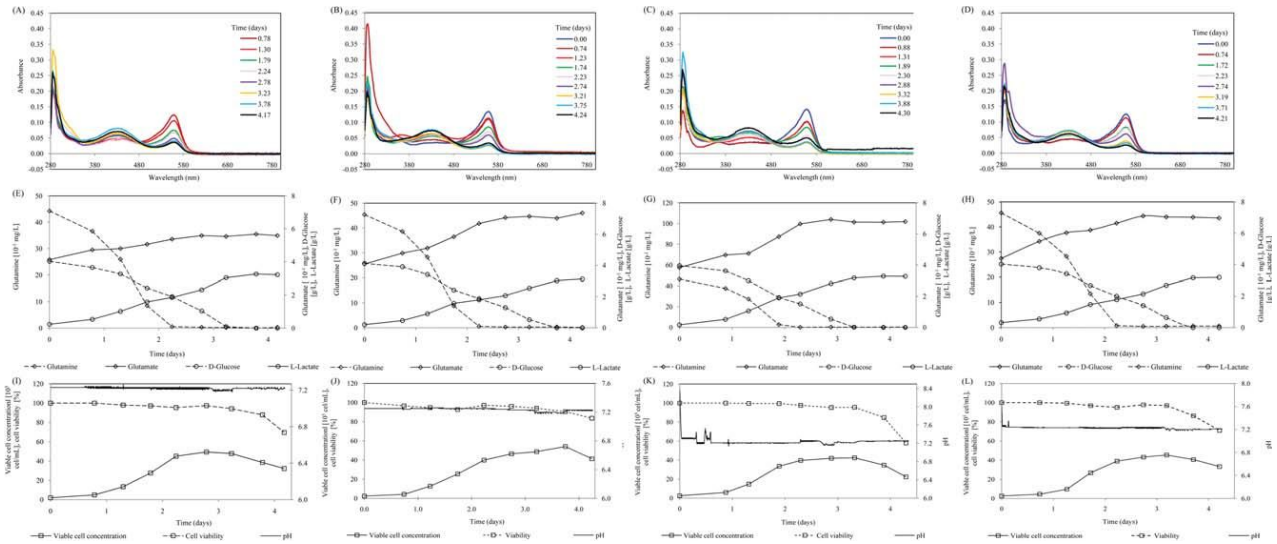


Figure 3. UV–vis Spectral (A–D), nutrients and metabolites (E–H), and pH profile and growth data (I–L) of samples from batches performed with $NaHCO_3$ addition (pH control) at 30 (repetition 1 and 2) and 50% (repetition 1 and 2) dissolved oxygen in Bioflo 110 bioreactor, respectively.

Table 1. Summary of Plot Cumulative R^2 and Q^2 for Monitored Parameters in Training Step for Batches Carried Out Without and With $NaHCO_3$ Addition

	Batches Without $NaHCO_3$ Addition			Batches with $NaHCO_3$ Addition		
Parameter	Number of PLS Components	R^2	Q^2	Number of PLS Components	R^2	Q^2
Glutamine concentration (mg/L)	6	0.928	0.883	4	0.865	0.761
Glutamate concentration (mg/L)		0.760	0.671		0.742	0.574
Glucose concentration (g/L)		0.957	0.926		0.973	0.880
Lactate concentration (g/L)		0.966	0.944		0.970	0.874
Ln [viable cell concentration (cell/mL)]		0.872	0.777		0.861	0.789

Table 2. Summary of Linear Models Parameter Significances in Validation Step for Observed vs Predicted Parameters

	Batches Without $NaHCO_3$ Addition Null Hypothesis		Batches with $NaHCO_3$ Addition Null Hypothesis	
Parameter	Intercept = 0	Slope = 1	Intercept = 0	Slope = 1
Glutamine concentration (mg/L)	0.513	0.645	0.979	0.571
Glutamate concentration (mg/L)	0.837	0.756	0.894	0.626
Glucose concentration (g/L)	0.243	0.922	0.613	0.077
Lactate concentration (g/L)	0.562	0.529	0.057	0.099
Ln [viable cell concentration (cell/mL)]	0.584	0.749	0.485	0.506

These spectra can provide poor information, but the utilization of multivariate data analysis has enabled to extract valuable information from them.[10] Up to date, in microorganism fermentation processes and animal cell cultures, UV–vis monitoring has not found wide application.[22] In this work, sample spectra were determined with cell removal for avoiding light scattering effects. In addition, two bioreactors with different aeration-homogenization systems were included in order to test the ability of UV–vis -PLS models for predicting culture broth components and viable cell concentration in dissimilar culture conditions without base solution addition to control pH. Other set of experiments with $NaHCO_3$ addition to control pH was also performed for calibrating another set of PLS models. The use of $NaHCO_3$ solution can modify the off-line UV–vis spectra of phenol red. For this reason, modeling was performed individually for each set of experiments. Both pH control modes were assessed because the BHK-21 cell line can be cultured in bioreactors using these two strategies in the batch mode.[23] Probably, this article could be one of the first works using this technique in mammalian cell culture.

The off-line spectral data from BHK-21 cell culture samples in bioreactor confirmed the three critical wavelengths associated to phenol red indicator, previously reported, 430, 475, and 560 nm.[24] The phenol red has two different isomers depending on the acidity of its host solution. With pH diminishing, the peaks at 430 and 560 nm, increase and decrease, respectively. The 475 nm wavelength is an isosbestic wavelength (Absorbance is independent of pH). Previously, it was developed a pH sensor using UV–vis spectroscopy, taking advantage of the relationship between UV–vis phenol red indicator spectrum and pH.[24] In this work, spectral changes were detected, even when pH was the same inside the bioreactor (first four samples from batches performed without $NaHCO_3$ solution (8 % m/v) addition (Figures 1 and 2) or for all samples from batches carried out with this reagent

Table 3. Summary of Prediction Error Averages for Each Parameter

Parameter	Prediction Error Average	
	Batches Without $NaHCO_3$ Addition	Batches With $NaHCO_3$ Addition
Glutamine concentration (mM)	0.31 ± 0.08	0.50 ± 0.10
Glutamate concentration (mM)	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
Glucose concentration (mM)	2.21 ± 0.46	1.51 ± 0.43
Lactate concentration (mM)	3.08 ± 0.49	1.89 ± 0.40
Ln [viable cell concentration (cell/mL)]	0.33 ± 0.07	0.52 ± 0.09
Viable cell concentration (cell/mL)	$5.96\ 10^5 \pm 7.06\ 10^5$	$1.23\ 10^6 \pm 2.31\ 10^5$

The represented values are the average ± standard error.

(Figure 3)]. Probably, this could be explained by sample dilution (10-fold) or due to the fact of being off-line determination, where gas composition in liquid phase is not the same respect to sample into the bioreactor, causing pH changes. The principle on which is based the proposed UV–vis approach is the relationship between metabolism of glutamine and glucose and Phenol red spectrum modifications. Both nutrients, after metabolism, can generate compounds (lactate and ammonium) which decrease the culture medium pH.[25,26] As a consequence, these nutrients and metabolites could be correlated to viable cell concentration for a cell culture in the batch mode, as it was recently performed.[27] The other significant peak (286 nm) in spectra of BHK-21 culture supernatant samples is likely associated to extracellular proteins and single aromatic amino acids. The absorbance of aromatic amino acids residues: Tryptophan, Tyrosine, and Phenylalanine, from 250 to 300 nm, are used to quantify the aromatic content of proteins[28] and therefore, they would be useful in estimation of total protein content in culture supernatant samples. However, a defined pattern of this spectral peak was not found. For these reasons, the wavelengths with high statistical importance on response variables in PLS (data not shown) were those associated with the Phenol red indicator.

The PLS models developed in this work were created using as input variables matrices, the sample absorbances from 280 to 800 nm, whereas the output variables matrices were the nutrient, metabolites and viable cell concentration quantified off-line. This vectorial method, PLS, is useful to find suitable correlations between both matrices. Six and four principal components (pairs of vectors, scores and loadings, in which are discomposed the original matrices) were necessary for properly modeling the response variables in batch culture performed without and with base solution addition, respectively (Table 1). Better correlations for glutamine, glucose, and lactate were detected from the training data used to calibrate PLS models. This can be justified by the relationship among pH and lactate and ammonium concentration in culture broth, as a consequence of glutamine and glucose metabolism.

In validation set data, the prediction errors for the glutamine and glucose models (Table 3) were improved or similar to the values reported for a PLS model based on near infrared spectral data in mammalian or insect culture media as well as those for mammalian cell cultures using Raman spectroscopy.[9,11,29]

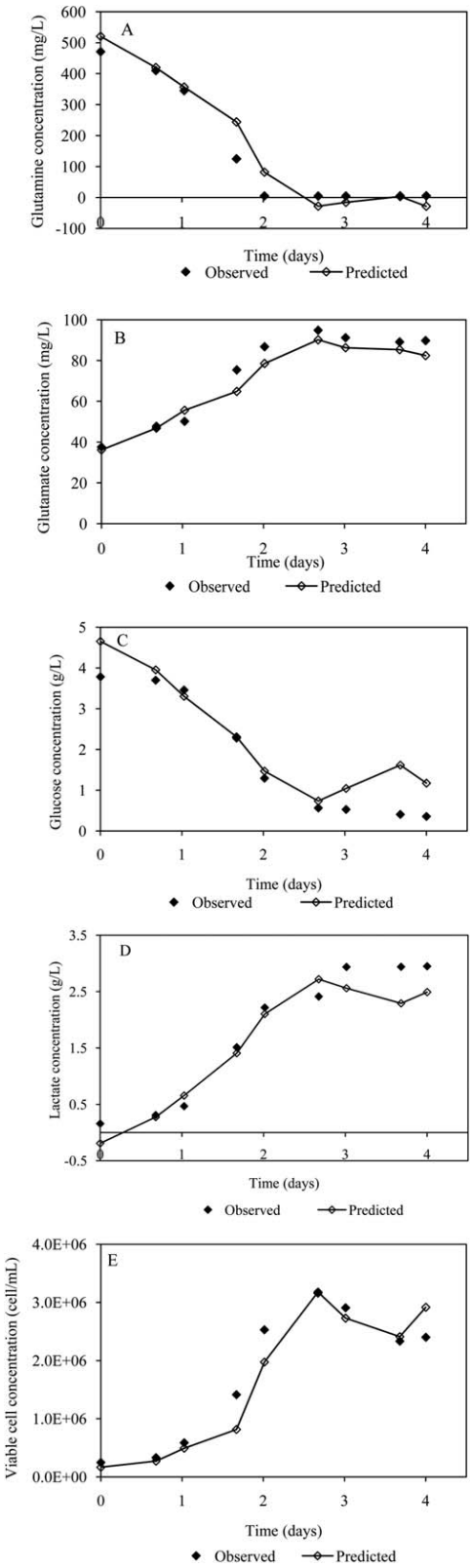


Figure 4. Predicted and actual values for different parameters from a batch at 50% OD without $NaHCO_3$ addition, in Celligen. A: Glutamine. B: Glutamate. C: Glucose. D: Lactate. E: Viable cell concentration.

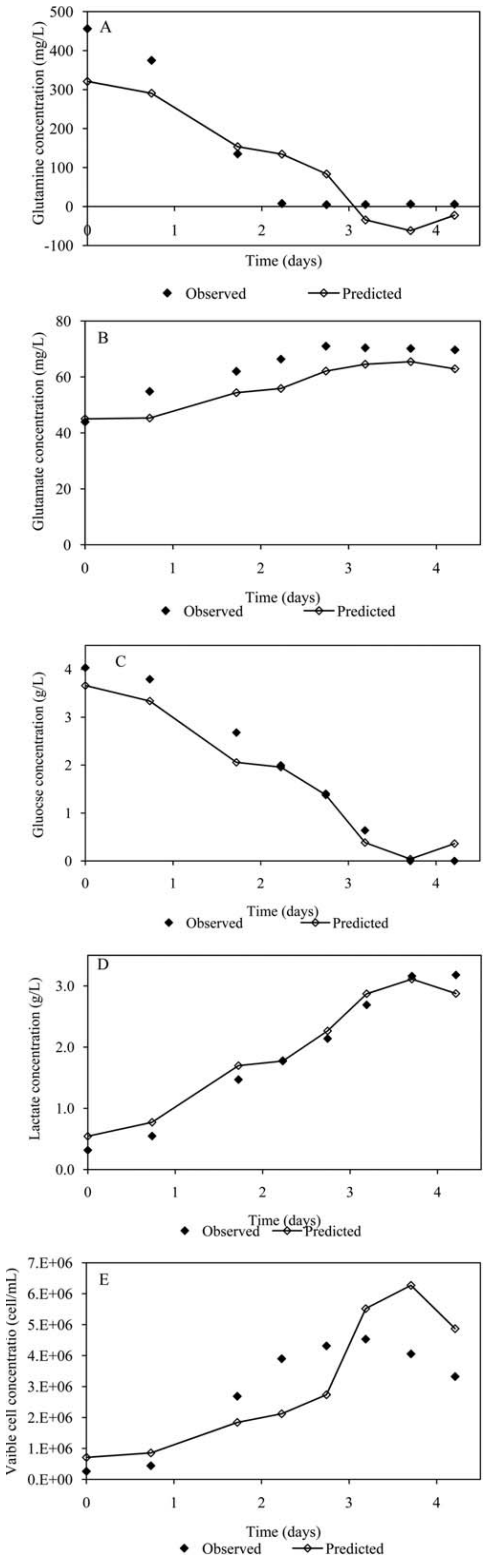


Figure 5. Predicted and actual values for different parameters from a batch at 50% OD with $NaHCO_3$ addition, in Bioflo 110. A: Glutamine. B: Glutamate. C: Glucose. D: Lactate. E: Viable cell concentration.

The nutrients and metabolites considered in this study were suitably predicted for two set of data, but in batches with $NaHCO_3$ addition, predictions should be improved, specifically for glutamine and glutamate (Figures 4 and 5). The increase of training data set could solve this problem. Analogous performance, with respect to viable cell concentration prediction was observed (Table 3, Figures 4 and 5). Regarding errors of this parameter, in the batch carried out with partial pH control (better prediction), where most of the cell concentrations were well predicted, the error in some samples was higher than 15%, the expected error for an experienced individual with cell counting using hemocytometer method.[30] Probably, the nutrients consumption and metabolites synthesis patterns are different for each dissolved oxygen concentration, then it would be necessary to calibrate a specific viable cell concentration for a particular dissolved oxygen concentration.

From the results of this work, fed-batch feeding schemes could be established. Additionally, an at-line UV–vis sensor could be also developed based on the current availability of UV-grade optical fibers, sensitive and cheaper array detectors, together with PLS technique.[10] The utilization of PLS technique associated to UV–vis spectra from samples of mammalian cell cultures using phenol red as pH indicator in culture medium could be an alternative to biomedia characterization using other more powerful spectral techniques like near infrared, fluorescence and more recently Raman spectroscopy.[11]

Conclusions

UV–vis off-line spectroscopy in combination with PLS model was able to estimate critical components of the culture medium of BHK-21 cell culture independent of dissolved oxygen concentration used, bioreactor and the strategy to control pH. This work opens possibilities for at-line sensor development for mammalian cell using phenol red in culture medium and decrease cost related to nutrients and metabolite quantifications. PLS model calibration must be performed for individual mammalian cell line.

Acknowledgments

The authors would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for postdoctoral fellowship (2010/52521-6), Fundação para o Desenvolvimento Tecnológico da Engenharia (FDTE), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: 483009/2010-5) for scientific grants. Corresponding author gratefully acknowledges his wife and daughter, Relma and Giovanna for the inspiration to write this article.

Literature Cited

1. Teixeira AP, Oliveira R, Alves PM, Carrondo MJT. Advances in on-line monitoring and control of mammalian cell cultures: Supporting the PAT initiative. *Biotechnol Adv*. 2009;27:726–732.
2. Huber R, Ritter D, Hering T, Hillmer AK, Kensy F, Müller C, Wang L, Büchs J. Robo-Lector – a novel platform for automated high-throughput cultivations in microtiter plates with high information content. *Microb Cell Fact*. 2009;8:1–15.
3. Gunther JC, Conner JS, Seborg DE. Process monitoring and quality variable prediction utilizing PLS in industrial fed-batch cell culture. *J. Process Contr*. 2009;19:914–921.
4. Cimander C, Mandenius CF. Online monitoring of a bioprocess based on a multi-analyser system and multivariate statistical process modeling. *J Chem Technol Biotechnol*. 2002;77:1157–1168.
5. Rudolph G, Lindner P, Gierse A, Bluma A, Martinez G, Hitzmann B, Scheper T. On-line monitoring of microcarrier based fibroblast cultivations with in situ microscopy. *Biotechnol Bioeng*. 2008;99:136–145.

6. Logan D, Carvell J. A Biomass monitor for disposable bioreactors. *Bioprocess Int*. 2011;9:48–54.
7. Petiot E, Bernard-Moulin P, Magadoux T, Gény C, Pinton H, Marc A. In situ quantification of microcarrier animal cell cultures using near-infrared spectroscopy. *Process Biochem*. 2010; 45:1427–1431.
8. Landgrebe D, Haake C, Höpfner T, Beutel S, Hitzmann B, Scheper T, Rhiel M, Reardon KF. On-line infrared spectroscopy for bioprocess monitoring. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;88: 11–22.
9. Riley MR, Rhiel M, Zhou X, Arnold MA, Murhammer DW. Simultaneous measurement of glucose and glutamine in insect cell culture media by near infrared spectroscopy. *Biotechnol Bioeng*. 1997;55:11–15.
10. Lourenço ND, Lopes JA, Almeida CF, Sarraguça MC, Pinheiro HM. Bioreactor monitoring with spectroscopy and chemometrics: A review. *Anal Bioanal Chem*. 2012;404:1211–1237.
11. Abu-Absi NR, Kenty BM, Cuellar ME, Borys MC, Sakhamuri S, Strachan DJ, Hausladen MC, Li ZJ. Real time monitoring of multiple parameters in mammalian cell culture bioreactors using an in-line Raman spectroscopy probe. *Biotechnol Bioeng*. 2011; 108:1215–1221.
12. Rathore AS, Bhushan N, Hadpe S. Chemometrics applications in biotech processes: A review. *Biotechnol Prog*. 2011;27: 307–315.
13. Dietmair S, Nielsen LK, Timmins NE. Engineering a mammalian super producer. *J Chem Technol Biotechnol*. 2011;86: 905–914.
14. Croughan MS, Hu WS. From microcarriers to hydrodynamics: Introducing engineering science into animal cell culture. *Biotechnol Bioeng*. 2006;95:220–225.
15. Auniņš JG. Viral Vaccine Production in Cell Culture. In: Flickinger MC, editor. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. New York: Wiley; 2010:1–35.
16. Lundstrom K, Schweitzer C, Rotmann D, Hermann D, Schneider EM, Ehrengruber MU. Semliki Forest virus vectors: e¤cient vehicles for in vitro and in vivo gene delivery. *FEBS Lett*. 2001;504:99–103.
17. Sandell L, Sakai D. Mammalian Cell Culture. In: Gallagher SR, Wiley EA, editors. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. Wiley; 2011: 4.3.1–4.3.32. http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470089941.et0403s5/abstract, doi: 10.1002/9780470089941. et0403s5.
18. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 6th ed. Hoboken: Wiley; 2010.
19. Pons MN, Le Bonté S, Potier O. Spectral analysis and fingerprinting for biomedia characterization. *J Biotechnol*. 2004;113: 211–230.
20. Langergraber G, Fleischmann N, Hofstaedter F. A multivariate calibration procedure for UV/VIS spectrometric quantification of organic matter and nitrate in wastewater. *Water Sci Technol*. 2003;47:63–71.
21. Cervera AE, Petersen N, Lantz AE, Larsen A, Gernaey KV. Application of near-infrared spectroscopy for monitoring and control of cell culture and fermentation. *Biotechnol Prog*. 2009; 25:1561–1581.
22. Liauw M A, Baylor LC, Rourke PEO. Chapter 4: UV - visible Spectroscopy for On-line Analysis. In: Bakeev KA, editor. *Process Analytical Technology: Spectroscopic Tools and Implementation Strategies for the Chemical and Pharmaceutical Industries*, 2nd ed. United Kingdom: Wiley; 2010:81–106.
23. Fernández-Núñez EG, Leme J, Parizotto LA, Chagas WA, Rezende AG, Costa BLV, Monteiro DCV, Boldorini VLL, Jorge SAC, Astray RM, Pereira CA, Caricati C P, Tonso A. Influence of aeration–homogenization system in stirred tank bioreactors, dissolved oxygen concentration and pH control mode on BHK-21 cell growth and metabolism. *Cytotechnology*. In press; doi: 10.1007/s10616-013-9612-0.
24. Xu X, Smith S, Urban J, Cui Z. An in line non-invasive optical system to monitor pH in cell and tissue culture. *Med. Eng. Phys*. 2006;28:468–474.
25. Cruz HJ, Ferreira AS, Freitas CM, Moreira JL, Carrondo MJT. Metabolic responses to different glucose and glutamine levels in baby hamster kidney cell culture. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1999;51:579–585.
26. Cruz HJ, Freitas CM, Alves PM, Moreira JL, Carrondo MJT. Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme Microb Technol*. 2000;27: 43–52.
27. Craven S, Shirsat N, Whelan J, Glennon B. Process model comparison and transferability across bioreactor scales and modes of operation for a mammalian cell bioprocess. *Biotechnol Prog*. 2013;29:186–196.
28. Kamerzell TJ, EsfandiaryR, Joshi SB, Middaugh CR, Volkin DB. Protein-excipient interactions: Mechanisms and biophysical characterization applied to protein formulation development. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63:1118–1159.
29. Rhiel, M, Cohen, MB, Murhammer, DW, Arnold, MA. Nondestructive near-infrared spectroscopic measurement of multiple analytes in undiluted samples of serum-based cell culture media. *Biotechnol Bioeng*. 2002;77:73–82.
30. Hoffman TL. Chapter 3: Counting cells. In: Celis JE. *Cell Biology. A Laboratory Handbook*, 3rd ed. Volume 1, Burlington: Elsevier; 2006:21–24.

Manuscript received Jul. 9, 2013, and revision received Dec. 10, 2013.

Cytotechnology (2014) 66:605–617
DOI 10.1007/s10616-013-9612-0

ORIGINAL RESEARCH

Influence of aeration–homogenization system in stirred tank bioreactors, dissolved oxygen concentration and pH control mode on BHK-21 cell growth and metabolism

Eutimio Gustavo Fernández Núñez · Jaci Leme · Letícia de Almeida Parizotto · Wagner Antonio Chagas · Alexandre Gonçalves de Rezende · Bruno Labate Vale da Costa · Daniela Cristina Ventini Monteiro · Vera Lucia Lopes Boldorini · Soraia Attie Calil Jorge · Renato Mancini Astray · Carlos Augusto Pereira · Celso Pereira Caricati · Aldo Tonso

Received: 2 March 2013 / Accepted: 27 June 2013 / Published online: 12 July 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract This work focused on determining the effect of dissolved oxygen concentration (DO) on growth and metabolism of BHK-21 cell line (host cell for recombinant proteins manufacturing and viral vaccines) cultured in two stirred tank bioreactors with different aeration-homogenization systems, as well as pH control mode. BHK-21 cell line adapted to single-cell suspension was cultured in Celligen without aeration cage (rotating gas-sparger) and Bioflo 110, at 10, 30 and 50 % air saturation (impeller for gas dispersion from sparger-ring). The pH was controlled at 7.2 as far as it was possible with gas mixtures. In other runs, at 30 and 50 % (DO) in Bioflo 110, the cells grew at pH controlled with CO_2 and $NaHCO_3$ solution. Glucose, lactate, glutamine, and ammonium were quantified by enzymatic methods. Cell concentration, size and specific oxygen consumption were also determined. When $NaHCO_3$ solution was not used, the optimal DOs were 10 and 50 % air saturation for Celligen and Bioflo 110, respectively. In this condition maximum cell concentrations were higher than 4×10^6 cell/mL. An increase in maximum cell concentration of 36 % was observed in batch carried out at 30 % air saturation in a classical stirred tank bioreactor (Bioflo 110) with base solution addition. The optimal parameters defined in this work allow for bioprocess developing of viral vaccines, transient protein expression and viral vector for gene therapy based on BHK-21 cell line in two stirred tank bioreactors with different agitation–aeration systems.

Keywords BHK-21 · Stirred tank bioreactor · Dissolved oxygen · Mammalian cell culture · BHK-21 cell metabolism

E. G. F. Núñez (✉) · L. de Almeida Parizotto · B. L. V. da Costa · C. A. Pereira · A. Tonso
Laboratório de Células Animais, Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Luciano Gualberto, Trav. 3, 380, Butantã, P.O. Box 61548, São Paulo, SP 05508-900, Brazil
e-mail: eutimiocu@yahoo.com

J. Leme · W. A. Chagas · C. P. Caricati
Laboratório Especial de Pesquisa e Desenvolvimento em Imunológicos Veterinários, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500, Butantã, São Paulo, SP 05503-900, Brazil

A. G. de Rezende · D. C. V. Monteiro · V. L. L. Boldorini · S. A. C. Jorge · R. M. Astray · C. A. Pereira
Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500, Butantã, São Paulo, SP 05503-900, Brazil

Introduction

Mammalian cells culture has been widely used for recombinant proteins and viral vaccines production, as well as gene therapy (Park et al. 2010; Vester et al. 2010; Merten 2006). Among cell lines with extensive utilization for these purposes are Chinese hamster

ovary (CHO), NS0 mouse myeloma, Baby hamster kidney (BHK), Human embryonic kidney 293 (HEK-293) and few human-derived cell lines (Krampe and Al-Rubeai 2010). Specifically, BHK cells have found applications primarily in veterinarian viral vaccines (foot-and-mouth disease and rabies viruses), and recently in human recombinant therapeutic proteins such as Factor VIII (Bödeker et al. 1994; Kallel et al. 2003; Auniņš 2010). Microcarrier support (pseudo-suspension) and suspension cell culture systems have been explored for this cell line when the scale-up of bioprocess is desired, because of monolayer culture limitations on large-scale (Kallel et al. 2003; Perrin et al. 1995; Butler 2005; Astley et al. 2007). Nevertheless, microcarriers increase process cost and require extra optimization steps during development like microcarrier type and concentration. To overcome these drawbacks, cell lines, including BHK, have been adapted to grow as single cells in suspension. Thus, higher cell densities and concomitant volumetric productivities could be achieved as well as the scalability of the manufacturing process becomes easier (Silva et al. 2008).

Several bioreactors configurations have been assessed for mammalian cell culture. For suspension culture, homogeneous bioreactors similar to those for bacterial and yeast cultures can be used (Kelley et al. 2008). Stirred tank, air-lift and bubble column bioreactors have already been operated successfully with suspension cultures of mammalian cells (Sambanis and Hu 2008; Doelle et al. 2009; Handa-Corrigan et al. 1989). The selection of bioreactors to produce a particular biopharmaceutical from this type of animal cells has to meet special demands such as gentle aeration and agitation in order to avoid cell damage, in parallel some process parameters like pH, temperature and dissolved oxygen must be well controlled (Doelle et al. 2009). Concentrations of toxic metabolites (lactate and ammonia) need to be at low levels (Doelle et al. 2009; Cruz et al. 2000a). The main goal in this task is to obtain high cell and/or product concentration.

The aims of this work was to determine the influence of aeration-homogenization system in stirred tank bioreactors at different dissolved oxygen concentrations as well as pH control mode on BHK-21 cell growth and metabolism. The results could be useful for optimizing viral vaccines production and transient heterologous protein expression.

Materials and methods

Cell line and culture medium

BHK-21 (C-13) cells (Sigma-Aldrich ECACC Cell Lines, Lyon, France) adapted to single cell suspension culture were kindly supplied by Dr. Renaud Wagner from Ecole Superieure Biotechnologie de Strasbourg (France). The culture medium used had the following composition by volume: Iscove's Modified Dulbecco Medium with glutamine and Phenol red (IMDM, catalog number 12200-036, Gibco, Grand Island, NY, USA) 45.5 %, High glucose Dulbecco′s Modified Eagle Medium (DMEM, catalog number 12100-046, Gibco, NY, USA) 45.5 %, heat inactivated fetal bovine serum (Catalog number 10082-147, Gibco) 5 %, 10 % m/v Pluronic F-68 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) aqueous solution 2 %, and 4 mM glutamine (Sigma-Aldrich) aqueous solution 2 %.

Inoculum preparation

One milliliter of BHK-21 cells (2×10^6 cell/mL) was thawed and placed in a 75 cm^2 tissue culture flask (vertical position) with 30 mL of culture medium for growing. Four days later, the cell suspension was used to inoculate (0.12×10^6 cell/mL) consecutively other tissue culture flasks with 25 and 75 cm^2, enough culture medium was added to reach final cellular suspensions of 10 and 30 mL, respectively. Inoculum for bioreactors was generated from 100 to 250 mL spinner flasks (Bellco Glass Inc., Vineland, NJ, USA), with operation volumes of 50 and 100 mL, respectively; the stirring speed was maintained at 30 rpm (Sci-Era quad drive stirrer system with a stirrer (Bellco Biotechnology, Vineland, NJ, USA). Spinners were previously inoculated (0.25×10^6 cell/mL) from 75 cm^2 tissue culture flask in the exponential phase. After 72 h, the inoculums for bioreactors were ready, the cell concentration and viability in spinners were $4.27 \times 10^6 \pm 0.85 \times 10^6$ cell/mL and 100 %, respectively. All the procedures described in this section were performed in an incubator (Thermoforma 3110, Marietta, OH, USA) at 37 °C and 5 % of carbon dioxide atmosphere.

Bioreactor cultures

Batch experiments in bioreactors were carried out in a 5 L Celligen (New Brunswick Scientific, Edison, NJ)

without aeration cage and 2 L Bioflo 110 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) at 37 °C, 80 rpm, with 2 and 1 L working volumes, respectively. The initial cell concentration was 0.25×10^6 cell/mL. For each bioreactor, dissolved oxygen was studied at 10, 30 and 50 % air saturation throughout the batch and the pH was controlled at 7.2 until possible using a gas mixture (carbon dioxide, air, oxygen and nitrogen). Two additional experiments were performed in Bioflo 110 at 30 and 50 % air saturation with controlling pH at 7.2 during the whole batch time, adding $NaHCO_3$ solution (8 % m/v) when necessary. Temperature, pH and dissolved oxygen over the course of batch cultures were online acquired by an in house LabVIEW program (National Instruments, Austin, TX ,USA). Other bioreactor operation parameters and aeration-homogenization details are shown in Table 1.

Cell counting and sizing

The cells were counted using improved Neubauer counting chamber (Precicolor, HBG, Giessen-Lützellinden, Germany) with proper sample dilution with Phosphate Buffer Saline. Viable cells were quantified in parallel using the trypan blue exclusion method (Augusto et al. 2010).

In some samples cell concentration and size were determined by Scepter handheld automated cell counter (Millipore, Billerica, MA, USA).

Nutrient and metabolite analysis

Five milliliter samples at different times during batches were taken. They were centrifuged at 750*g* for 4 min (Sorvall Biofuge Primo R Centrifuge, Thermo Electron Corp., Langenselbold, Germany). Subsequently, supernants were filtered through 0.22 μm filter (Millex-GV filter unit, Sao Paulo, Brazil) and frozen at −20 °C until analysis of nutrients and metabolites.

Glucose, lactate, glutamine and glutamate concentrations from supernant samples were measured using enzyme-coupled reaction and electrochemical detection, in YSI 2700 Select Bioanalyzer (YSI Life Sciences, Yellow Springs, OH, USA).

Ammonium quantification was performed by means of enzymatic–colorimetric method at 340 nm (EnzyChrom™ Ammonia/Ammonium Assay Kit (ENH3-100), BioAssay Systems, Hayward, CA, USA). Briefly, NADH was converted to NAD^+ in the presence of NH_3, ketoglutarate and glutamate dehydrogenase. The decrease in optical density is directly proportionate to ammonium and ammonia concentration in the samples.

Estimation of maximum specific growth rate, metabolite synthesis and nutrient consumption factors

Maximum specific growth rate, μ_{max}, was calculated by plotting natural logarithm of viable cell concentration versus time during exponential phase (Augusto et al. 2010).

Metabolite (lactate, glutamate and ammonium) to cell yield $\left(Y_{\frac{M}{x}}\right)$ for a given period was determined as Eq. 1:

$$Y_{M/x} = \frac{\Delta M}{\Delta X_v} = \frac{M(t_2) - M(t_1)}{X_v(t_2) - X_v(t_1)} \quad (1)$$

where $M(t_x)$ and X_v (t_x) are metabolite and cell concentration for a specific moment of the cell culture.

Nutrient (glucose and glutamine) consumption to cell yield $\left(Y_{\frac{N}{x}}\right)$ for a given period was calculated as Eq. 2:

$$Y_{N/x} = \frac{\Delta N}{\Delta X_v} = \frac{N(t_1) - N(t_2)}{X_v(t_2) - X_v(t_1)} \quad (2)$$

Table 1 Some operation parameters and aeration–homogenization devices for each stirred tank bioreactor

Bioreactor	Volumetric gas flow (mL/min)	VVM (min^{-1})*	Aeration–homogenization device	K_La (h^{-1})**
Celligen	400	0.2	Rotating gas-sparger	2.37
Bioflo 110	200		Classical (impeller for gas dispersion)	4.54

* VVM Volume of gas per liquid volume per minute

** K_La Volumetric oxygen transfer coefficient was determined experimentally by means of dynamic oxygen-electrode method (Scargiali et al. 2010)

where $N(t_x)$ is nutrient concentration for a specific moment of the cell culture.

Nutrient to metabolite conversion yield coefficients $\left(Y_{\frac{M}{N}}\right)$ (glutamine–ammonium and glucose–lactate pairs), for a given time interval, were calculated as Eq. 3:

$$Y_{M/N} = \frac{\Delta M}{\Delta N} = \frac{M(t_2) - M(t_2)}{N(t_1) - N(t_2)} \quad (3)$$

Cell specific oxygen consumption rate

The cell specific oxygen uptake rate (qO_2, nmol O_2 cell^{-1} min^{-1}) was determined by dynamic method without modifications. It was quantified from the depletion in the dissolved oxygen concentration after stopping the gas flow. In this condition the mass balance for the dissolved oxygen can be simplified as Eq. 4. The qO_2 is obtained as the rate of oxygen uptake ratio (OUR_d) and cell concentration (X_v). OUR_d is calculated from the slope of the plot of dissolved oxygen concentration versus time after stopping gas flow (Eq. 4) (Garcia-Ochoa et al. 2010). The procedure was repeated at several moments during the batch experiment. Specific oxygen consumption rate were calculated assuming air saturation concentration of 0.21 mM for oxygen at 37 °C (Cruz et al. 2000a).

$$\left(\frac{dC}{dt}\right)_d = -q_{O_2} \cdot X_v = -OUR_d \quad (4)$$

where $\left(\frac{dC}{dt}\right)_d$ is the accumulation of oxygen in the liquid phase.

Results

Influence of aeration–homogenization system in stirred tank bioreactors, dissolved oxygen concentration (batches performed without base addition to control pH)

The optimal dissolved oxygen concentration for batch experiments without $NaHCO_3$ solution (8 % m/v) addition was different for each bioreactor under study. The highest maximum cell concentrations were 4.34×10^6 cell/mL and 4.59×10^6 cell/mL for Bioflo 110 (50 % DO) and Celligen (10 % DO), respectively (Table 2). As a rule the best batch cultures (maximum cell concentration as a criterion) with this kind of partial pH control were associated to longer times of culture with pH values oscillating around 7.2. The pH decrease for Bioflo 110 (50 % DO) and Celligen (10 % DO) appeared at 2.75 and 2.32 days, in that order (Fig. 1). Simultaneously, the ammonium and lactate synthesis factors were lower than those related to other batches performed at different DO in this pH control condition (Table 2). The glutamine and glucose metabolism at optimal DO conditions were more efficient. Specifically, for glucose, values of lactate-glucose conversion factors were the lowest and distant of 2 (theoretical value for total conversion to lactate) (Table 2).

The μ_{max} values were in the 1.30–1.93 day^{-1} and 1.49–1.81 day^{-1} ranges for Bioflo 110 and Celligen, respectively (Table 2). The end of exponential phase in all experiments was around 2 days after bioreactor inoculation (Fig. 2). In almost all experiments, the viability was inferior to 90 % after 4 days from the inoculum, the exception was the batch performed in Celligen at 10 % DO (cell viability = 92.9 %) (Fig. 2d). This batch matched with the lowest ammonium synthesis (Table 2).

Influence of pH control mode

When pH was controlled during the whole batch, similar (50 % DO) and improved (30 % DO) values of maximum cell concentrations with respect to those for batches without base solution addition were observed (Table 2; Fig. 2). Concurrently, the glucose was totally exhausted (Fig. 2).

Glutamine consumption to cell yields for the batch performed at 30 % DO with base addition was lower than the same batch without $NaHCO_3$ solution (8 % m/v) addition at the end of the exponential phase (36 %) and maximum cell concentration (39 %), meanwhile the same values for this parameter were observed at 50 % DO with both pH control modes (Table 2). Besides, the yield of lactate and ammonium per cell were also inferior at 30 % DO with base addition with respect to similar batches without base addition. Opposite performance was observed at 50 % DO (Table 2).

General findings

Discrepancies between cell counting by hemocytometer and scepter handheld automated cell counter were

Table 2 Nutrient consumption, metabolite synthesis, conversion nutrient to metabolite factors and other characteristic parameters for each batch experiment

Bioreactor	DO (%)	$NaHCO_3$ addition	X_{max}–H (10^6cell/mL)	X_{max}–S (10^6cell/mL)	μ_{max} (day^{-1})	Reference time (day)	$Y_{\frac{Gln}{x}}$ (pg/cell)	$Y_{\frac{Glc}{x}}$ (pg/cell)	$Y_{\frac{Glu}{x}}$ (pg/cell)	$Y_{\frac{NH_4}{x}}$ (pg/cell)	$Y_{\frac{Lac}{x}}$ (pg/cell)	$Y_{\frac{Glc}{Gln}}$ (mol/mol)	$Y_{\frac{NH_4}{Gln}}$ (mol/mol)	$Y_{\frac{Lac}{Glc}}$ (mol/mol)
Bioflo 110	10	Without	1.85	1.73	1.30	1.78^{EEP}	197	1317	10	14	1094	0.05	0.59	1.68
						2.23^{MCC}	238	1287	14	34	1049	0.06	1.17	1.65
	30	Without	3.63	2.95	1.93	2.23^{EEP}	139	655	12	14	536	0.09	0.85	1.65
						2.82^{MCC}	130	696	11	13	565	0.09	0.84	1.64
		With	4.94	3.94	1.52	2.24^{EEP}	102	533	3	8	378	0.03	0.60	1.44
						2.78^{MCC}	93	681	3	9	440	0.03	0.78	1.31
	50	Without	4.34	3.73	1.55	2.16^{EEP}	147	539	7	8	372	0.05	0.42	1.40
						2.83^{MCC}	115	581	7	8	368	0.06	0.58	1.28
		With	4.24	3.68	1.68	2.30^{EEP}	141	654	6	4	559	0.05	0.25	1.73
						2.88^{MCC}	116	988	7	6	752	0.06	0.44	1.54
Celligen	10	Without	4.59	3.51	1.81	1.98^{EEP}	111	692	7	0.2	492	0.06	0.01	1.44
						2.95^{MCC}	100	864	6	5.0	604	0.06	0.04	1.42
	30	Without	3.07	2.97	1.69	2.10^{EEP}	181	1045	27	5.5	919	0.15	0.25	1.78
						2.80^{MCC}	146	1059	19	4.4	914	0.13	0.25	1.75
	50	Without	3.16	3.35	1.49	2.01^{EEP}	204	1090	22	22	902	0.11	0.88	1.67
						2.67^{MCC}	223	1619	25	26	1335	0.11	0.94	1.67

All factors were calculated using as initial moment, the time when the first sample of batch experiments was taken. Reference times, end of exponential phase (EEP) and maximum cell concentration (MCM), were used to define the end of time interval to calculate factors. Gln, Glc, Glu, NH_4 and Lac represent glutamine, glucose, glutamate, ammonium and lactate, respectively. X_{max}–H and X_{max}–S represent maximum viable cell concentration determined by hemocytometer and total cell concentration by Millipore® Scepter handheld automated cell counter, respectively

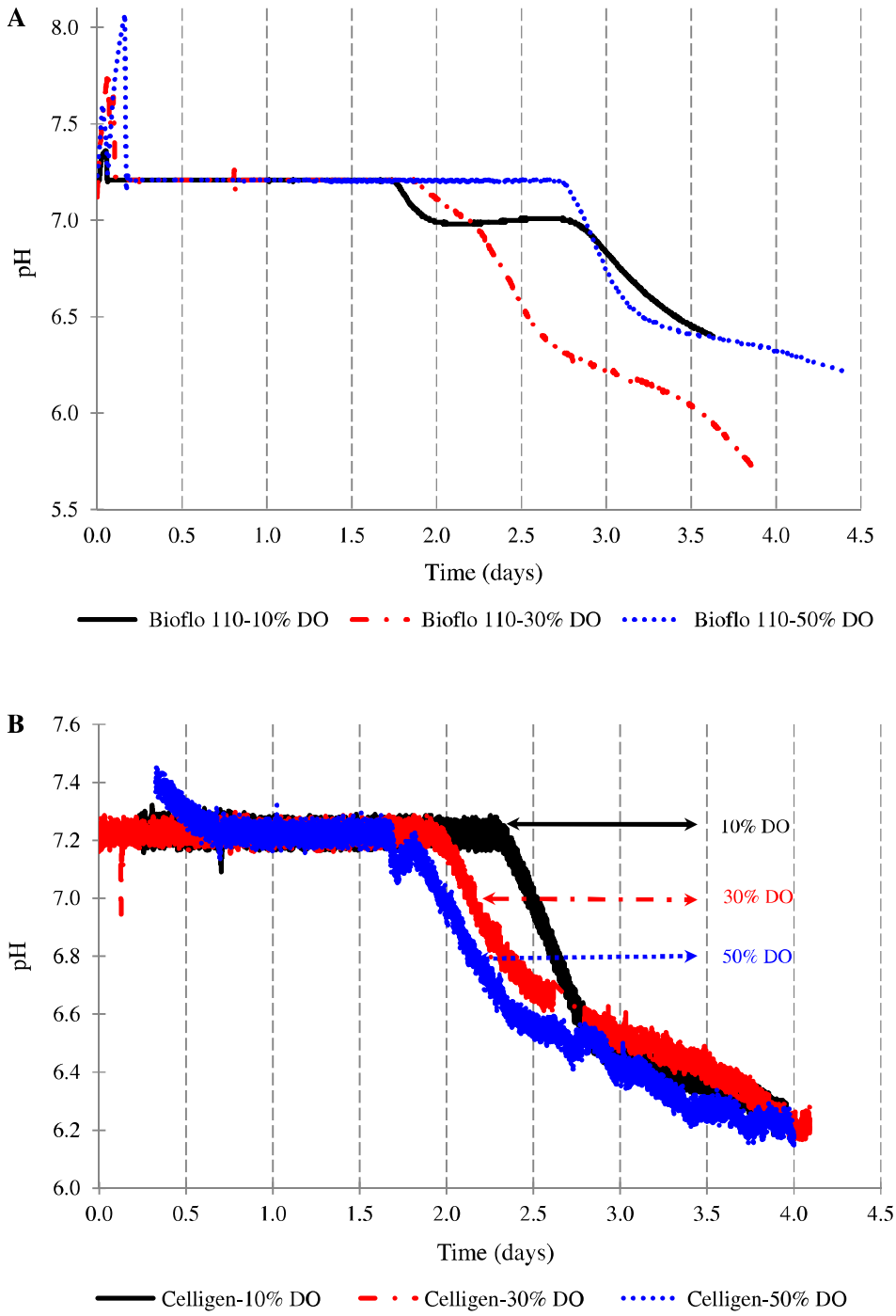


Fig. 1 pH profiles for the experiments performed in Celligen and Bioflo 110 bioreactors without addition of base solution to control pH. **a** Batches in Bioflo 110. **b** Batches in Celligen

detected. This was most evident for cell concentration higher than 3.5×10^6 cell/mL (Table 2). Probably, the changes of culture medium at high cell concentration interfere in impedance-based particle detection used by the scepter counter.

The oxygen cell consumption was higher in batches performed without base addition in Celligen. However, in both experimental conditions, a decrease in the cell specific oxygen consumption rate throughout the experiment was confirmed (Fig. 3). At the end of the batches, the qO_2 values were similar (1.14–4.75 10^{-7} nmol O_2 $cell^{-1}$ min^{-1}). A similar inverse relationship between cell size and culture time was also observed. As a conclusion, for this parameter, highest maximum cell concentrations were associated to smallest cell size at the end of batch culture. When maximum cell

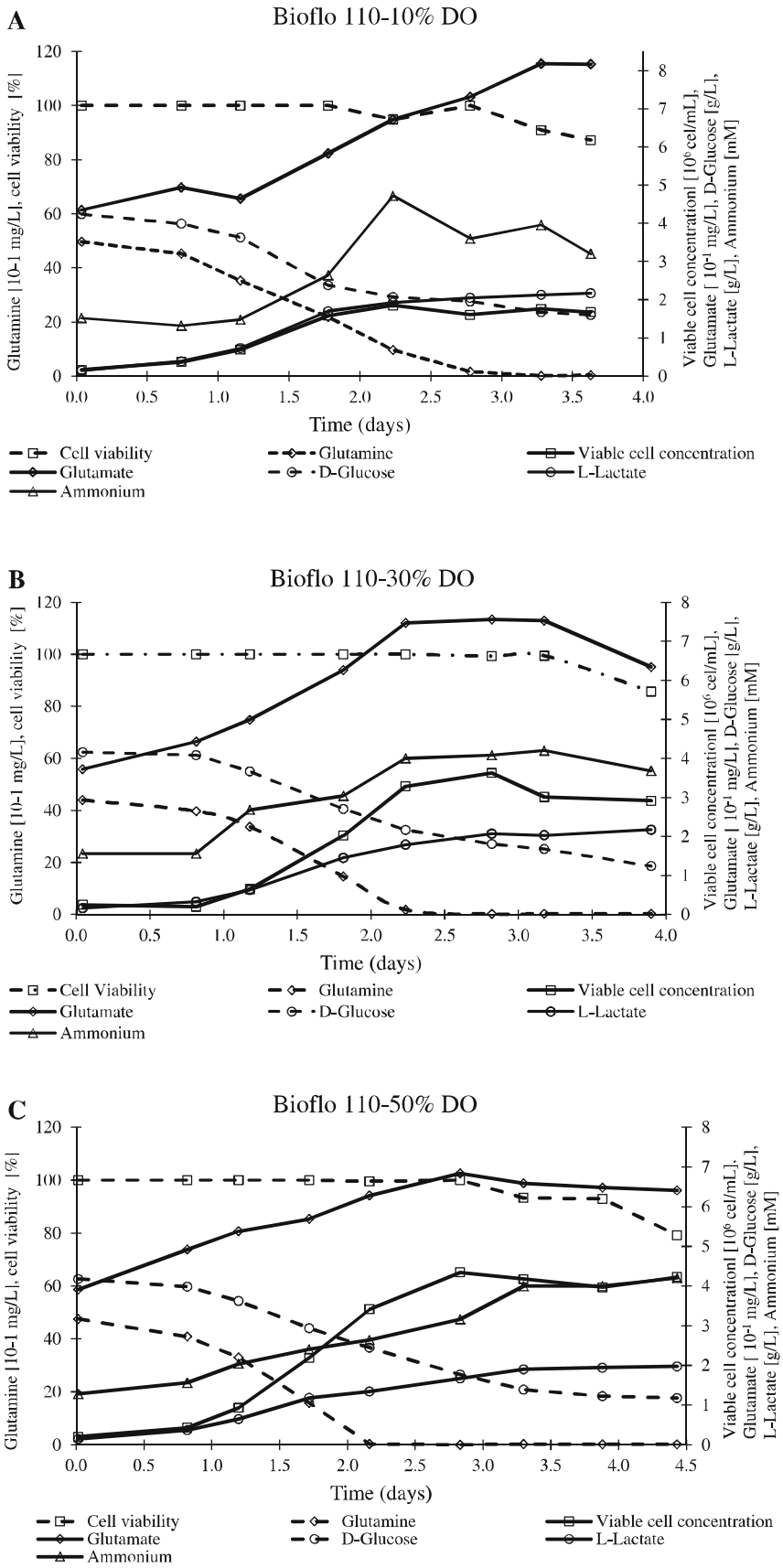


Fig. 2 Profiles of viable cell concentration, cell viability, nutrients (glutamine and D-glucose) and metabolites (glutamate, ammonium and L-Lactate). **a** Bioflo 110–10 % DO. **b** Bioflo 110–30 % DO. **c** Bioflo 110–50 % DO. **d** Celligen-10 % DO. **e** Celligen-30 % DO. **f** Celligen-50 % DO. **g** Bioflo 110–30 % DO (with $NaHCO_3$ addition). **h** Bioflo 110–50 % DO (with $NaHCO_3$ addition)

Fig. 2 continued

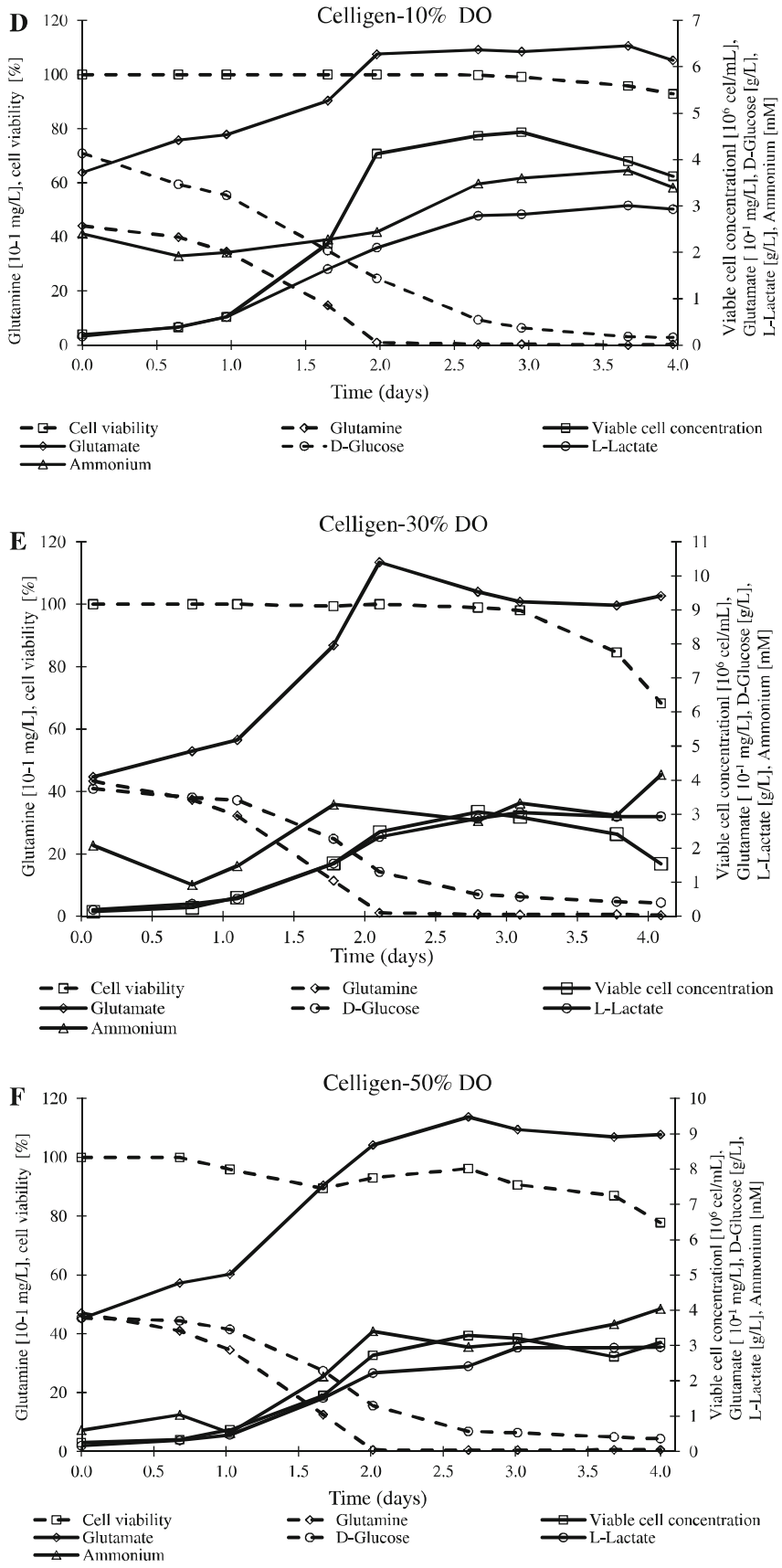
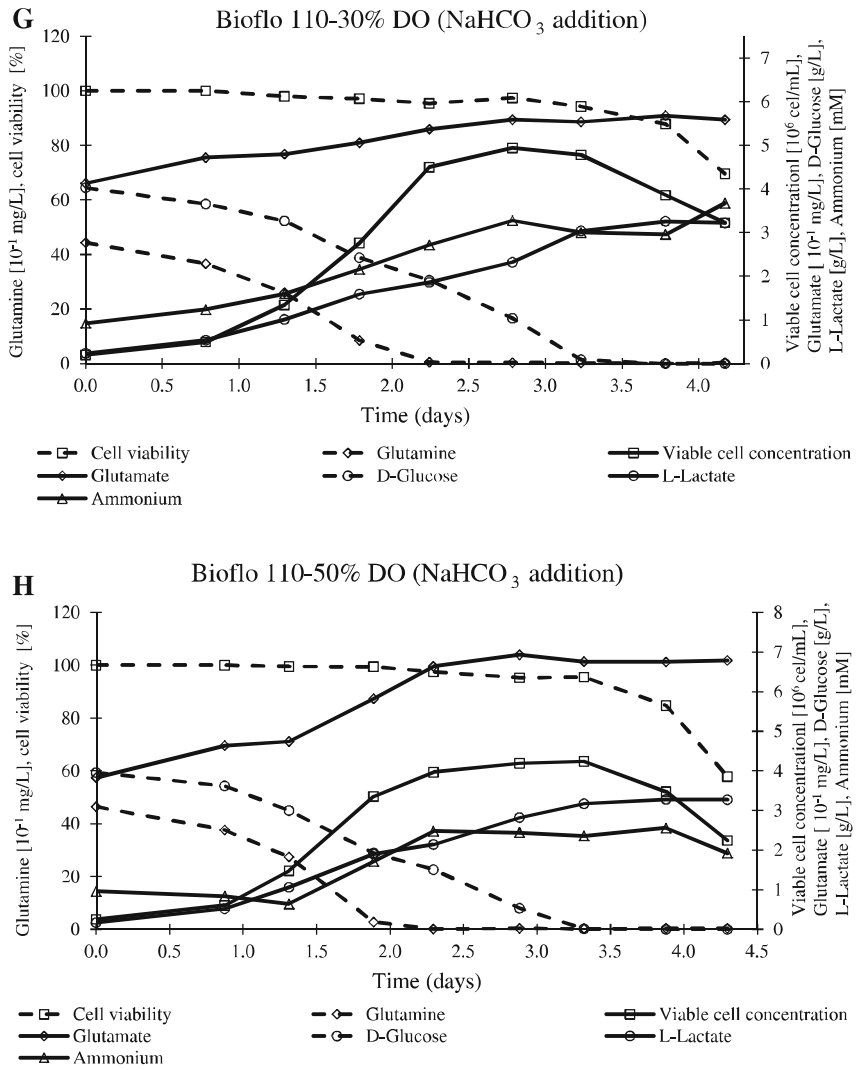


Fig. 2 continued



concentrations were higher than 4×10^6 cell/mL, the cell sizes were smaller than 11 μm (Fig. 4).

Discussion

Despite the high number of publications about BHK-21 culture in bioreactors and metabolism (Kallel et al. 2003; Perrin et al. 1995; Teixeira et al. 2005; Cruz et al. 2000b), combined studies about different bioreactors assessment at different dissolved oxygen concentrations are not often addressed. Similarly, the impact of pH control mode (with or without base addition) is not usually set.

In the present work a classical stirred tank bioreactor (Bioflo 110) was compared to a modified cell lift impeller bioreactor (Celligen) (Mirro and Voll 2009). The modifications consisted of removing the aeration cage (useful for cell culture with microcarriers) and the working volume level was lower in relation to the discharge ports. Thus, the agitation device was a rotating gas-sparger. To avoid cell damage caused by shear forces resulting from mechanical agitation and aeration, it was included in culture medium composition, Pluronic F-68 (0.2 % m/v) was included in culture medium composition, its protecting effect was reinforced with fetal bovine serum addition (Molina-Grima et al. 1997).

The maximum cell concentrations ($1.85-4.94 \times 10^6$ cell/mL, Table 2) for both bioreactors under study, operating in different conditions, were higher or similar to other reported values for this parameter in BHK-21 or recombinant BHK-21 cells suspension cultures using fetal bovine serum or serum-free or

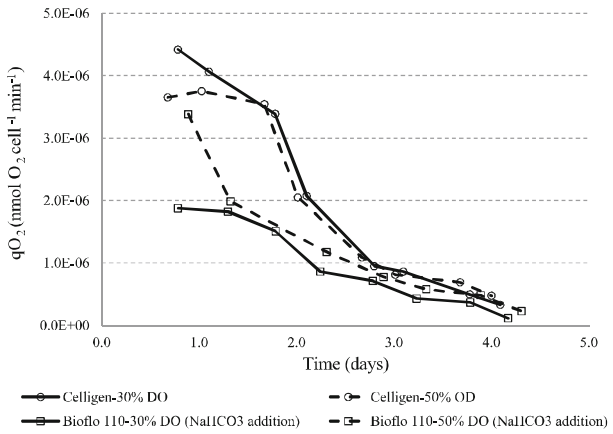


Fig. 3 Cell specific oxygen consumption rate profile for batches performed in different bioreactors with or without $NaHCO_3$ addition

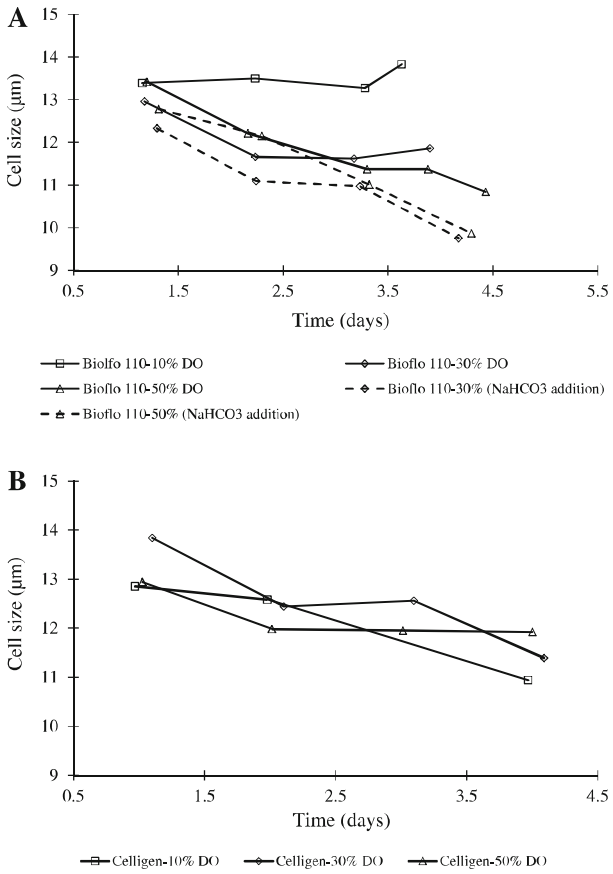


Fig. 4 Cell size profiles defined by Millipore® Scepter handheld automated cell counter. **a** Bioflo. **b** Celligen

protein-free media in batch mode (1−3.2 × 10^6 cell/mL) (Handa-Corrigan et al. 1989; Cruz et al. 2002; Moreira et al. 1995; Ishaque et al. 2007). In general, the studies related with increase of cell concentration in BHK-21 cell lines are focused on the optimization of the glutamine and glucose metabolism (Cruz et al. 2000a; Cruz et al. 2000b; Butler and Jenkins 1989). Rarely, the influence of cell physical environment and the concentration of other important molecule for both metabolic pathways, oxygen, are explored for this purpose. In the present work, low glucose and glutamine consumption to cell yield, as well as low lactate-glucose and ammonium-glutamine yield coefficients were observed in both bioreactors when highest maximum cell concentrations were reached (Table 2). This suggests that 10 and 50 % DO for Celligen and Bioflo 110 (without base addition) are proper conditions for more efficient glucose and glutamine metabolism of BHK-21 cell with a culture medium with 4 g/L of glucose and 3.72 mM of glutamine. The earlier drop of initial pH (7.2) (Fig. 1) in those experiments with low values of maximum cell concentration could be explained by the high production of lactate and ammonium, metabolites responsible for pH decrease and growth inhibition (Cruz et al. 2000a). However, carbon dioxide (CO_2) accumulation effect (inducing pH decrease) in culture media should not be neglected. The differences between optimal DO for each bioreactor could be justified by different efficient conditions for CO_2 stripping out. It has been reported that aeration systems designed for effective oxygen transfer will not necessarily be efficient for CO_2 removal (Birch 2010). Probably, gas mixtures to keep constant low DO (10 %) are suitable to CO_2 stripping from culture broth and favoring BHK-21 metabolism and respiration in a stirred tank bioreactor with a rotating gas-sparger (Celligen with modifications).

The effective pH control throughout the whole batch prevents the intracellular acidification and as a consequence, normal cell physiology is guaranteed. Thus the negative effects of lactate and ammonium ions is reduced, because of the reduction of their intrinsic toxicity and osmolarity effects. Therefore, the improvement of maximum cell concentration and glutamine consumption to cell yield at 30 % DO in the Bioflo 110 as well as the total glucose total consumption (30 and 50 % DO) when base solution was added is justified by this pH control mode in bioreactor (Table 2; Fig. 2b, e). However, an increase in the maximum cell concentration was not observed at 50 % DO. Probably, the bioconversion yield ($Y_{\frac{Gln}{X}}$, $Y_{\frac{Glc}{X}}$) without or with base addition was similar because gas

mixture compositions at this DO are able to maintain pH constant until the minimum limit value for glutamine consumption to cell yield for BHK-21 cell line at 50 % DO. Thus, it was demonstrated that base addition to control pH at 7.2 was not necessary to improved maximum cell concentration at 50 % DO in the Bioflo 110 bioreactor (Figs. 1a, 2c, h).

Based on the direct relationship between the end of the exponential phase and glutamine depletion, glutamine could be considered the limiting substrate. However, the increase of this amino acid concentration in culture medium is not a suitable alternative in order to increase maximum cell concentration because high ammonium synthesis could be induced at glutamine concentration above 4 mM (Butler and Jenkins 1989). Ammonium levels for this culture medium (3.72 mM of glutamine) were already high enough to promote apoptosis in BHK cells (>2 mM) (Teixeira et al. 2005). In addition, ammonium is released by cells due to the amino acids (Schneider et al. 1996), and not only due to glutamine metabolism; the values of $Y_{NH_4/Gln}$ are much lower than 2 (theoretical value for a complete oxidation of glutamine through the tricarboxylic acid cycle) (Table 2). This result suggests that glucose is the principal energetic source for BHK cells in both bioreactors in the 10–50 % DO range, in particular for Celligen 10 % DO (Table 2). On the other hand, batch with low maximum cell concentrations in Celligen (30 and 50 % DO) were associated to high $Y_{Glu/Gln}$ values. This could be justified by the enhanced action of glutaminase (responsible for enzymatic glutamine degradation into glutamate and ammonium in bioreaction broth) contained in fetal bovine serum (Ozturk and Palsson 1990), at 30 and 50 % DO in the rotating gas-sparger bioreactor (Table 2).

Considering that lactate was only produced by aerobic glycolysis (lactate formation is also possible from glutamine (Schneider et al. 1996)), more than 64 % $\left(Y_{Lac/Glc} = 1.28\right)$ of glucose was metabolized following this metabolic route for all experiments (Table 2); the rest was metabolized through tricarboxylic acid cycle. Under normal condition, mammalian cells in bioreactors consume large amounts of glucose; nearly 90 % of this monosaccharide is converted to lactate (Mulukutla et al. 2010). For DO concentration which ensures highest cell concentration in Celligen without aeration cage (10 % air saturation), upto 71 % of glucose was converted to lactate. With the same criterion, for the best conditions in stirred tank bioreactor assessed in this work (DO at 30 % air saturation and pH control with base solution addition), the lactate–glucose conversion percentage was at most of 66 %. Thus, the use of glucose in optimal conditions for both bioreactors was similar to other reported values for BHK-21 culture at high glucose concentrations ($Y_{Lac/Glc}$, in 1.5–1.6 mol/mol range) (Cruz et al. 1999) and suitable for mammalian cell culture (much less than 90 %) (Mulukutla et al. 2010).

The maximum lactate concentration at the end of the exponential phase among performed batches was 2.33 g/L (26 mM), for Celligen at 30 % air saturation (Fig. 2). Therefore, the BHK-21 cell culture in conditions considered in this work should not be inhibited by lactate, because it has been reported that inhibitory lactate concentrations for BHK-21 cells were around 28 mM in suspension cultures (Cruz et al. 2000a).

The proximity of conversion factors for two critical moments of the batch (Table 2), the end of the exponential phase and the maximum cell concentration, was confirmed. In general, the time difference is around 12 h. This also suggests a substrate (glutamine) inhibition of growth as was previously mentioned (Radlett et al. 1971).

The maximum specific growth rate for mammalian cells varies in the range of 0.55–1.39 day^{-1} (Dietmair et al. 2012). In both Celligen and Bioflo BHK-21 cultures, the maximum specific growth rates were higher or next to the superior limit of the usual range for this variable (Table 2). This is an important parameter for maximizing production of viruses when they are more active in cycling cells. It has been demonstrated by several authors that enhanced cell growth rates should lead to an increased viral production rate (Merten 2004). Thus, BHK-21 cell line, culture medium and bioreactor configurations used in this study are suitable for viral vaccine manufacturing, transient protein expression and gene therapy vector production.

Regarding, cell specific oxygen uptake rates, their profiles and values for evaluated conditions in both bioreactors were similar to others as previously reported (Cruz et al. 2000a; Cruz et al. 1999) for the BHK-21 cell line at high initial glucose concentration (4 g/L). The decrease of cell specific oxygen uptake

rates over the course of bioconversion could be justified by changes in medium composition and cell growth phase (Garcia-Ochoa et al. 2010; Jorjani and Ozturk 1999). The lactate concentration increase has a direct influence on cell specific oxygen uptake rate decrease (Cruz et al. 2000a). Higher initial cell specific oxygen uptake rates in Celligen is an evidence of more efficient glucose metabolism in this bioreactor compared to the Bioflo 110 bioreactor at the beginning of batches (Fig. 3).

Low cell size was an indicative of the high cell concentration in both bioreactor (Figs. 2, 4). One of the causes of this relationship could be the osmolarity increase. Higher osmolarity results in a decrease of cell volume due to the enhanced efflux of water (Seewöster and Lehmann 1997). It has been reported that accumulation of lactate leads to high osmolarity (Li et al. 2010). As high lactate concentrations were directly correlated with high cell concentrations (Fig. 2), this metabolite could be the main component for the increase in osmolarity.

Conclusion

Taking into consideration the highest maximum BHK-21 cell concentration as choice criterion, best dissolved oxygen concentrations for assessed stirred tank bioreactors were 10 (rotating gas-sparger) and 50 % (with impeller for gas dispersion) air saturation. As a consequence, the impact of aeration–homogenization system on BHK-21 cell growth and metabolism was quantified. These findings are valid when no $NaHCO_3$ solution (8 % m/v) is added to control pH. Addition of base solution in conjunction with CO_2 in aeration mixtures could be significant, but it depends on dissolved oxygen concentration. In this work, maximum BHK-21 cell concentration at 30 % air saturation in classical stirred tank was improved in 36 % when the pH was controlled during the whole bioreaction time with respect to a similar experiment perfomed without base addition. Nevertheless, no differences were detected for 50 % air saturation for the same bioreactor. The optimal parameters defined in this work allow for bioprocess development for manufacturing of viral vaccines, transient protein expression and viral vector production for gene therapy purposes based on the use BHK-21 cells grown in suspension in two types of bioreactors operating in batch mode.

Acknowledgments The authors would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for post-doctoral fellowship (2010/52521-6), Fundação para o Desenvolvimento Tecnológico da Engenharia (FDTE) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: 483009/2010-5) for scientific grants. First author gratefully acknowledges his wife and daughter, Relma and Giovanna for the inspiration to write this paper.

References

Astley K, Naciri M, Racher A, Al-Rubeai M (2007) The role of $p21^{cip1}$ in adaptation of CHO cells to suspension and protein-free culture. J Biotechnol 130:282–290

Augusto EFP, Moraes AM, Piccoli RAM, Barral MF, Suazo CAT, Tonso A, Pereira CA (2010) Nomenclature and guideline to express the amount of a membrane protein synthesized in animal cells in view of bioprocess optimization and production monitoring. Biologicals 38:105–112

Auniņš JG (2010) Viral vaccine production in cell culture. In: Flickinger MC (ed) Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology. Wiley, New York, pp 1–35

Birch JR (2010) Suspension culture, animal cells. In: Flickinger MC (ed) Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology. Wiley, Hoboken, pp 1–28

Bödeker BGD, Newcomb R, Yuan P, Braufman A, Kelsey W (1994) Production of recombinant factor VIII from perfusion cultures: I. Large-scale fermentation. In: Spier RE, Griffiths JB, Berthold W (eds) Animal cell technology: Products of today, prospects for tomorrow. Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, pp. 580–583

Butler M (2005) Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. Appl Microbiol Biotechnol 68:283–291

Butler M, Jenkins H (1989) Nutritional aspects of the growth of animal cells in culture. J Biotechnol 12:97–110

Cruz HJ, Ferreira AS, Freitas CM, Moreira JL, Carrondo MJT (1999) Metabolic responses to different glucose and glutamine levels in baby hamster kidney cell culture. Appl Microbiol Biotechnol 51:579–585

Cruz HJ, Freitas CM, Alves PM, Moreira JL, Carrondo MJT (2000a) Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. Enzyme Microb Tech 27:43–52

Cruz HJ, Moreira JL, Carrondo MJT (2000b) Metabolically optimised BHK cell fed-batch cultures. J Biotechnol 80:109–118

Cruz HJ, Conradt HS, Dunker R, Peixoto CM, Cunha AE, Thomaz M, Burger C, Dias EM, Clemente J, Moreira JL, Rieke E, Carrondo MJT (2002) Process development of a recombinant antibody/interleukin-2 fusion protein expressed in protein-free medium by BHK cells. J Biotechnol 96:169–183

Dietmair S, Nielsen LK, Timmins NE (2012) Mammalian cells as biopharmaceutical production hosts in the age of omics. Biotechnol J 7:75–89

Doelle HW, Fiechter A, van Griensven M, Kasper C, Pörtner R, Schlegel G, Shimizu S, Stahl F, Suck K, Yamada H, Zorn H (2009) Biotechnology 6. Special applications. Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. Wiley, New York, pp 73–112

Garcia-Ochoa F, Gomez E, Santos VE, Merchuk JC (2010) Oxygen uptake rate in microbial processes: an overview. Biochem Eng J 49:289–307

Handa-Corrigan A, Emery AN, Spier RE (1989) Effect of gas–liquid interfaces on the growth of suspended mammalian cells: mechanisms of cell damage by bubbles. Enzyme Microb Tech 11:230–235

Ishaque A, Thrift J, Murphy JE, Konstantinov K (2007) Overexpression of Hsp70 in BHK-21 cells engineered to produce recombinant factor VIII promotes resistance to apoptosis and enhances secretion. Biotechnol Bioeng 97:144–155

Jorjani P, Ozturk SS (1999) Effects of cell density and temperature on oxygen consumption rate for different mammalian cell lines. Biotechnol Bioen 64:349–356

Kallel H, Rourou S, Majoul S, Loukil H (2003) A novel process for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells grown on microcarriers in a 20-l bioreactor. App Microbiol Biotechnol 61:441–446

Kelley BD, Chiou TW, Rosenberg M, Wang DIC (2008) Industrial animal cell culture. In: Rehm HJ, Reed G (eds) Biotechnology set, 2nd edn. Wiley, Weinheim, pp 23–38

Krampe B, Al-Rubeai M (2010) Cell death in mammalian cell culture: molecular mechanisms and cell line engineering strategies. Cytotechnology 62:175–188

Li F, Vijayasankaran N, Shen AY, Kiss R, Amanullah A (2010) Cell culture processes for monoclonal antibody production. MAbs 2:466–477

Merten O-W (2004) State-of-the-art of the production of retroviral vectors. J Gene Med 6:S105–S124

Merten O-W (2006) Introduction to animal cell culture technology—past, present and future. Cytotechnology 50:1–7

Mirro R, Voll K (2009) Which impeller is right for your cell line? A guide to impeller selection for stirred-tank bioreactors. BioProcess Int 7:52–57

Molina-Grima E, Chisti Y, Moo-Young M (1997) Characterization of shear rates in airlift bioreactors for animal cell culture. J Biotechnol 54:195–210

Moreira JL, Alves PM, Feliciano AS, Aunins JG, Carrondo MJT (1995) Serum-free and serum-containing media for growth of suspended BHK aggregates in stirred vessels. Enzyme Microb Tech 17:437–444

Mulukutla BC, Khan S, Lange A, Hu WS (2010) Glucose metabolism in mammalian cell culture: new insights for tweaking vintage pathways. Trends Biotechnol 28:476–484

Ozturk SS, Palsson BO (1990) Chemical decomposition of glutamine in cell culture media: effect of media type, pH, and serum concentration. Biotechnol Prog 6:121–128

Park JH, Park HH, Park TH (2010) Cellular engineering for the high-level production of recombinant proteins in mammalian cell systems. Korean J Chem Eng 27:1042–1048

Perrin P, Madhusudana S, Gontier-Jallet C, Petres S, Tordo N, Merten O-W (1995) An experimental rabies vaccine produced with a new BHK-21 suspension cell culture process: use of serum-free medium and perfusion-reactor system. Vaccine 13:1244–1250

Radlett PJ, Telling RC, Stone J, Whiteside JP (1971) Improvements in the growth of BHK-21 cells in submerged culture. Appl Microbiol 22:534–537

Sambanis A, Hu WS (2008) Cell culture bioreactors. In: Rehm HJ, Reed G (eds) Biotechnology set, 2nd edn. Wiley, Weinheim, pp 105–125

Scargiali F, Busciglio A, Grisafi F, Brucato A (2010) Simplified dynamic pressure method for kLa measurement in aerated bioreactors. Biochem Eng J 49:165–172

Schneider M, Marison IW, von Stockar U (1996) The importance of ammonia in mammalian cell culture. J Biotechnol 46:161–185

Seewöster T, Lehmann J (1997) Cell size distribution as a parameter for the predetermination of exponential growth during repeated batch cultivation of CHO cells. Biotechnol Bioeng 55:793–797

Silva AC, Delgado I, Sousa MFQ, Carrondo MJT, Alves PM (2008) Scalable culture systems using different cell lines for the production of Peste des Petits ruminants vaccine. Vaccine 26:3305–3311

Teixeira A, Cunha AE, Clemente JJ, Moreira JL, Cruz HJ, Alves PM, Carrondo MJT, Oliveira R (2005) Modelling and optimization of a recombinant BHK-21 cultivation process using hybrid grey-box systems. J Biotechnol 118:290–303

Vester D, Rapp E, Kluge S, Genzel Y, Reichl U (2010) Virus–host cell interactions in vaccine production cell lines infected with different human influenza A virus variants: a proteomic approach. J Proteomics 73:1656–1669

Appl Biochem Biotechnol (2011) 164:401–409
DOI 10.1007/s12010-010-9143-5

Improved Bioprocess with CHO-hTSH Cells on Higher Microcarrier Concentration Provides Higher Overall Biomass and Productivity for rhTSH

Daniella C. Ventini · Renata Damiani · Alvaro P. B. Sousa · João E. de Oliveira · Cibele N. Peroni · Maria T. C. P. Ribela · Paolo Bartolini · Aldo Tonso · Carlos R. J. Soares · Carlos A. Pereira

Received: 14 July 2010 / Accepted: 7 December 2010 /
Published online: 23 December 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract Since the recombinant thyroid-stimulating hormone (rhTSH) is secreted by stably transfected Chinese hamster ovary (CHO-hTSH) cells, a bioprocess consisting of immobilizing the cells on a substrate allowing their multiplication is very suitable for rhTSH recovering from supernatants at relative high degree of purity. In addition, such a system has also the advantage of easily allowing delicate manipulations of culture medium replacement. In the present study, we show the development of a laboratory scale bioprocess protocol of CHO-hTSH cell cultures on cytodex microcarriers (MCs) in a 1 L bioreactor, for the preparation of rhTSH batches in view of structure/function studies. CHO-hTSH cells were cultivated on a fetal bovine serum supplemented medium during cell growth phase. For rhTSH synthesis phase, 75% of supernatant was replaced by animal protein-free medium every 24 h. Cell cultures were monitored for agitation (rpm), temperature (°C), dissolved oxygen (% DO), pH, cell concentration, MCs coverage, glucose consumption, lactate production, and rhTSH expression. The results indicate that the amount of MCs in the culture and the cell concentration at the beginning of rhTSH synthesis phase were crucial parameters for improving the final rhTSH production. By cultivating the CHO-hTSH cells with an initial cell seeding of four cells/MC on 4 g/L of MCs with a repeated fed batch mode of operation at 40 rpm, 37 °C, 20% DO, and pH 7.2 and starting the rhTSH synthesis phase with 3×10^6 cells/mL, we were able to supply the cultures with enough glucose, to maintain low levels of lactate, and to provide high percent (~80%) of fully covered MCs for a long period (5 days) and attain a high cell concentration (~9×10^5 cells/mL). The novelty of the

D. C. Ventini · A. P. B. Sousa · C. A. Pereira (✉)
Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil
e-mail: grugel@butantan.gov.br

R. Damiani · J. E. de Oliveira · C. N. Peroni · M. T. C. P. Ribela · P. Bartolini · C. R. J. Soares
Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN,
São Paulo, Brazil

D. C. Ventini · A. P. B. Sousa · A. Tonso · C. A. Pereira
Laboratório de Células Animais, Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica, USP,
São Paulo, Brazil

present study is represented by the establishment of cell culture conditions allowing us to produce ~1.6 mg/L of rhTSH in an already suitable degree of purity. Batches of produced rhTSH were purified and showed biological activity.

Keywords rhTSH · CHO cells · Microcarriers · Animal cells · Protein expression · Bioreactor

Abbreviation

rhTSH	Recombinant thyroid-stimulating hormone
CHO	Chinese hamster ovary
MCs	Cytodex microcarriers
DO	Dissolved oxygen

Introduction

Human thyroid-stimulating hormone (hTSH), also known as thyrotropin, is a peptide hormone synthesized in the anterior pituitary gland which regulates the endocrine function of the thyroid gland. It is a glycoprotein and consists of two subunits, the alpha and the beta subunit. The alpha TSH subunit shares the same aminoacid sequence of human chorionic gonadotropin, luteinizing hormone, and human follicle-stimulating hormone. Although with different N-glican structure [1, 2], the hTSH beta subunit is unique for hTSH and determines its function. hTSH has an outstanding clinical interest, being used for diagnosis and therapy of thyroid cancer, a tumor occurring at 17,000 new cases in USA [3, 4].

Recombinant human TSH (rhTSH) synthesized and secreted by animal cells in culture fulfills the requirements to be used clinically for thyroid cancer management [5, 6]. rhTSH can also be efficiently used for diagnosis of thyroid dysfunctions. Several fundamental studies, such as thyroid mapping or structure/function relationship of cell receptors, can also be carried out using well purified and functional rhTSH [7, 8].

Nevertheless, bioprocesses producing rhTSH in required amounts are laborious and time consuming. Since CHO cells have been the cell of choice to transfect and synthesize rhTSH [4, 9, 10], basically two main bioprocess technologies are available. They rely on a particular characteristic of these cells: growing attached to a surface or free in suspension [11–14]. These two technologies have been used and show advantages and disadvantages [15]. In general, responses of the specific productivities to suspension or adherent CHO cell culture conditions differed significantly among cell lines [15]. Free suspension CHO cell cultures are easy to handle and to scale-up, but since rhTSH is secreted in the supernatant by cultured cells, the adherent cell technology with microcarriers may save efforts and costs during rhTSH harvest and purification and is still used by several academic and industrial groups [9].

Increase in CHO cells upstream productivity has been the result of considerable effort both on the biological and the process engineering level. Nevertheless, the results cannot automatically be transferred to other classes of recombinant products. Signal molecules such as hormones are among potential CHO cell products for which process development still need optimizations.

The literature is poor in terms of bioprocess for rhTSH production by CHO cells, focus essentially on downstream process and basically only one company is supplying the rhTSH [9]. The novelty of the work presented here was to establish a productive and reliable upstream protocol for adherent CHO-hTSH cell cultures on higher microcarrier concentration in a bioreactor, in order to provide suitable guideline to prepare rhTSH batches for purification and biological function studies.

Material and Methods

A clone, obtained in our laboratory, derived from CHO DHFR cells (mutant line DXB11), co-transfected with the dicistronic vectors pEDdc-α and pEAdc-βTSH and expressing hTSH [4], was used in this work.

A CHO-hTSH cell bank was used throughout the study. The cells were firstly grown on T-flasks (Corning, São Paulo, Brazil) with minimal essential medium alpha medium (αMEM; Invitrogen Life Technologies GIBCO, São Paulo, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Cultilab, Campinas, Brazil) and then transferred to a 1 L BioFlo110 bioreactor (New Brunswick Scientific, NJ, USA) using the same medium. Cultures were then monitored and controlled for agitation (rpm—40), temperature (t°—37 °C) and dissolved oxygen (DO—20%). Data was online acquired by a homemade LabVIEW program (National Instruments, Austin, TX). Cytodex microcarriers (MCs; GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) at different concentrations (2 or 4 g/L) were hydrated with 100 mL PBS for 24 h at 37 °C, and CHO-hTSH cell culture runs in the bioreactors were started with a cell seeding of 10^5 cells/mL.

For the initial cell growth phase, the cultures were maintained in αMEM + 10% FBS. The rhTSH production phase was started with Chinese hamster ovary serum-free medium (CHO-S-SFM II; Invitrogen Life Technologies GIBCO, São Paulo, Brazil) at different cell concentrations (0.3, 1, or 3×10^6 cells/mL), depending on the assay, with a repeated fed batch mode of operation consisting of 75% CHO-S-SFM II volume change every 24 h. The harvested CHO-hTSH cell supernatants were stored at −20 °C for rhTSH quantification, purification, and bioactivity evaluation.

Samples were collected periodically and kinetic studies were made by analyzing cell growth, metabolism, and rhTSH production. Cell concentration ($\times10^6$ cells/mL) was determined in hematocytometer counting camber, Neubauer, by counting stained nuclei isolated from cells treated with 0.1 M citric acid (Merck Chemicals, São Paulo, Brazil) and 0.2% *w*/*v* crystal violet (Merck Chemicals, São Paulo, Brazil). Specific cell growth (μX and μ_{max}) was calculated with line equation on ln X/Xo graphics with Excel Software (Microsoft, USA). Contamination control was performed by culturing supernatant samples in appropriated medium and by observing culture parameters such as pH and DO. No contamination was found throughout the study.

Glucose and lactate (g/L) were measured in an YSI 2,700 (Yellow Spring Instrument, OH, USA) biochemistry analyzer. rhTSH was quantified by immunoradiometric assay [16, 17] and was expressed as specific rhTSH (μg/10^5 cells) synthesis or rhTSH volumetric (rhTSH/mL) production. A purification strategy, already described in detail [18], was used to purify the produced rhTSH batches. The biological activity of the purified CHO-hTSH derived rhTSH was evaluated by an in vivo bioassay in which rhTSH-induced T_4 is measured after suppression of endogenous TSH by administration of T_3 in BALB/c mice [18].

Results

The experiments in the present study were conducted in order to optimize rhTSH production by CHO-hTSH cells upon cultivation on cytodex MCs in a 1 L bioreactor. The main parameters studied for this purpose were the MCs concentration (2 or 4 g/L) in cultures and the cell concentration (0.3 to 3×10^6 cells/mL) for starting the repeated batch cultures.

A CHO-hTSH cell population was previously established [4] and have been shown to synthesize rhTSH upon cultivation with alpha minimal essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum (αMEM + 10% FBS) in T-flasks [19] or MCs suspension cultures in spinners (data not shown). The present study assayed CHO-hTSH cultures in bioreactors establishing a cell growth phase with αMEM + 10% FBS and a rhTSH production phase with CHO-S-SFM II.

Previous studies on spinners or bioreactors have shown that best conditions of CHO-hTSH cell growth and rhTSH production were obtained under the following conditions: 37 °C, 40 rpm, 20% DO. A 75% medium change every 24 h was shown to enable the cultures to be performed with suitable levels of glucose and lactate (data not shown).

As shown in Fig. 1, CHO-hTSH cell cultures on 2 g/L of MCs and initial rhTSH production phase with 0.3×10^6 cells were monitored and controlled at 40 rpm, 37 °C, pH 7.2, and 20% DO (Fig. 1a). Evaluation of MCs cell loading showed that the initial cell seeding (eight cells/MC) and the initial culture conditions enable a process with no empty

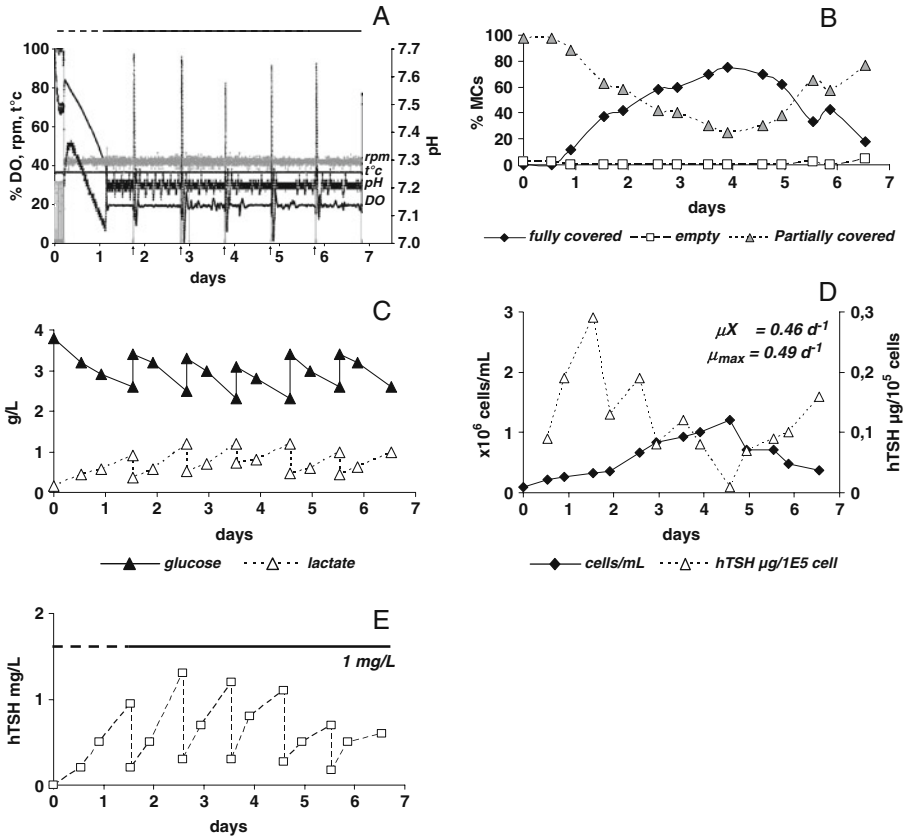


Fig. 1 CHO-hTSH cell culture: 2 g/L of MCs with rhTSH production phase at 0.3×10^6 cells/mL. **a** Monitoring and control of agitation (rpm), temperature (*t*, °C), pH, and dissolved oxygen (DO). **b** Kinetics of MC coverage (% MCs). **c** Kinetics of glucose consumption and lactate production (g/L). **d** Kinetics of cell multiplication (cells/mL), specific cell growth (μX and μ_{max}), and specific rhTSH synthesis (μg/10^5 cells). **e** Kinetics of volumetric rhTSH production (g/L). *Arrows* indicate medium replacement. *Dashed line* indicates cell growth phase; *continuous line* indicates rhTSH production phase

MC throughout the cell culture. Fully covered MCs reach values not higher than 60% to 75% during 2 to 3 days of the rhTSH production phase (Fig. 1b). Glucose and lactate concentrations remained during the whole culture period in, respectively, high and low levels (Fig. 1c). CHO-hTSH cells growth slowly reached a density of ~10^6 cells/mL at day 5, with a μX of 0.46 day^{-1} and a μ_{max} of 0.49 day^{-1}. Specific rhTSH synthesis, with an average value of 0.097 μg/10^5 cells, was shown to be inversely proportional to cell growth (Fig. 1d) and volumetric rhTSH production was of the order of 1 mg/L (Fig. 1e). The assayed culture conditions allowed a rhTSH production phase of 5 days and the preparation of 3.7 mg of rhTSH in a total harvested volume of 3.75 L.

With the aim of improving the culture conditions by providing a better MCs loading and extending the rhTSH production phase, we designed a CHO-hTSH cell culture assay with an optimized cell growth phase by initiating the rhTSH production phase with a higher cell concentration. Conditions used for establishing initial steps of cell culture (cell growth phase), as described below, led to a higher and sustained rhTSH synthesis (production phase).

As shown in Fig. 2, CHO-hTSH cell cultures on 2 g/L of MCs and initial rhTSH production phase with 10^6 cells were also monitored and controlled at 40 rpm, 37 °C, pH 7.2, and 20% DO (Fig. 2a). Evaluation of MCs cell loading showed that fully covered MCs reach values higher than 80% during 5 days of the rhTSH production phase (Fig. 2b). Glucose and lactate concentrations remained during the whole culture period in suitable levels (Fig. 2c, d). CHO-hTSH cells growth attained and remained at high cell density (~1.8×10^6 cells/mL) for 5 days, with a μX of 0.47 day^{-1} and a μ_{max} of 0.58 day^{-1}. Specific rhTSH synthesis, with an average value of 0.044 μg/10^5 cells, was again shown to be inversely proportional to the cells growth (Fig. 2e) and volumetric rhTSH production enabled the preparation of 0.68 mg/L (Fig. 2f). The assayed culture conditions allowed a rhTSH production phase of 7.5 days and the production of 4.1 mg of rhTSH in a total harvested volume of 6 L.

The above data showed us that an extended CHO-hTSH growth phase allowed a longer rhTSH production phase with a better MC loading. The lower specific rhTSH synthesis associated to the cell concentration led to a lower volumetric rhTSH production.

With the aim of improving the CHO-hTSH cell density in the culture and keeping the previous productive conditions, we designed a CHO-hTSH cell culture assay with a higher MC concentration (4 g/L) and initiating the rhTSH production phase with a 3×10^6 cells/mL.

As shown in Fig. 3, CHO-hTSH cell cultures on 4 g/L of MCs and initial rhTSH production phase with 3×10^6 cells were also efficiently monitored and controlled at 40 rpm, 37 °C, pH 7.2, and 20% DO (Fig. 3a). Evaluation of MCs cell loading showed that fully covered MCs reach values higher than 70% during 5 days of the rhTSH production phase (Fig. 3b). Glucose and lactate concentrations remained during the whole culture period in suitable levels (Fig. 3c). CHO-hTSH cells growth attained and remained at high cell density (~2×10^6 cells/mL) for 6 days with a μX of 0.63 day^{-1} and a μ_{max} of 0.67 day^{-1}. Specific rhTSH synthesis, with an average value of 0.048 μg/10^5 cells, was maintained in these culture conditions (Fig. 3d) and volumetric rhTSH production enabled the preparation of 1.6 mg/L (Fig. 3e). The assayed culture conditions allowed a rhTSH production phase of 7.5 days and the production of 9.6 mg of rhTSH in a total harvested volume of 6 L.

Data shown in Fig. 3 indicate that the established bioprocess conditions (higher MC concentration and rhTSH production phase) enabled the CHO-hTSH cell cultures to be performed in better conditions of cell growth and rhTSH synthesis, leading consequently to a higher rhTSH volumetric production. The higher cell concentration attained associated to the steady specific rhTSH synthesis led to a higher volumetric rhTSH production.

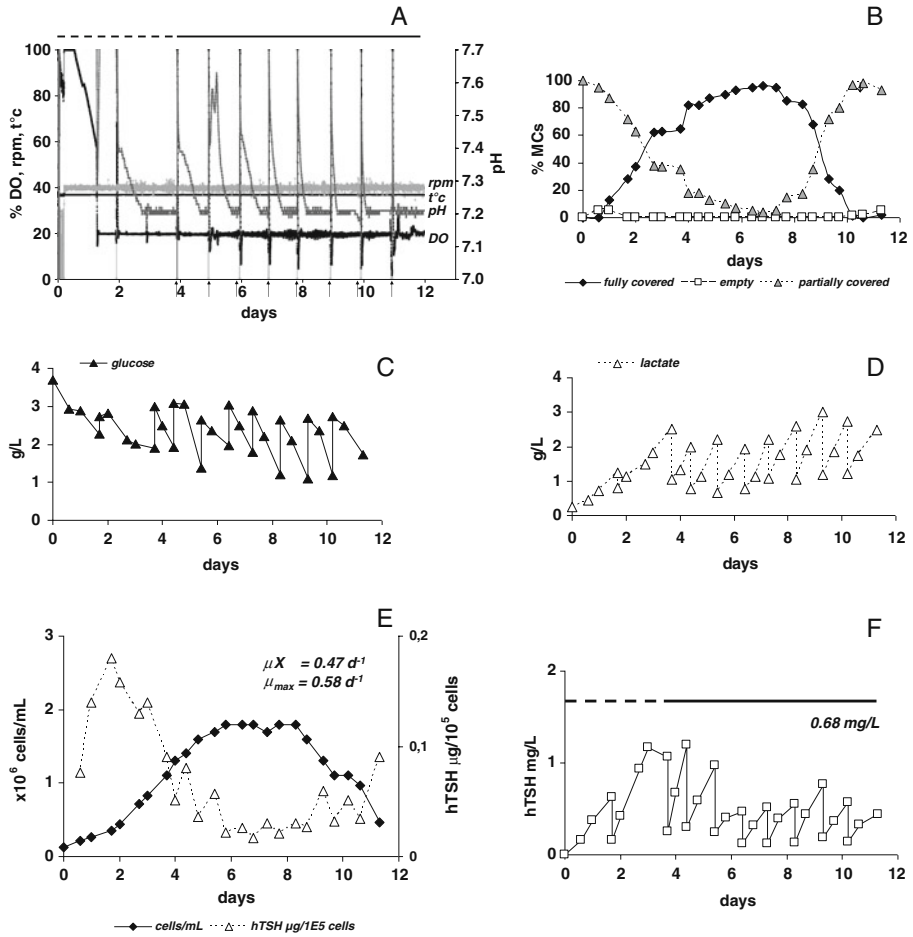


Fig. 2 CHO-hTSH cell culture: 2 g/L of MCs with rhTSH production phase at 1×10^6 cells/mL. **a** Monitoring and control of agitation (rpm), temperature (*t*, °C), pH, and dissolved oxygen (DO). **b** Kinetics of MC coverage (% MCs). **c** Kinetics of glucose consumption (g/L). **d** Kinetics of lactate production (g/L). **e** Kinetics of cell multiplication (cells/mL), specific cell growth (μX and μ_{max}), and specific rhTSH synthesis (μg/10^5 cells). **f** Kinetics of volumetric rhTSH production (g/L). *Arrows* indicate medium replacement. *Dashed line* indicates cell growth phase; *continuous line* indicates rhTSH production phase

The produced batches of rhTSH were purified and when tested via a precise, single-dose in vivo bioassay, based on thyroxine stimulation in mice, confirmed their bioactivity. Compared with Thyrogen, our purified rhTSH presented a relative potency of 1.03.

Discussion

rhTSH has been shown to have a broad application in diagnosis, treatment, and fundamental investigation of thyroid physiopathology [6–8]. Nevertheless, the relative complexity of its carbohydrate structure, which to the large extent determines its function, requires its synthesis and its purification in genetically modified mammalian cell cultures

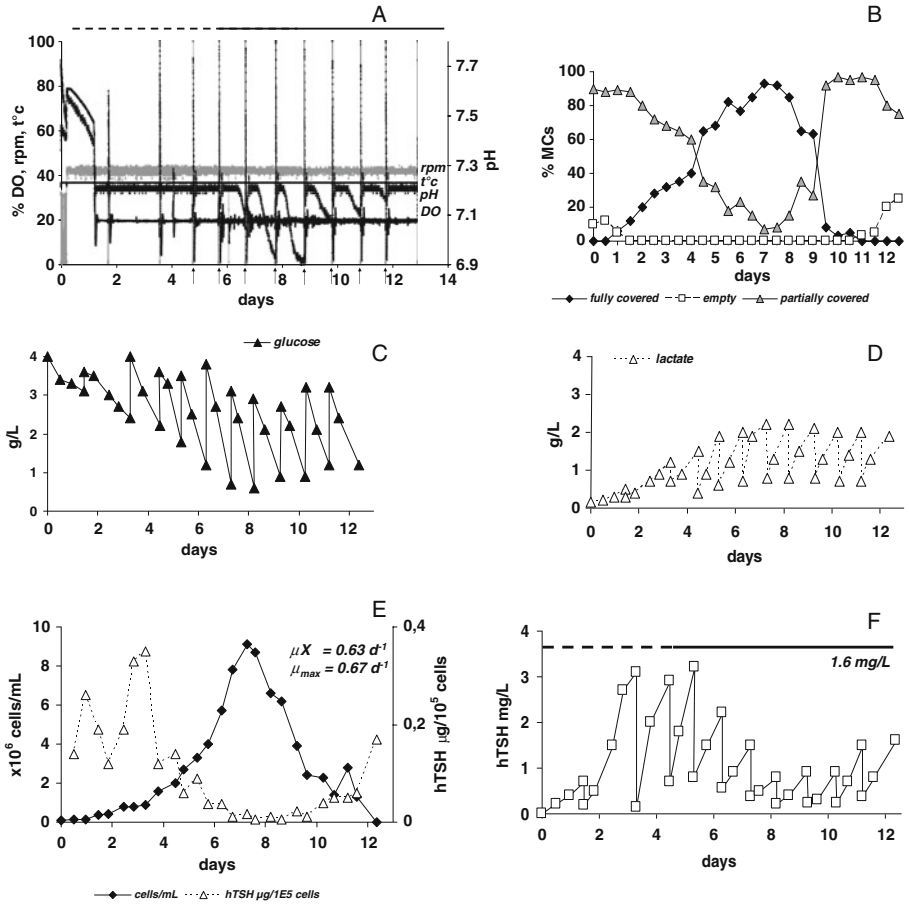


Fig. 3 CHO-hTSH cell culture: 4 g/L of MCs with rhTSH production phase at 3×10^6 cells/mL. **a** Monitoring and control of agitation (rpm), temperature (*t*, °C), pH, and dissolved oxygen (DO). **b** Kinetics of MC coverage (% MCs). **c** Kinetics of glucose consumption (g/L). **d** Kinetics of lactate production (g/L). **e** Kinetics of cell multiplication (cells/mL), specific cell growth (μX and μ_{max}), and specific rhTSH synthesis (μg/10^5 cells). **f** Kinetics of volumetric rhTSH production (g/L). *Arrows* indicate medium replacement. *Dashed line* indicates cell growth phase; *continuous line* indicate rhTSH production phase

[20, 21]. The CHO cells have been the cell substrate of choice for rhTSH preparation [4, 7, 9, 10]. CHO cell lines are capable of growing as adherent cells on a large variety of supports as well as free in suspension [11–14]. These characteristics of CHO cell lines (adherent × suspension) determine quite specific and particular bioprocesses, which show advantages and disadvantages. The election of a bioprocess to be used is usually defined by the aim of the study and specific productivity of the cell line.

In view of the limited literature disposable concerning upstream processes with CHO-hTSH cells [9], we developed in the present study optimized CHO-hTSH cell cultures on microcarriers in bioreactors in view of producing rhTSH batches for purification and functional studies. The process established, based essentially on higher MCs concentration, allowed us to easily harvest rhTSH containing supernatants, to establish a simple repeated fed batch process by partially changing cell culture medium, and to preserve the

synthesized rhTSH due to not only a removal of cell culture metabolites but also due to a physical separation between the cell content (attached to MCs) and rhTSH (in supernatants free to cell derived proteases).

Following preliminary studies determining basic conditions such as the cell culture temperature, agitation, pH, and dissolved oxygen (data not shown), the main rational for the present study was to establish the rhTSH synthesis phase based on kinetic conditions of cell growth and rhTSH synthesis. For that we assayed different MC concentrations (2 or 4 g/L) and different cell concentrations for initiating the rhTSH synthesis phase (from 0.3 to 3×10^6 cells/mL).

Data shown indicate that by using low MC concentration (2 g/L) and low cell concentration for the rhTSH synthesis phase (0.3×10^6 cells/mL) we had a relatively low specific cell growth ($\mu X=0.46$ day^{-1} and $\mu_{max}=0.49$ day^{-1}) leading to low cell concentration (10^6 cells/mL) and low MC loading (60% to 75% of MCs fully covered). Consequently, a short rhTSH synthesis phase (5 days) could be established with high specific rhTSH synthesis (0.097 μg/10^5 cells) but low volumetric rhTSH production (1 mg/L; Fig. 1). Cell cultures performed with the same MC concentration (2 g/L) but a higher cell concentration for the rhTSH synthesis phase (10^6 cells/mL), allowed a higher specific cell growth ($\mu X=0.47$ day^{-1} and $\mu_{max}=0.58$ day^{-1}), which led to slightly higher cell concentration (1.7×10^6 cells/mL) and a higher MC loading (>80% of MCs fully covered). A longer rhTSH synthesis phase (7.5 days) could be established. Nevertheless, a lower specific rhTSH synthesis (0.044 μg/10^5 cells) was observed which associated to the cell concentration attained led to a lower volumetric rhTSH production (0.68 mg/L; Fig. 2). The cell cultures performed with higher MC concentration (4 g/L) and higher cell concentration for the rhTSH synthesis phase (3×10^6 cells/mL), showed higher specific cell growth ($\mu X=0.63$ day^{-1} and $\mu_{max}=0.67$ day^{-1}) which led to higher cell concentration (9×10^6 cells/mL) and suitable MC loading (> 70% of MCs fully covered). The higher cell concentration attained associated to the steady specific rhTSH synthesis (0.048 μg/10^5 cells) during the same rhTSH synthesis phase (7.5 days), led to a higher volumetric rhTSH production (1.6 mg/L; Fig. 3).

Taken together, the results show crucial effects of MC surface availability as well as kinetics of cell multiplication on the microcarrier for production of rhTSH synthesized and secreted by CHO-hTSH cells. Since the specific rhTSH synthesis has always shown an inverse correlation with the cell growth, the main challenge for optimization of volumetric rhTSH production was to improve the cell density in culture and keep the specific rhTSH synthesis in suitable levels. As we have shown, this could be achieved by providing the cultures with higher MC concentration and starting the rhTSH synthesis phase with a high cell density.

By using the above described optimized production protocol, representing a novelty on upstream adherent cell culture conditions, several rhTSH crude batches were produced and successfully purified showing suitable bioactivity.

Acknowledgements This work was supported in part by grants from the FAPESP (05/60826-3; 02/09482-3), CNPq and Fundação Butantan. Carlos A Pereira is recipient of CNPq 1A research fellowship. Daniella C Ventini and Alvaro PB Souza had scholarships from FAPESP (07/52264-0, 06/57794-5).

References

1. Amoresano, A., Siciliano, R., Orru, S., Napoleoni, R., Altarocca, V., DeLuca, E., et al. (1996). *European Journal of Biochemistry, 242*, 608–618.
2. Carvalho, C. M., Oliveira, J. E., Almeida, B. E., Ueda, E. K. M., Torjesen, P. A., Bartolini, P., et al. (2009). *Journal of Chromatography A, 1216*, 1431–1438.
3. Robbins, R. J., Tuttle, R. M., Sharaf, R. N., Larson, S. M., Robbins, H. K., Ghossein, R. A., et al. (2001). *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86*, 619–625.
4. Peroni, C. N., Soares, C. R. J., Gimbo, E., Morganti, L., Ribela, M. T. C. P., & Bartolini, P. (2002). *Biotechnology and Applied Biochemistry, 35*, 19–26.
5. Kohlfuerst, S., Igerc, I., & Lind, P. (2005). *Thyroid, 15*, 371–376.
6. Luster, M. (2006). *Acta Oncológica, 45*, 1018–1030.
7. Szkudlinski, M. W., Fremont, V., Ronin, C., & Weintraub, B. D. (2002). *Physiological Reviews, 82*, 473–502.
8. Emerson, C. H., & Torres, M. S. T. (2003). *Biodrugs, 17*, 19–38.
9. Cole, E. S., Lee, K., Lauziere, K., Kelton, C., Chappel, S., Weintraub, B., et al. (1993). *Bio technology, 11*, 1014–1024.
10. Damiani, R., Oliveira, J. E., Vorauer-Uhl, K., Peroni, C. N., Vianna, E. G., Bartolini, P., et al. (2009). *Protein Expression and Purification, 67*, 7–14.
11. Chotigeat, W., Watanapokasin, Y., Mahler, S., & Gray, P. P. (1994). *Cytotechnology, 15*, 217–221.
12. Watson, E., Shah, B., Leiderman, L., Hsu, Y. R., Karkare, S., Lu, H. S., et al. (1994). *Biotechnology Progress, 10*, 39–44.
13. Mohan, C., Kim, Y., Koo, J., & Lee, G. M. (2008). *Biotechnology Journal, 3*, 624–630.
14. Nam, J. H., Ermonval, M., & Sharfstein, S. T. (2009). *Cytotechnology, 59*, 81–91.
15. Nam, J. H., Ermonval, M., & Sharfstein, S. T. (2007). *Biotechnology Progress, 23*, 652–660.
16. Ribela, M. T. C. P., Bianco, A. C., & Bartolini, P. (1996). *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 81*, 249–256.
17. Peroni, C. N., Ribela, M. T. C. P., & Bartolini, P. (1997). *Journal of Immunoassay, 18*, 247–265.
18. Oliveira, J. E., Damiani, R., Bartolini, P., & Ribela, M. T. C. P. (2007). *Journal of Chromatography A, 1164*, 206–211.
19. Oliveira, J. E., Damiani, R., Vorauer-Uhl, K., Bartolini, P., & Ribela, M. T. C. P. (2008). *Molecular Biotechnology, 39*, 159–166.
20. Goochee, C. F., Gramer, M. J., Andersen, D. C., Bahr, J. B., & Rasmussen, J. R. (1991). *Biotechnology, 9*, 1347–1355.
21. Jenkins, N., & Curling, E. M. A. (1994). *Enzyme and Microbial Technology, 16*, 354–364.