

## **V6 Desenvolvimento do processo “downstream” na produção de uma vacina tetravalente recombinante contra dengue**

Anna Paula Yorio<sup>1</sup>, Maria Carolina de Souza Martins<sup>1</sup>, André Tavares da Silva Fernandes<sup>1</sup>, Márcia Archer<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

**Introdução:** O desenvolvimento de uma vacina tetravalente que confira imunidade protetora de longa duração contra os quatro sorotipos do vírus da dengue é uma das prioridades da OMS. Atualmente, algumas vacinas contra dengue estão em teste, entre elas, a vacina quimérica de vírus vivo atenuado que utiliza, como vetor viral, o vírus vacinal da febre amarela. A produção do vírus quimérico ocorre em células de origem animal e as diretrizes para produção de vacina de vírus vivo atenuado exigem que a concentração de DNA residual celular seja menor que 10 ng/dose. Para alcançar tal objetivo, é necessário que a suspensão viral passe por processos de clarificação e purificação.

**Objetivo:** Estabelecer a metodologia de purificação viral para a vacina quimérica contra dengue, visando atender às diretrizes para produção de vacina de vírus vivo atenuado.

**Metodologia:** O processo de clarificação viral elimina as células em suspensão e os restos de células mortas. Este processo pode ser feito por filtração com membrana de 0,45 µm ou por centrifugação a 437 G por 10 minutos. Para diminuir a concentração de DNA celular residual, foram testados diferentes esquemas de purificação. Após a escolha do melhor esquema, testamos três concentrações e três tempos de incubação para o sulfato de protamina (0,5; 2,0 e 5,0 mg/ml por 30 min, 1h e 2h) e para Benzonase® (9; 15 e 25 un/ml por 6; 16 e 30h) para os quatro sorotipos do vírus quimérico dengue. A concentração de DNA residual e o título viral das amostras antes e depois do tratamento foram quantificados, este por ensaio de placa de lise e aquela por colorimetria.

**Resultados:** No teste dos diferentes esquemas de purificação, observamos que, no tratamento com sulfato de protamina, a etapa de centrifugação após o tratamento pode ser substituída pela filtração, sem perda de eficiência na diminuição na concentração de DNA residual. No esquema com a Benzonase®, observamos que o tempo de 3h apresentou melhor resultado que os tempos menores, sendo, ainda assim, menos eficiente do que o sulfato de protamina. Nos testes com diferentes concentrações e tempos de incubação em gelo, não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações e os tempos, por outro lado, o sulfato de protamina foi capaz de reduzir a níveis menores a concentração de DNA residual, independentemente

da concentração de DNA residual inicial, quando comparado à Benzonase®.

**Conclusão:** Diante destes resultados, podemos concluir que o sulfato de protamina e a Benzonase® são eficientes para reduzir a concentração de DNA residual em concentrações e nos tempos menores testados e que a etapa de centrifugação pode ser retirada do esquema de purificação com sulfato de protamina.

**Palavras-Chave:** Vacina Quimérica, Dengue, Purificação Viral