

# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis presentada para acceder al grado académico de  
Doctor en Ciencias Biológicas

**“Desarrollo de una plataforma tecnológica innovadora  
para producción de vacunas virales recombinantes.  
Su aplicación al virus de la rabia.”**

**Lic. Diego Sebastián Fontana**

Director: Dr. Claudio Prieto

Co-directora: Dra. Marina Etcheverrigaray

Laboratorio de Cultivos Celulares  
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas  
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

- 2015 -

Parte de los resultados de la presente tesis fueron publicados en:

- **“*Rabies virus-like particles expressed in HEK293 cells*”** Fontana, D; Kratje, R.; Etcheverrigaray, M. y Prieto, P. En: *Vaccine* 32 (2014) 2799-2804.
- **“*Target cells for antibodies detection in rabies vaccine control*”** Fontana, D; Prieto, C.; Kratje, R. y Etcheverrigaray, M. En: *Vaccine* 32 (2014) 2805–2807.
- **“*Immunogenic virus-like particles continuously expressed in mammalian cells as a veterinary rabies vaccine candidate*”** Fontana, D; Kratje, R.; Etcheverrigaray, M. y Prieto, C. En: *Vaccine* 33 (2015) 4238-4246.
- **“*Development of rabies virus-like particles for vaccine applications: production, characterization and protection studies*”**. Fontana, D; Kratje, R.; Etcheverrigaray, M. y Prieto, P. *Methods and Protocols: Volume 1: Vaccines for Human Diseases*. En: *Vaccine Design*. (Ed.: Sunil, Thomas). Springer, New York, USA. (aceptado).

**Parte de los resultados de la presente tesis fueron presentados en:**

- XXII European Society for Animal Cell Technology (ESACT) Meeting on Cell Based Technologies. Vienna, Austria. 15-18 May 2011. **“A strategy to obtain recombinant cell lines with high expression levels. Lentiviral vector-mediated transgenesis”**. Prieto, C.; Fontana, D.; Etcheverrigaray, M. y Kratje, R. Presentación formato poster.
- X Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires, 26-29 de Septiembre de 2011. **“Detección de anticuerpos anti glicoproteína G del virus de la rabia por microscopia de fluorescencia y citometría de flujo”**. Fontana, D.; Kratje, R.; Etcheverrigaray, M. y Prieto, C. Presentación formato poster.
- XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Potrero de los Funes, San Luis, Argentina. 30 de octubre al 2 de noviembre de 2011. **“Construction of a HIV-1 based lentiviral vector pseudotyped with the rabies virus glycoprotein”**. Fontana, D.; Prieto, C.; Kratje, R. y Etcheverrigaray, M. Presentación formato poster.
- VI Jornada de Jóvenes Emprendedores de la UNL. Esperanza, Santa Fe, Argentina. 10 de noviembre de 2011. **“Desarrollo de una tecnología celular para el control de vacunas antirrábicas”**. Fontana, D.; Prieto, C.; Kratje, R. y Etcheverrigaray, M. Presentación oral y poster.
- Vaccine Technology IV Conference. Albufeira, Portugal. 20-25 de mayo de 2012. **“Rabies virus-like particles expressed in HEK293 cells”**. Fontana, D.; Kratje, R.; Etcheverrigaray, M. y Prieto, C. Presentación oral y poster.
- Vaccine Technology IV Conference. Albufeira, Portugal. 20-25 de mayo de 2012. **“Target cells for antibodies detection in rabies vaccine control”**. Fontana, D.; Prieto, C.; Kratje, R. y Etcheverrigaray, M. Presentación en formato poster.
- V Seminario Latinoamericano de Tecnología de Cultivos de Células. Santa Fe, Argentina. 25-27 octubre de 2012. **“Desarrollo de una línea celular estable para la producción de rabies virus-like particles”**. Fontana, D.; Kratje, R.; Etcheverrigaray, M. y Prieto, C. Presentación en formato poster.

- Feria Aniversario “40 años FBCB. Vení a conocerla a la estación”. Santa Fe, Argentina. 1 de noviembre de 2012. **“Desarrollo de una línea celular estable para la producción de rabies virus-like particles”**. Fontana, D.; Kratje, R.; Etcheverrigaray, M. y Prieto, C. Presentación formato poster.
- Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Buenos Aires, Argentina. 6 y 7 de noviembre de 2013. **“Study and characterization of VLPs expressing rabies structural proteins in mammalian cells”**. Fontana, D.; Kratje, R.; Etcheverrigaray, M. y Prieto, C. Presentación formato poster.
- Vaccine Technology V Conference. Playa del Carmen, México. 8-12 de junio de 2014. **“Development of immunogenic virus-like particles as a rabies vaccine candidate”**. Fontana, D.; Palomares, L.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R.; y Prieto, C. Presentación en formato poster.
- Vaccine Technology V Conference. Playa del Carmen, México. 8-12 de junio de 2014. **“Characterization and neutralization studies of a monoclonal antibody against rabies virus glycoprotein”**. Fontana, D.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R. y Prieto, C. Presentación en formato poster.
- II International Conference on virus-like particles and nano-particles vaccines. Salk Institute for Biological Studies. La Jolla, San Diego, Estados Unidos. 4-6 de junio de 2014. **“Development, characterization and immunization studies of rabies VLPs”**. Prieto, C.; Fontana, D.; Kratje, R. y Etcheverrigaray, M. Presentación en formato poster.
- II International Conference on virus-like particles and nano-particles vaccines. Salk Institute for Biological Studies. La Jolla, San Diego, Estados Unidos. 4-6 de junio de 2014. **“Immunogenic rabies VLPs produced in serum free medium”**. Prieto, C.; Fontana, D.; Kratje, R. y Etcheverrigaray, M. Presentación en formato poster.
- Taller sobre vacunas: Vacunología 2014. La Plata, Argentina. 23-26 de septiembre de 2014. **“Desarrollo de virus-like particles como candidato vacunal para el virus de la rabia”**. Fontana, D.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R. y Prieto, C. Presentación en formato poster.

- VI Simposio Latinoamericano de Tecnología de Cultivo de Células. Valparaíso, Chile. 6-8 de noviembre de 2014. ***“Desarrollo de una vacuna recombinante biosegura para rabia: rabies virus-like particles”***. Fontana, D.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R. y Prieto, C. Presentación en formato poster.
- III Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos (SAProBio). Santa Fe, Argentina. 9 y 10 de diciembre de 2014. ***“Producción de virus-like particles en cultivos libres de suero. Desarrollo de un candidato vacunal bioseguro para la rabia”***. Fontana, D.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R. y Prieto, C. Presentación en formato poster
- 24th Meeting of the European Society of Animal Cell Technology (ESACT). Barcelona, Cataluña, España. 31 de mayo al 3 junio de 2015. ***“Production of virus-like particles in high density cell cultures and serum free media. A promising rabies vaccine candidate”***. Fontana, D.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R. y Prieto, C. Presentación oral y poster.
- II Congreso Latinoamericano de Virología - XI Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires, Argentina. 23-26 de junio de 2015. ***“Virus-like particles del virus de la rabia inducen la producción de anticuerpos neutralizantes y generan protección en animales de experimentación”***. Fontana, D.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R. y Prieto, C. Presentación en formato poster.

**Parte de los resultados de la presente tesis fueron reconocidos con los siguientes premios y/o distinciones:**

- *Best Student Poster Award* en Vaccine Technology Conference V. An Engineering Conferences International Conference. Playa del Carmen, México. 12 de junio de 2014. **“Development of immunogenic virus-like particles as a rabies vaccine candidate”**. Este trabajo fue presentado por el Lic. Diego Fontana, siendo además co-autores los Dres. Claudio Prieto, Laura Palomares, Ricardo Kratje y Marina Etcheverrigaray.
- Premio en X edición del Concurso Nacional de Innovaciones – INNOVAR. Categoría Investigación Aplicada. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación. 10 al 13 de noviembre de 2014, Buenos Aires, Argentina. **“Vacunas innovadoras y bioseguras”**. Este trabajo fue presentado por el Lic. Diego Fontana y los Dres. Claudio Prieto, Ricardo Kratje y Marina Etcheverrigaray.
- *3rd Poster Award* en 24th Meeting of the European Society of Animal Cell Technology (ESACT). Barcelona, España. 31 de mayo al 3 de Junio de 2015. **“Production of virus-like particles in high density cultures and serum free media. A promising rabies vaccine candidate”**. Este trabajo fue presentado por el Lic. Diego Fontana y los Dres. Marina Etcheverrigaray, Ricardo Kratje y Claudio Prieto.
- Mejor trabajo en el II Congreso Latinoamericano de Virología – XI Congreso Argentino de Virología. 23 al 26 de junio de 2015. **“Virus-like particles del virus de la rabia inducen la producción de anticuerpos neutralizantes y generan protección en animales de experimentación”**. Este trabajo fue presentado por el Lic. Diego Fontana y los Dres. Marina Etcheverrigaray, Ricardo Kratje y Claudio Prieto.

<b>ÍNDICE</b> .....	1
<b>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS</b> .....	7
<b>RESUMEN</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	15
<b>1. VACUNAS</b> .....	17
1.1. Las vacunas y su impacto en la sociedad.....	17
1.2. Mercado y desarrollo de nuevas vacunas.....	19
1.3. Vacunas y respuesta inmune.....	21
1.4. Clasificación de las vacunas.....	23
1.5. Vacunas veterinarias.....	27
<b>2. VIRUS-LIKE PARTICLES</b> .....	30
2.1. Clasificación.....	30
2.2. Respuesta inmune.....	32
2.3. VLPs quiméricas.....	34
2.4. Caracterización de VLPs.....	35
2.5. Sistemas de expresión utilizados para la producción de VLPs....	38
2.5.1. Bacterias.....	39
2.5.2. Levaduras.....	39
2.5.3. Sistema baculovirus/células de insecto.....	40
2.5.4. Plantas.....	40
2.5.5. Sistemas libres de células.....	40
2.5.6. Células de mamífero.....	41
<b>3. TECNOLOGÍA DE CULTIVO DE CÉLULAS DE MAMIFERO</b> .....	43
3.1. Líneas celulares de mamífero como plataforma para la producción de bioterapéuticos.....	43
3.2. Líneas celulares de mamífero establecidas utilizadas para la producción de VLPs y vacunas virales.....	46
3.3. Transferencia de material genético y desarrollo de líneas celulares de mamífero.....	47
3.3.1. Transfección transiente.....	48
3.3.2. Intercambio de casete mediado por recombinasas.....	48
3.3.3. Delivery viral.....	49
3.4. Vectores lentivirales (LVs).....	50

3.5.	Producción de vacunas virales en células animales cultivadas en biorreactor.....	53
<b>4.</b>	<b>RABIA.....</b>	<b>56</b>
4.1.	Agente etiológico.....	57
4.2.	Epidemiología.....	58
4.3.	Situación de la rabia en la Argentina.....	59
4.3.1.	Evolución histórica.....	59
4.3.2.	Rabia humana.....	60
4.4.	Prevención y tratamiento.....	61
4.5.	Vacuna antirrábica.....	63
4.5.1.	Vacuna producida en tejido nervioso.....	63
4.5.2.	Vacunas producidas en cultivo celular.....	64
4.6.	Desarrollo de nuevos candidatos vacunales para rabia.....	65
4.6.1.	Vacunas atenuadas.....	65
4.6.2.	Vacunas a subunidades proteicas.....	66
4.6.3.	Vacunas a ADN.....	66
4.6.4.	Vacunas utilizando vectores virales.....	66
4.6.5.	Vacunas producidas en plantas.....	67
<b>5.</b>	<b>VIRUS DE LA RABIA.....</b>	<b>69</b>
5.1.	Glicoproteína G.....	71
5.2.	Ciclo de replicación del virus de la rabia.....	72
	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>75</b>
	HIPOTESIS.....	76
	OBJETIVO GENERAL.....	76
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	77
	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>79</b>
<b>1.</b>	<b>DESARROLLO DE LÍNEAS CELULARES RECOMBINANTES PRODUCTORAS DE RV-VLPs PARA EL VIRUS DE LA RABIA (RV-VLPs).....</b>	<b>81</b>
1.1.	Construcción de vectores de expresión para células eucariotas..	81
1.1.1.	Construcción de los vectores de transferencia pLV-CMV-GlycoG y pLV-CMV-M.....	81
1.1.2.	Producción de los vectores lentivirales LV-G y LV-M.....	81
1.1.3.	Titulación de los vectores lentivirales.....	82



1.2.	Desarrollo de líneas celulares recombinantes.....	83
1.2.1.	Construcción y análisis de la línea celular recombinante HEK293.....	84
1.2.2.	Construcción y análisis la línea celular recombinante VERO.....	87
1.2.3.	Construcción y análisis la línea celular recombinante BHK-21.....	80
1.3.	Análisis comparativo de los resultados obtenidos para cada una de las líneas recombinantes.....	93
<b>2.</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DE LAS RV-VLPs.....</b>	<b>97</b>
2.1.	Caracterización fisicoquímica y morfológica de las RV-VLPs.....	97
2.1.1.	Purificación de RV-VLPs por ultracentrifugación en gradiente. Análisis de la densidad de partícula.....	97
2.1.2.	Análisis del diámetro de partícula por DLS.....	99
2.1.3.	Análisis morfológico de las RV-VLPs.....	100
2.2.	Comparación entre las RV-VLPs producidas por las líneas LHEK-G y LHEK-G/M: ¿existen diferencias?.....	101
2.3.	MET asociada a inmunomarcación con oro de RV-VLPs.....	102
2.4.	Análisis de la inmunogenicidad de las RV-VLPs.....	103
2.4.1.	ELISA específico indirecto.....	104
2.4.2.	Citometría de flujo.....	105
2.4.3.	Ensayo de neutralización.....	106
2.5.	Ensayos de protección: NIH <i>potency test</i> .....	107
2.6.	Conclusiones parciales.....	108
<b>3.</b>	<b>OBTENCIÓN DE UN CLON PRODUCTOR DE RV-VLPs.....</b>	<b>111</b>
3.1.	Clonado de la línea celular LHEK-G y selección de un clon productor.....	111
3.2.	Caracterización del clon productor adhP2E5.....	112
3.2.1.	Estabilidad.....	112
3.2.2.	Productividad.....	113
3.2.3.	Análisis de la producción de lentivirus con capacidad de replicación.....	114
3.2.4.	Análisis del número de copias del transgen.....	115
3.2.5.	Construcción de bancos celulares.....	115
3.3.	Adaptación a suspensión del clon productor adhP2E5.....	116
3.3.1.	Caracterización del clon sP2E5.....	118
3.3.2.	Caracterización de las RV-VLPs producidas en medio libre de suero (SFM).....	120

3.4.	Análisis de la inmunogenicidad de las RV-VLPs producidas en SFM.....	123
3.4.1.	Ensayos de protección: NIH <i>potency test</i> .....	123
3.4.2.	Anticuerpos neutralizantes.....	124
3.5.	Conclusiones parciales.....	126
<b>4.</b>	<b>CAMBIO DE ESCALA DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE RV-VLPs</b> .....	<b>128</b>
4.1.	Producción de RV-VLPs en biorreactor de 1 L operado en modo continuo.....	128
4.2.	Producción de RV-VLPs en biorreactor de 5 L operado en modo continuo.....	131
4.3.	Potencia de vacuna antirrábica de las RV-VLPs producidas en biorreactor.....	134
4.4.	Conclusiones parciales.....	134
	<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b> .....	<b>137</b>
	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>144</b>
<b>1.</b>	<b>TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR</b> .....	<b>145</b>
1.1.	Líneas celulares procariotas.....	145
1.2.	Medios de cultivo para células procariotas.....	145
1.3.	Purificación de ADN plasmídico.....	145
1.3.1.	Minipreparación de ADN plasmídico.....	145
1.3.2.	Maxipreparación de ADN plasmídico.....	146
1.4.	Determinación de la concentración y pureza del ADN.....	148
1.5.	Digestiones enzimáticas.....	148
1.6.	Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	149
1.7.	Precipitación de ADN.....	149
1.8.	Purificación de ADN a partir de geles de agarosa.....	150
1.9.	Reacciones de ligación de ADN.....	150
1.10.	Preparación de células <i>Escherichia coli</i> TOP 10 competentes, por el método químico.....	151
1.11.	Transformación de células competentes.....	152
1.12.	Reacciones de PCR.....	152
1.13.	Reacciones de RT-PCR.....	153
1.13.1.	Extracción de ARN total.....	153

1.13.2.	Reacción de retrotranscripción (RT).....	154
1.13.3.	Reacción de PCR a partir del ADNc.....	155
1.14.	Criopreservación de cepas bacterianas.....	155
1.15.	Revitalización de cepas bacterianas.....	156
<b>2.</b>	<b>TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR.....</b>	<b>157</b>
2.1.	Líneas celulares.....	157
2.1.1.	HEK293T/17 (ATCC, CRL-11268).....	157
2.1.2.	VERO (ATCC, CCL-81).....	157
2.1.3.	BHK-21 (ATCC, CCL-10).....	157
2.2.	Medios de cultivo y suplementos para células animales.....	157
2.3.	Sistemas de cultivos de células.....	158
2.3.1.	Cultivos en adherencia.....	158
2.3.2.	Cultivos en suspensión en pequeña escala.....	159
2.3.3.	Cultivos en biorreactor.....	159
2.4.	Determinaciones analíticas en cultivos celulares.....	160
2.4.1.	Determinación de la concentración y viabilidad de células.....	160
2.4.2.	Monitoreo del consumo de glucosa y de la producción de lactato y amonio en sobrenadantes de cultivo.....	161
2.4.3.	Estimación de parámetros cinéticos de cultivo. Determinación de la integral de células viables (ICV), velocidad específica de crecimiento celular y de las velocidades específicas de consumo y producción de metabolitos.....	164
2.5.	Criopreservación de líneas celulares de mamífero.....	165
2.6.	Revitalización de líneas celulares de mamífero.....	166
2.7.	Desarrollo de líneas celulares recombinantes.....	166
2.7.1.	Ensamblado de vectores LVs.....	166
2.7.2.	Determinación del título de LVs.....	167
2.7.3.	Transducción de células de mamífero con LVs.....	170
2.7.4.	Selección de células recombinantes.....	171
2.8.	Obtención de clones celulares.....	171
2.9.	Adaptación de células a su crecimiento en suspensión con SFM.....	172
<b>3.</b>	<b>METODOLOGÍAS PARA EL ANÁLISIS DE LÍNEAS Y CLONES CELULARES.....</b>	<b>174</b>
3.1.	Citometría de flujo.....	174

3.2.	Microscopía de fluorescencia.....	174
3.3.	Análisis de bancos celulares.....	175
3.3.1.	Contaminación con bacterias.....	175
3.3.2.	Contaminación con hongos.....	175
3.3.3.	Detección de micoplasmas en cultivos celulares.....	176
3.3.4.	Análisis de la presencia de la presencia de lentivirus con capacidad de replicación(RCL).....	176
3.3.5.	Análisis del número de copias del transgen en el genoma.....	179
<b>4.</b>	<b>METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE RV-VLPs.....</b>	<b>181</b>
4.1.	Purificación de RV-VLPs por ultracentrifugación.....	181
4.1.1.	Recuperación.....	181
4.1.2.	Purificación.....	182
4.2.	Purificación de RV-VLPs por cromatografía de exclusión molecular.....	182
4.3.	<i>Dynamic light scattering</i> (DLS) .....	183
4.4.	Microscopía electrónica de transmisión (MET).....	183
4.5.	Inmunomarcación con partículas de oro en MET.....	184
4.6.	SDS-PAGE - <i>western blot</i> .....	184
4.7.	ELISA sándwich.....	186
<b>5.</b>	<b>DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES INMUNOGÉNICAS DE LAS RV-VLPs.....</b>	<b>187</b>
5.1.	Inmunización de animales de experimentación con RV-VLPs. Comparación con vacunas antirrábicas comerciales.....	187
5.1.1.	ELISA específico indirecto.....	187
5.1.2.	Citometría de flujo sobre células VERO-G.....	188
5.2.	Ensayo de potencia de vacuna antirrábica (NIH <i>potency test</i> ).....	189
5.3.	Detección de anticuerpos neutralizantes.....	191
<b>ANEXO I.....</b>	<b>193</b>	
<b>ANEXO II.....</b>	<b>207</b>	
<b>ANEXO III.....</b>	<b>213</b>	
<b>ANEXO IV.....</b>	<b>221</b>	
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>228</b>	

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ACP:	célula presentadora de antígeno
ADCC:	citotoxicidad celular mediada por anticuerpos
ADCF:	libre de componentes de origen animal
ARNsc:	ARN simple cadena
BCR:	receptor de linfocito B
BHK:	células de ovario de hamster bebé
BSA:	albúmina sérica bovina
CDC:	Centros de Control y Prevención de Enfermedades (USA)
CDE:	efecto de la densidad de células
CDs:	células dendríticas
Cél.:	células
CMV:	promotor del citomegalovirus
cPPT:	región central de polipurinas
CRL:	cerebro de ratón lactante
CHO:	células de ovario de hámster chino
DAPI:	4',6-diamino-2-fenilindol
DIVA:	<i>differentiating infected from vaccinated animals</i>
DLS:	dispersión dinámica de luz
FDA:	Administración de alimentos y drogas (USA)
G:	glicoproteína G del virus de la rabia
Gag:	proteína de la cápside lentiviral
GFP:	proteína verde fluorescente
GOI:	gen de interés
HEK:	células embrionarias de riñón humano
HIV-1:	virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
HPV:	virus del papiloma humano
I&D:	investigación y desarrollo
LB:	linfocito B
LT:	linfocito T
LTC:	linfocito T citotóxico
LTh:	linfocito T colaboradore
LTR:	regiones terminales repetitivas largas
LV:	vector lentiviral

M:	proteína de matriz del virus de la rabia
MCB:	banco de células maestro
MDI:	multiplicidad de infección
MET:	microscopía electrónica de transmisión
MHC:	complejo mayor de histocompatibilidad
NK:	célula <i>natural killer</i>
OMS:	Organización Mundial de la Salud
ON:	incubación de 16 a 18 horas
PAMPs:	patrones moleculares asociados a patógeno
pb:	pares de bases
PM:	cepa Pitman Moore del virus de la rabia
pO <sub>2</sub> :	presión de oxígeno disuelto
Pol:	proteína polimerasa lentiviral
PV:	cepa Pasteur del virus de la rabia
qPCR:	reacción de PCR cuantitativa
RCL:	lentivirus con capacidad de replicación
Rev:	proteína lentiviral Rev
RMCE:	recombinación mediada por recombinasas
RNP:	ribonucleoproteína
rpm:	revoluciones por minuto
RRE:	elemento de respuesta a Rev
RV-VLPs:	partículas similares a virus para rabia
SEC:	cromatografía de exclusión molecular
SENASA:	Servicio Nacional de Sanidad Animal y Calidad Agroalimentaria
SFB:	suero fetal bovino
SFM:	medio de cultivo libre de suero
SIN:	vector auto-inactivante
SNC:	sistema nervioso central
SUVs:	vacunas a subunidades
TA:	temperatura ambiente
TGE:	expresión transiente de genes
TLRs:	receptores de tipo <i>toll</i>
VERO:	células de mono verde africano
VLPs:	partículas similares a virus

VSV:	virus de la estomatitis vesicular
VSV-G:	Glicoproteína del VSV
WCB:	banco de células de trabajo
WPRE:	element regulatorio post-trancricional del virus de la hepatitis de de woodchuck

---

**RESUMEN**

La rabia es una zoonosis viral aguda, con una mortalidad cercana al 100% y cuyo único tratamiento disponible en la actualidad es la vacunación. El modo más común de contagio al ser humano es el contacto con saliva de animales infectados, principalmente perros. Por esta razón, la vacunación de animales de compañía es obligatoria en la Argentina, buscando de esta forma controlar la circulación viral y disminuir el riesgo de contagio.

Las vacunas antirrábicas hoy disponibles en el mercado, tanto humanas como veterinarias, son basadas en virus inactivado producido en cultivos celulares. Aunque eficaces, estas vacunas poseen efectos adversos importantes y, además, para su producción es necesaria la manipulación del virus de la rabia activo, haciendo que en el proceso se necesiten instalaciones con elevada contención viral. Debido a esto, surge la necesidad de diseñar una vacuna antirrábica de nueva generación, que sea eficaz y totalmente biosegura.

Las *virus-like particles* (VLPs) son excelentes candidatos vacunales ya que son capaces de generar una potente y equilibrada respuesta inmune y, al ser partículas que no contienen genoma viral, son bioseguras. Nuestra hipótesis consistió, entonces, en desarrollar VLPs para rabia (RV-VLPs) expresando en células de mamífero proteínas estructurales del virus. Por un lado, se evaluó la expresión de la glicoproteína G y, por otro, la co-expresión de la glicoproteína G y la proteína de matriz o M.

En una primera etapa de trabajo, se evaluó la expresión de RV-VLPs en tres líneas celulares distintas: HEK293, BHK-21 y VERO. La expresión de la glicoproteína G fue confirmada por citometría de flujo, microscopía de fluorescencia y ELISA, mientras que la expresión de la proteína M fue estudiada por RT-PCR. De los resultados obtenidos, se seleccionaron las líneas recombinantes HEK293 para continuar el trabajo.

Posteriormente, se llevó a cabo la caracterización de las RV-VLPs obtenidas. Se observaron partículas circulares, con envoltura y con un diámetro hidrodinámico promedio de  $60 \pm 20$  nm. A su vez, realizando ensayos de microscopía electrónica asociada a inmunomarcación con oro coloidal, se confirmó que la glicoproteína G estaba anclada en la membrana y expuesta



sobre la superficie de las VLPs. De todas las características estudiadas, no se encontraron diferencias morfológicas entre las RV-VLPs producidas por las líneas celulares recombinantes que expresan solo la glicoproteína G y por las que expresan ambas proteínas. Por otro lado, tampoco se logró obtener una mayor productividad de RV-VLPs cuando la proteína M fue co-expresada. A partir de estos resultados, entonces, se decidió continuar el trabajo con la línea celular HEK293 que expresa solo la glicoproteína G.

Más adelante, y con el objetivo de evaluar la inmunogenicidad de las RV-VLPs producidas, se llevó a cabo un protocolo de inmunización en ratones. De estos experimentos se pudo concluir que las RV-VLPs son capaces de inducir la producción de anticuerpos específicos, y que los títulos obtenidos fueron comparables a los inducidos por vacunas comerciales, tanto veterinaria como de uso humano. Además, se confirmó que los anticuerpos producidos poseen capacidad neutralizante, característica fundamental para una vacuna antirrábica. Por otro lado, para confirmar si la respuesta inmune inducida es capaz de proteger a individuos vacunados, se llevó a cabo el test de potencia del NIH para vacuna antirrábica. De los resultados de este ensayo se pudo concluir que las RV-VLPs son protectivas y que la potencia de vacuna antirrábica obtenida fue superior al mínimo requerido para una vacuna veterinaria.

A partir de esos resultados, se seleccionó un clon celular productor, para ser utilizado en la producción de la vacuna. Fue seleccionado el clon adhP2E5, el cual fue analizado confirmando su productividad y su estabilidad de expresión en el tiempo. Posteriormente, dicho clon fue adaptado para su crecimiento en suspensión en medio libre de suero, obteniendo así un cultivo que es capaz de llegar a altas densidades celulares sin la formación de agregados. El mismo fue renombrado como sP2E5. Se estudiaron las características de las RV-VLPs producidas por el mismo, demostrando que sus propiedades no se vieron modificadas por el cambio en las condiciones de cultivo.

Finalmente, el clon sP2E5 fue cultivado en reactores de 1 y 5 L, operados en modo continuo. Los resultados de dichas fermentaciones brindaron información acerca de la escalabilidad del proceso, confirmando que las RV-VLPs son producidas durante todas las etapas de cultivo, el cual puede

mantenerse por tiempos prolongados, demostrando de esta forma la elevada productividad del proceso.

En conclusión, todos los resultados obtenidos durante este trabajo de tesis confirmaron que el proceso desarrollado constituye una plataforma de producción de una vacuna antirrábica de última generación, totalmente biosegura.

---

**ABSTRACT**

Rabies is an acute viral zoonosis that presents a mortality rate of nearly 100%, and the only available treatment is vaccination. The most common source of contagion is the contact with infected animals' saliva, dogs in most cases. Therefore, in Argentina vaccination of pets is compulsory as it aims at controlling viral circulation and reducing the risk of contagion.

The antirabic vaccines available in the market, both human and veterinary, are based on inactivated virus produced in cell culture. Although effective, these vaccines produce some adverse effects. Moreover, their production involve the manipulation of active rabies virus, which requires facilities with a high level of viral retention. Consequently, there is a real need to develop a new generation, effective and biosecure rabies vaccine.

Virus-like particles (VLPs) are an excellent vaccine candidate as they trigger a potent and balanced immune response. Besides, they lack the viral genome and are completely biosecure. In this context, our hypothesis entailed developing rabies VLPs (RV-VLPs) expressing in mammalian cells the structural viral proteins. On the one hand, we evaluated the expression of the glycoprotein alone and, on the other hand, we evaluated the co-expression of the glycoprotein with the rabies matrix protein, or M.

First, we analyzed the expression of RV-VLPs in three different cell lines: HEK293, BHK-21 and VERO. The glycoprotein expression was confirmed by flow cytometry, fluorescence microscopy and ELISA assays, whereas the M protein expression was analyzed by RT-PCR. From the results obtained, HEK293 cell lines were selected to continue with the work.

After that, characterization of RV-VLPs was performed. Circular and enveloped particles were seen, with a hydrodynamic diameter of  $60 \pm 20$  nm in average. Moreover, the presence of the glycoprotein anchored in the membrane and exposed to the surface of the RV-VLPs was confirmed by gold-labeled electron microscopy. No differences were found between RV-VLPs produced by the cell line that expresses only the glycoprotein, and the cell line that expresses the glycoprotein together with the M protein. Taking this into account, we decided to keep working with HEK293 cell line that expresses only the rabies glycoprotein.

Later, the immunogenic properties of the produced RV-VLPs were analyzed. From these experiments we confirmed that RV-VLPs induce a specific antibody immune response, comparable with the one induced by commercial vaccines. Furthermore, we confirmed that RV-VLPs are able to induce neutralizing antibodies, a key feature for a rabies vaccine candidate. On the other hand, protection was analyzed performing the NIH potency test for rabies vaccines. Results showed that RV-VLPs induce an immune response that protects vaccinated animals against a viral infection and that the potency obtained was higher than the minimum required for a veterinary rabies vaccine.

After that, several clones were analyzed regarding VLPs production. adhP2E5 was chosen, confirming its productivity and stability of expression. Later, the clone was adapted to a serum free medium, to be cultured in suspension. The adapted clone, re-named sP2E5, is able to grow without clumping or aggregates formation, reaching high cell densities. The characteristics of the RV-VLPs produced in these culture conditions were studied and no changes were found compared with the VLPs produced in adherent conditions.

Finally, sP2E5 was cultured in 1 and 5 L bioreactors, in continuous mode with perfusion. Results showed the process scalability and confirmed that RV-VLPs are produced in all the process steps, which can be maintained for long periods, showing the high process productivity.

In conclusion, the results obtained in this thesis confirm that the developed process represents a platform for the production of a new generation biosecure rabies vaccine.

# **INTRODUCCIÓN**

# VACUNAS

## 1. VACUNAS

### 1.1. Las vacunas y su impacto en la sociedad

Durante el último siglo, la vacunación ha sido la intervención más importante que ha realizado la medicina moderna, salvando entre 2 y 3 millones de vidas al año (Delany y col., 2014). Gracias a la vacunación se ha logrado erradicar la viruela y reducir más de un 99% los casos de polio desde 1988 (Miller, 2014). Se ha comprobado que la vacunación de un alto porcentaje de una población genera la protección total de la misma, debido al “efecto rebaño” que logra disminuir la circulación del agente patógeno en una población inmunizada (André, 2003; PhRMA, 2013).

El desarrollo de vacunas ha pasado por distintas etapas, comenzando a finales de 1700s cuando Edward Jenner inmunizó a un niño con muestras de pústulas de una granjera infectada con el virus de la viruela bovina. Pasteur, Koch, Ramon y Mérieux siguieron sus pasos y desarrollaron vacunas utilizando patógenos atenuados, inactivados (muertos) y toxinas inactivadas (toxoides). Luego, con el advenimiento de la tecnología de cultivos celulares a mediados de 1950s, grandes progresos fueron llevados a cabo para el desarrollo de vacunas contra la polio, hepatitis A, rubeola, sarampión, rotavirus y varicela. En las últimas décadas del siglo veinte, y gracias al desarrollo de las técnicas de biología molecular e ingeniería genética, comenzó el desarrollo de vacunas recombinantes logrando obtener una vacuna para la hepatitis B compuesta solo por uno de los antígenos del virus. En las últimas décadas, grandes avances obtenidos en genómica y bioinformática han sido aplicados al desarrollo de vacunas, pudiéndose llevar a cabo el estudio y diseño racional de antígenos en lo que hoy se denomina “vacunología reversa” (Fig. 1).

A pesar del indudable éxito que ha tenido la aplicación masiva de vacunas a lo largo de la historia, algunos matices en cuanto a su producción y aplicación universal se han presentado. Por un lado, nuevos movimientos sociales “anti-vacunas” han aparecido, los cuales cuestionan la necesidad de la aplicación de vacunas en la protección contra patógenos a los cuales denominan “invisibles”, ya que el patógeno ya no circula entre la población, o lo hace en niveles indetectables (en gran parte gracias al efecto de la vacunación). Estos grupos no solo ponen en tela de juicio la efectividad de vacunas existentes, sino que también atribuyen a las mismas efectos adversos

no comprobables científicamente. Por otro lado, un aspecto realmente significativo a la hora de promover inversiones en el desarrollo de nuevas vacunas son las ganancias obtenidas ya que, aunque millonarias, no son tan elevadas en comparación con otros productos biofarmacéuticos como son las hormonas y los anticuerpos monoclonales. Esto se intensifica teniendo en cuenta que uno de los puntos clave a la hora de lograr la aplicación universal de una vacuna, sobre todo en países en vías de desarrollo, es la necesidad del bajo costo por dosis. Esta tendencia se deja ver claramente cuando se analiza que los productores mundiales de vacunas han disminuido a menos de la mitad en los últimos treinta años (Balinska, 2003; André, 2003).

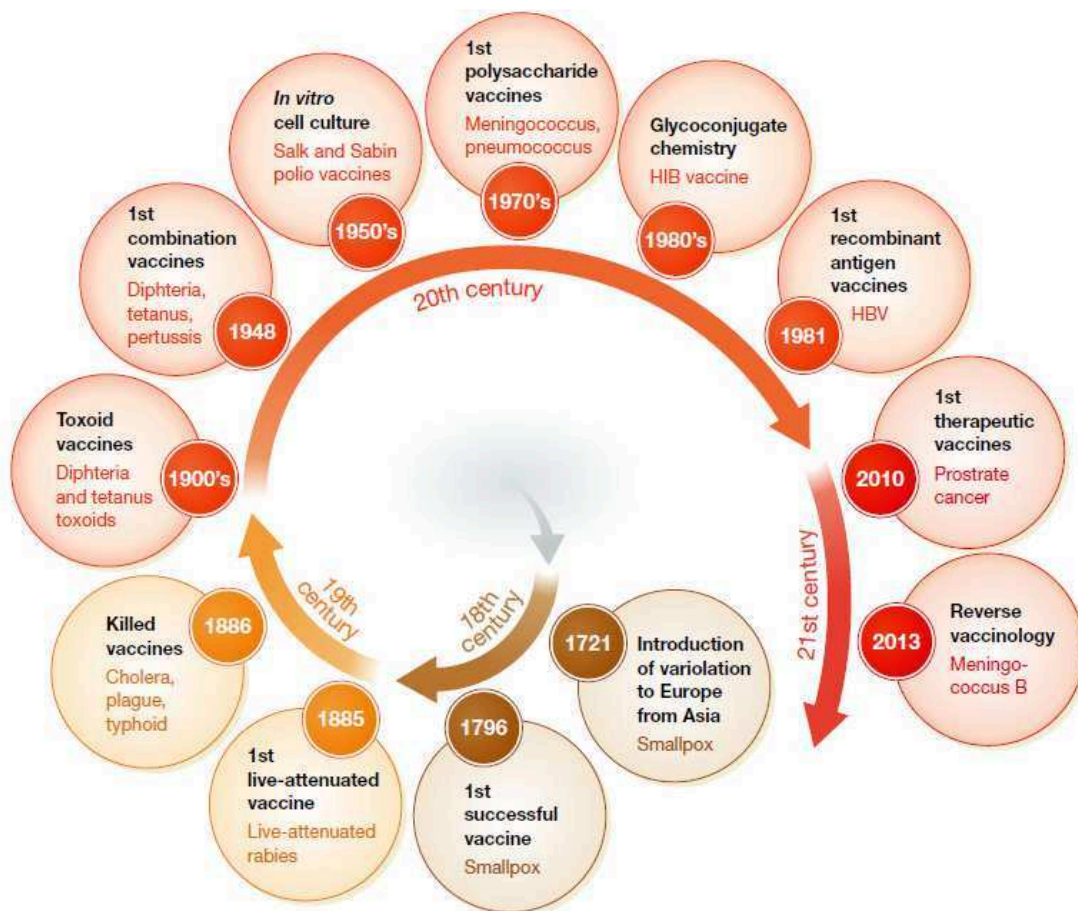


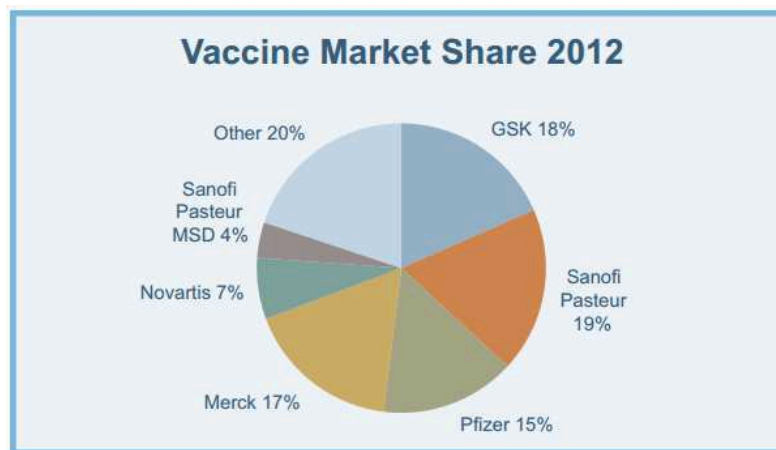
Figura 1. Evolución en el desarrollo de vacunas a lo largo de la historia de la humanidad (adaptado de Delany y col., 2014).

Este último punto remarca el importante rol que poseen los estados a la hora de informar a la población y de realizar fuertes inversiones, tanto en la investigación y desarrollo de nuevos candidatos vacunales, como en planes de inmunización para lograr que las vacunas lleguen a todos sus habitantes.



## 1.2. Mercado y desarrollo de nuevas vacunas

El mercado global de las vacunas representa solo el 3% del total de la industria biofarmacéutica, con un total de 27.300 millones de dólares anuales durante 2012 (PhRMA, 2013). Como ya se mencionó, cada vez menos productores dominan el mercado, con el 80% repartido entre seis empresas (Fig. 2). De estas seis, solo dos son capaces de producir y abastecer las vacunas más importantes para ser aplicadas mundialmente (rotavirus, pertusis, pneumococco, rubeola, sarampión y paperas) (Garguilo, 2015).



**Figura 2. Principales empresas que dominan el mercado mundial de producción de vacunas** (adaptado de PhRMA, 2013).

Una de las causas de esta concentración del mercado es, aunque parezca contradictorio, los bajos precios por dosis que poseen muchas vacunas (0,12 centavos de dolar por dosis para polio, por ejemplo). Gracias a muchas iniciativas llevadas adelante durante años como, por ejemplo, la conformación de alianzas publico-privadas como *GAVI Vaccine Alliance* y del aporte continuo de fundaciones filantrópicas como la *Bill & Melinda Gates Foundation*, se ha logrado la reducción de los costos de las vacunas para que sean accesibles en los países en desarrollo. En contraposición, muchas compañías productoras están comenzando a decir que los elevados costos de reinversión necesarios para mantener la producción, y sobre todo para cumplir los requerimientos regulatorios cada vez más estrictos, como así para mantener sus departamentos de I&D (Investigación y Desarrollo) no pueden afrontarse con los precios que poseen actualmente muchas vacunas de aplicación global. Por esta y otras razones, el mercado de producción de vacunas no solo se ha concentrado sino que ya se han detectado faltantes en

el suministro de vacunas a nivel mundial. De las 9 vacunas que UNICEF recomienda de aplicación masiva, sobre todo en países de bajos ingresos, en 7 de ellas se han registrado faltantes (Garguilo, 2015).

El proceso de desarrollo de una nueva vacuna es complejo y riesgoso. Debido a que, a diferencia de otros productos biológicos, las vacunas son administradas a millones de individuos sanos alrededor del mundo, la industria de las vacunas está altamente regulada. En promedio, de cada diez candidatos vacunales en estudio menos de uno llega a ser aprobado por las entidades regulatorias. Dentro de los desafíos asociados al desarrollo de nuevas vacunas se encuentra la necesidad de que este nuevo producto sea seguro y eficaz (PhRMA, 2013).

En general, el proceso de poner un nuevo producto en el mercado lleva entre 10 y 15 años. Este proceso no se basa solamente en el desarrollo de un nuevo antígeno como candidato vacunal, sino también complejos y largos ensayos clínicos dedicados a confirmar la seguridad y eficacia del producto, como así también el desarrollo de técnicas que certifiquen la pureza, estabilidad y potencia de la vacuna (PhRMA, 2013; Josefsberg y Buckland, 2012).

Para llevar adelante cada uno de estos pasos es necesaria una detallada caracterización del biológico, objetivo mucho más complejo de realizar para una vacuna que para la mayoría de los productos farmacéuticos. Esto es así ya que el análisis de una molécula más pequeña, de por ejemplo 10 kDa, puede asegurar completamente su identidad y composición. Por otro lado, otros productos como las partículas virales poseen un tamaño de hasta 10.000 veces mayor, generando una complejidad superior para asegurar su identidad. Justamente el desafío que conlleva la caracterización de moléculas (o estructuras macromoleculares) tan grandes y complejas ha generado una tendencia histórica en donde el proceso de producción de una vacuna termina por definir el producto mismo. Todos los procesos de fabricación de vacunas deben ser descritos y caracterizados con gran detalle, incluyendo la naturaleza y el rendimiento del equipo específico utilizado para cada paso del proceso de fabricación (Buckland, 2005).

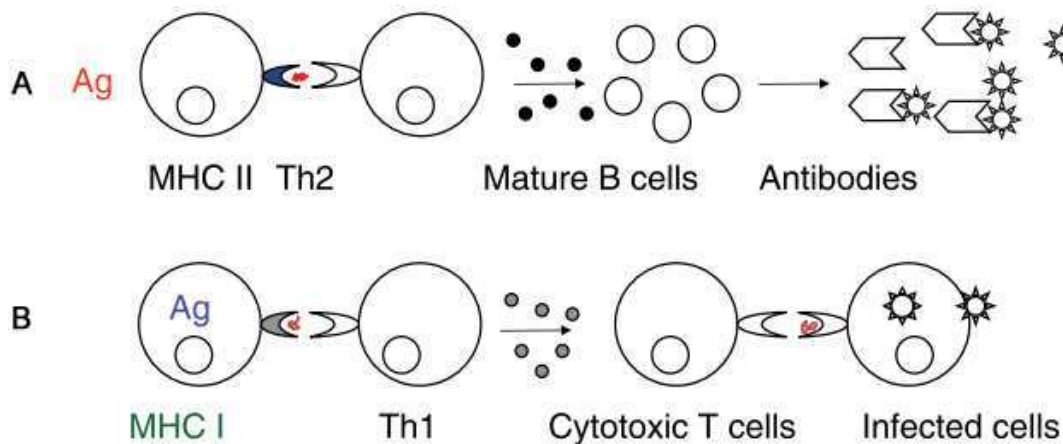
### 1.3. Vacunas y respuesta inmune

En la infección por un patógeno o durante la exposición a un antígeno que forma parte de una vacuna, la primera línea de defensa del organismo, la cual comienza a actuar durante los primeros minutos de contacto, generalmente implica una respuesta inmune no específica denominada respuesta inmune innata. Durante el transcurso de la misma, varios tipos de células del sistema inmune que incluyen macrófagos, neutrófilos y células *natural killer* (NK), intentan eliminar al patógeno y/o a las células infectadas por el mismo. La respuesta inmune innata es inespecífica y sus células son capaces de reconocer moléculas presentes en un amplio número de microorganismos, generalmente denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*). Estos PAMPs son reconocidos por receptores presentes en la superficie de las células del sistema inmune, siendo los más estudiados un grupo conocido como *toll-like* (TLRs, *toll-like receptors*). Además de combatir las infecciones, la respuesta inmune innata estimula el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa subsiguiente, al proporcionar señales que son esenciales para la iniciación de las respuestas antígeno específicas (Abbas y col., 2002; Trevani y Geffner, 2005).

Aunque la activación de la respuesta inmune innata es muy importante durante la vacunación, como se acaba de mencionar, las vacunas están diseñadas para estimular principalmente a la respuesta inmune adaptativa. Esta respuesta inmune es la segunda línea de defensa por la cual pasa un patógeno o antígeno al ingresar al organismo y es la respuesta para la cual se adquiere una “memoria inmunológica”. Durante esta respuesta antígeno específica, células presentadoras de antígeno (APC, *antigen presenting cells*) como macrófagos, linfocitos y células dendríticas (DCs, *dendritic cells*, las cuales son conocidas por ser las APC por excelencia) son reclutadas en el sitio de la infección o inyección. De modo muy general, se puede decir que pueden ser generadas dos tipos de respuesta inmune adaptativa. La respuesta inmune humoral, que está mediada por anticuerpos, y la respuesta inmune celular, mediada por linfocitos T (LT).

En la respuesta inmune humoral, los linfocitos B (LB) reconocen epitopes específicos de antígenos exógenos al organismo, interaccionando con

ellos a través de las inmunoglobulinas que posee en su superficie y funcionan como los receptores de las células B (BCR, *B cell receptor*). En primera instancia, las APC internalizan, procesan y presentan antígenos en su superficie en el contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II, *mayor histocompatibility complex*). De esa forma, las APC pueden estimular linfocitos T colaboradores (LTh, *T helper*) de tipo 2 para lograr la activación y diferenciación de LB antígeno-específicos que, posteriormente, se convertirán en células plasmáticas para la producción de anticuerpos (Fig. 3-A). La actividad efectora de estos anticuerpos puede llevarse a cabo a través de la interacción directa con el antígeno, logrando la neutralización del mismo y de esa forma previniendo o deteniendo la infección por parte del patógeno. Por otro lado, los anticuerpos pueden mediar la lisis de las células infectadas por el patógeno, a través de la activación de cascadas de complemento o de la respuesta de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC, *antibody-dependent cell cytotoxicity*).



**Figura 3. Esquema simplificado de la respuesta inmune adaptativa. A.** Procesamiento de antígenos exógenos, presentados en el contexto del CMH-II, induciendo la producción de anticuerpos específicos. **B.** Presentación de antígenos endógenos, vía CMH-I, generado la activación de LTC y una respuesta inmune celular (adaptado de Hu y Ho, 2013).

En la respuesta inmune celular, las APC son capaces de presentar antígenos que se encuentran en sus citoplasmas en el contexto del MHC de tipo I. Esta interacción entre APC y LT puede resultar en la activación y proliferación de un tipo específico de linfocitos denominados “citotóxicos” (LTC). Ya que las moléculas del MHC-I se encuentran presentes en casi todas las células del organismo, los LTC son capaces de pensar qué células se

encuentran infectadas por patógenos (especialmente virus) y eliminarlas (Fig. 3-B).

Luego de un tiempo, la mayor parte del repertorio de linfocitos antígeno específico desaparecen y solo quedan algunas células que son denominadas “células de memoria”. Estos linfocitos de memoria son células de vida prolongada funcionalmente inactivas que entran en el reservorio de linfocitos circulantes y son capaces de desarrollar repuestas rápidas frente a encuentros subsiguientes con el antígeno (Fainboim, 2005).

La vacunación se basa, entonces, en el principio de la memoria inmunológica, en la que en un segundo encuentro con un agente infeccioso se desata una respuesta inmune específica que logra resolver la infección antes de que la misma sea un problema para el organismo. Mientras que durante una respuesta inmune generada por el contacto por primera vez con un antígeno demora aproximadamente entre 10 y 14 días en desarrollarse efectivamente, la memoria inmunológica previamente obtenida acorta este tiempo a solo un par de días (Zepp, 2010).

### 1.4. Clasificación de las vacunas

Durante décadas, la única estrategia disponible para el desarrollo de vacunas fue la de utilizar el agente etiológico completo de la enfermedad en cuestión (Fig. 4). De este abordaje surgieron dos tipos de vacunas:

**Vacunas a microorganismos atenuados:** en este tipo de vacunas, el agente etiológico de la enfermedad (bacteria o virus) ha perdido o disminuido su virulencia o capacidad de enfermar al individuo. Esto se logra realizando pasajes repetitivos del patógeno en un huésped no natural para el mismo, o en cultivos celulares. Estas vacunas poseen un poder inmunogénico muy bueno, generando respuestas inmunes de larga duración con pocas dosis administradas. No son aconsejables en individuos inmunocomprometidos y siempre está latente la probabilidad de reversión. Entre las vacunas de este tipo se encuentran las disponibles para enfermedades virales como la fiebre amarilla, sarampión, rubeola, paperas y polio (Sabin). Por otro lado, una de las vacunas bacterianas más ampliamente utilizadas es la denominada BCG, para el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*.

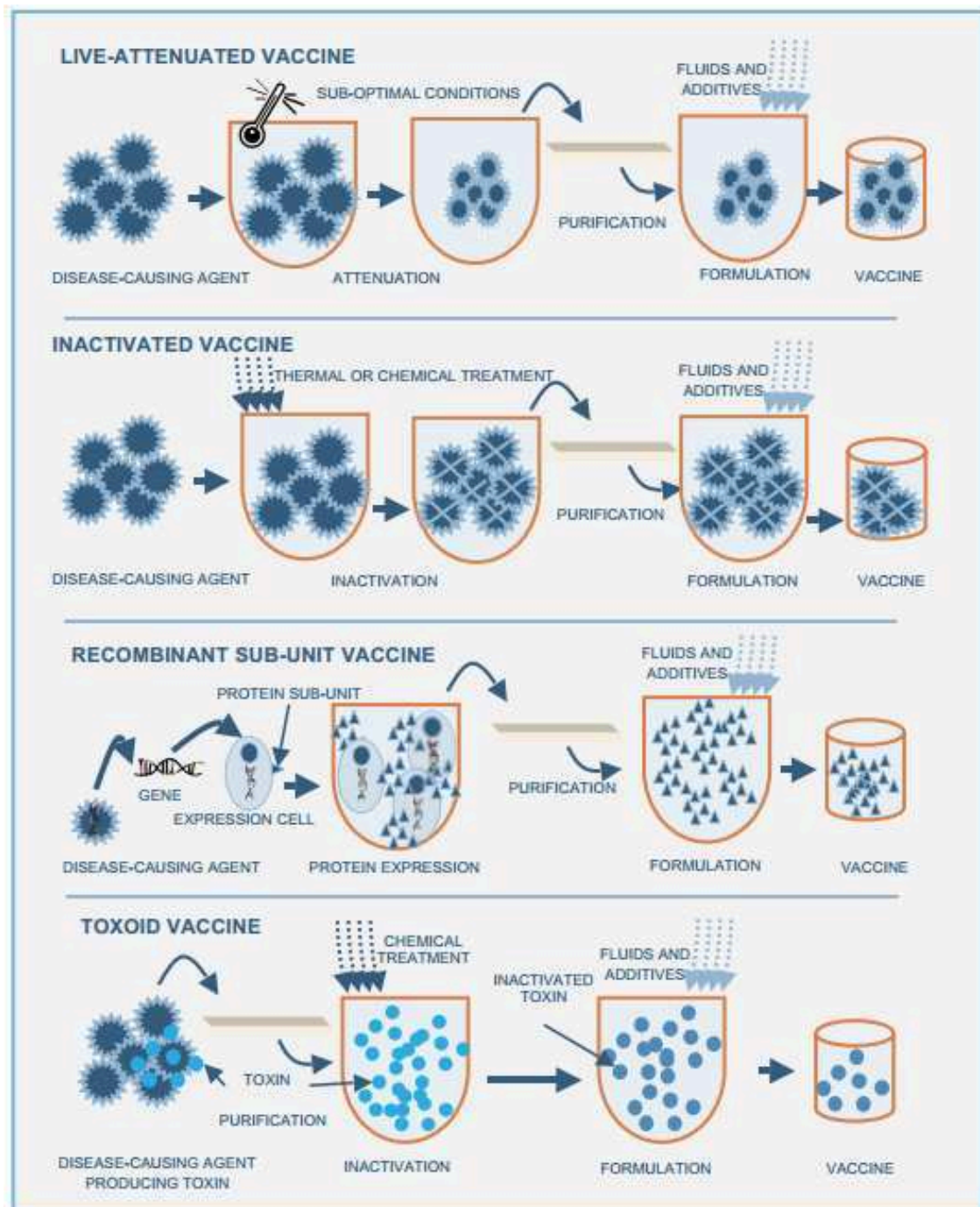


Figura 4. Esquemas de producción de algunos tipos de vacunas (adaptado de PhRMA, 2013).

**Microorganismos inactivados (o muertos):** en este tipo de vacunas el agente infeccioso, luego de ser producido, es inactivado por métodos físicos (calor, radiación UV o gamma) o químicos (algunos agentes inactivantes son la beta-propiolactona, formalina o éter). Ya que no son capaces de replicar, son necesarias repetidas dosis y el uso de adyuvantes para lograr una buena respuesta inmune. Por otro lado, los procesos de inactivación generalmente

disminuyen la inmunogenicidad de las proteínas, debido al efecto deletéreo que producen sobre ellas. Otra desventaja de utilizar estas vacunas es la posibilidad de insuficiente inactivación del patógeno durante su producción, pudiendo desatar complicaciones durante la inmunización. Algunas enfermedades prevenidas con este tipo de vacunas son la polio (Salk), influenza, rabia, hepatitis A y pertusis (vacuna celular).

Una segunda estrategia para la producción de vacunas más seguras es la de utilizar fracciones o partes de los patógenos como inmunógeno:

**Vacunas acelulares:** esta estrategia es de elección cuando se conoce o se tiene identificado con certeza que una parte o producto de un microorganismo es lo que causa la enfermedad y no el patógeno en sí mismo. Es el caso de muchas toxinas bacterianas, como las toxinas diftéricas o tetánica. Estas toxinas inactivadas con agentes químicos se denominan toxoides. Al igual que las vacunas inactivadas, las vacunas acelulares generalmente deben ser administradas en repetidas dosis y con el agregado de adyuvantes. Algunos ejemplos que utilizan esta tecnología son las vacunas para el neumococo, meningococos y pertusis (vacuna acelular).

A partir del desarrollo de las tecnologías del ADN recombinante e ingeniería genética fue posible el desarrollo de vacunas a subunidades proteicas, como así también otros candidatos vacunales, que poseen otras estrategias de estimulación del sistema inmune (Murray y col., 1988; Tacken y col., 2007; Zepp, 2010; Ingolotti y col., 2010; Josefsberg y Buckland, 2012; Hu y Ho, 2013). Entre ellas se encuentran:

**Vacunas a subunidades:** este tipo de vacunas se componen solo de los antígenos más importantes de los patógenos, principalmente los componentes estructurales de los mismos, como lo son las proteínas localizadas sobre su superficie. Por lo tanto, son consideradas más seguras que las vacunas a patógenos inactivados o atenuados. Para su producción son utilizados sistemas de expresión heterólogos como levaduras, bacterias, el sistema baculovirus/células de insecto o células de mamífero, pudiendo controlar y estandarizar su proceso de producción. En la mayoría de los casos, la inmunogenicidad de estos antígenos es muy reducida, ya que las proteínas

solubles no son buenas activadoras de las CDs y otras APC. Por esta razón, las vacunas a subunidades son administradas utilizando adyuvantes y en numerosas dosis.

Un caso particular de vacunas de subunidades son las *virus-like particles* (VLPs), en donde los antígenos están formando parte de una partícula pseudoviral (una mayor descripción de las VLPs en la próxima sección).

**Vacunas a ADN:** en este tipo de vacunas, la inmunización se realiza con moléculas pequeñas de ácidos nucleicos, generalmente plásmidos, generando la expresión de los antígenos *in vivo*, como en una infección natural. La principal ventaja de estas vacunas es que son fáciles de producir y almacenar, ya que el ADN es una molécula muy estable. Por otro lado, su eficacia es baja y, además, existe la probabilidad de que se puedan producir anticuerpos anti-ADN.

**Vectores virales recombinantes:** para producir estos candidatos vacunales se utilizan vectores virales, que no son patógenos o virulentos para el humano, y que pueden ser modificados genéticamente, insertando en sus genomas las secuencias codificantes de los antígenos para los cuales se quiere generar inmunidad. Algunos de los vectores virales más utilizados para su aplicación en vacunas son los adenovirus, virus adeno-asociados, canarypox, entre otros.

**Células dendríticas:** En estas vacunas se realizan inmunizaciones utilizando células dendríticas cargadas con los antígenos para los cuales se quiere generar respuesta. Aunque esta tecnología es muy prometedora, se encuentra en fases incipientes de desarrollo.

En la figura 5 se detallan ejemplos de cada una de las vacunas aprobadas para uso humano y su respectiva clasificación.

Aunque los avances logrados durante las últimas décadas para generar vacunas de nueva generación no se ve reflejado aún en el mercado, ya que hasta el año 2013 de las 74 vacunas aprobadas para uso humano en Estados Unidos el 93% representaban vacunas producidas con patógenos inactivados o atenuados o vacunas acelulares, las últimas vacunas aprobadas por FDA (*Food and Drug Administration*) utilizan tecnología de ADN recombinante,



demostrando que el futuro del desarrollo de vacunas estará basado en la utilización de nuevas tecnologías, más eficientes y bioseguras (Grimm y Ackerman, 2013).

Product classification	Licensed vaccines	Adjuvant
Live attenuated virus	Smallpox, polio, measles, mumps, rubella, chicken pox, rotavirus, shingles, influenza, and yellow fever	No
Inactivated purified virus	Inactivated polio, japanese encephalitis, hepatitis A, Influenza (seasonal and pandemic), and rabies	Sometimes
Live attenuated bacterium	Tuberculosis and typhoid	No
Whole inactivated bacterium	Whole cell pertussis	Sometimes
Purified protein	Acellular pertussis	Yes
Purified protein toxoid	Tetanus, anthrax, and diphtheria	Sometimes
Purified virus-like particles (VLPs)	Hepatitis B and human papillomavirus	Yes
Purified polysaccharide	Pneumococcal for adults and typhoid	No
Polysaccharide conjugated to carrier protein	Pneumococcal for infants, haemophilus type B, and bacterial meningitis	Sometimes
Plasmid DNA	In development	Yes
Adenovirus DNA delivery	In development	No

**Figura 5. Clasificación de algunas vacunas aprobadas para uso humano.** Se detalla si se utiliza adyuvante en su formulación (adaptado de Josefsberg y Buckland, 2012).

### 1.5. Vacunas veterinarias

Un campo particular dentro del universo de las vacunas es el de las vacunas para uso animal. El interés en el desarrollo de vacunas veterinarias es doble, ya que su aplicación no solo es de utilidad para la salud del animal mismo (disminuyendo pérdidas económicas en caso de ser animales de producción) sino que, a través de la vacunación, se reducen también drásticamente los riesgos de contagio al ser humano de las enfermedades infecciosas que son transmitidas por animales (Meeusen y col., 2007).

El desarrollo de vacunas veterinarias para su producción y comercialización posee ventajas y desventajas, con relación a las vacunas de uso humano. Por un lado, los ingresos económicos que generan las vacunas de uso animal son considerablemente menores que las generadas por las vacunas humanas, reduciendo así las inversiones que generalmente realizan las empresas para la investigación y desarrollo en estas áreas. Por otro lado, el desarrollo de vacunas veterinarias posee menos regulaciones y los ensayos preclínicos requeridos son mucho menores que los exigidos para una vacuna humana, lo que hace que el dinero y tiempo necesario para colocar una vacuna en el mercado sea considerablemente menor (Poulet y col., 2007; Heldens y col., 2008).

Aunque las vacunas veterinarias representan solo el 23% del mercado global de sanidad animal, el sector está creciendo considerablemente gracias a

la aplicación de tecnologías de nueva generación y, en el caso particular de las vacunas veterinarias virales, debido a que la vacunación es el único tratamiento disponible debido a la falta de tratamientos antivirales de amplio espectro realmente efectivos. En la figura 6 se detallan algunos ejemplos de vacunas virales de segunda generación aprobadas para su uso en animales.

Target pathogen	Target animal	Brand name(s) <sup>a</sup>	Distributor	Characteristic(s)
PCV2	Pigs	Porcilis-PCV2	Intervet	Inactivated baculovirus expressed PCV2 ORF2 protein; adjuvanted
PCV2	Pigs	Suvaxyn PCV2	Fort Dodge	Inactivated PCV1-2 chimera; adjuvanted
Pseudorabies virus	Pigs	Suvaxyn Aujeszky	Fort Dodge	gE- and thymidine kinase-deleted marker vaccine
Classical swine fever virus	Pigs	Porcilis Pesti	Intervet	Baculovirus recombinant E2 protein without emulsion
Classical swine fever virus	Pigs	Bayovac CSF E2	Bayer Leverkusen	Baculovirus recombinant E2 protein without emulsion
BHV-1	Cattle	Bovilis IBR Marker	Intervet	Live or inactivated gE-deleted marker vaccine
Equine influenza virus	Horses	PROTEQ-FLU (European Union), Recombitek (United States)	Merial	Canarypox virus-vectored vaccine
WNV	Horses	PreveNile	Intervet	Live flavivirus chimera vaccine
WNV	Horses	West Nile-Innovator DNA	Fort Dodge	DNA vaccine
WNV	Horses	RECOMBITEKEquine WNV	Merial	Canarypox virus-vectored vaccine
MDV (HTV) and IBDV	Poultry	Vaxxitek HVT+IBD	Merial	Live recombinant chimera virus expressing VP2 gene of IBD on HTV virus
Newcastle disease virus	Poultry	NA	Dow AgroSciences	HN recombinant produced in plant cell lines (registered but not on market)
Newcastle disease virus	Poultry	Vectormune FP-ND	Biomunc	Fowlpox virus vectored
Avian influenza virus (H5N1) and NDV	Poultry		Intervet	Chimera virus on NDV backbone; field trials in 2007
Avian influenza virus	Poultry	Poulvac FluFend I AI H5N3 RG	Fort Dodge	Chimera H5N3 virus, inactivated in oil-based adjuvant
Avian influenza virus	Poultry	Trovac AI H5	Merial	Fowlpox virus-vectored H5
Rabies virus	Wildlife, canines	Raboral	Merial	Vaccinia virus recombinant
Rabies virus	Cats	Purevax Feline Rabies	Merial	Canarypox virus-vectored vaccine
Rabies virus	Cats	PUREVAX Feline Rabies	Merial	Canarypox virus-vectored vaccine
Feline leukemia virus	Cats	EURIFEL FeLV	Merial	Canarypox virus-vectored vaccine
Canine parvovirus	Dogs	RECOMBITEK Canine Parvo	Merial	Modified live virus
Canine coronavirus	Dogs	RECOMBITEK Corona MLV	Merial	Modified live virus
Canine distemper virus	Dogs	RECOMBITEK rDistemper	Merial	Canarypox virus-vectored vaccine (HA and F antigens)
Canine distemper virus	Fur animals	PUREVAXFerret Distemper	Merial	Canarypox virus-vectored vaccine
IHN virus	Salmon	Apex-IHN	Novartis (Aqua Health)	DNA vaccine

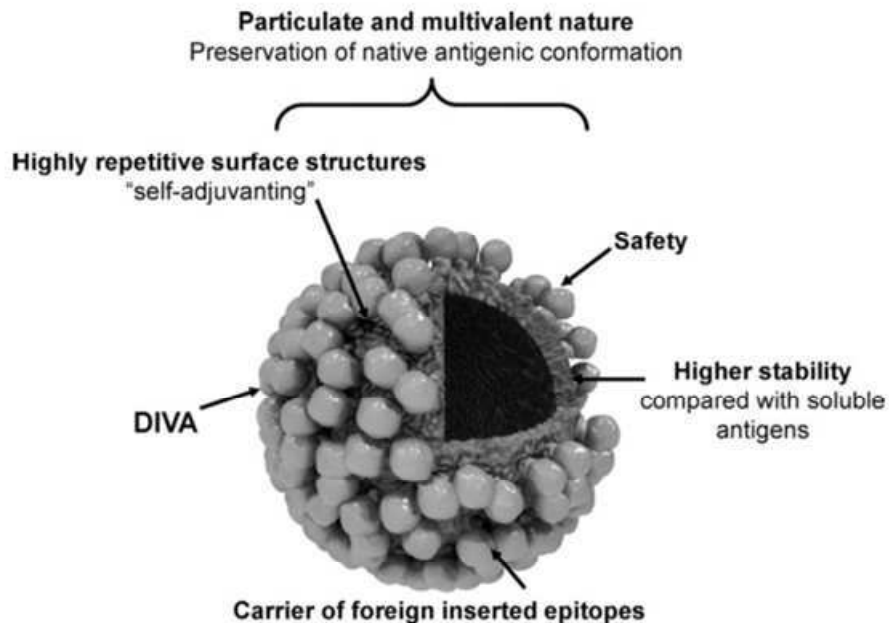
**Figura 6. Vacunas veterinarias virales de segunda generación aprobadas para su comercialización** (adaptado de Meeusen y col., 2007).

Por otro lado, el desarrollo de vacunas veterinarias no es exclusivo para enfermedades infecciosas, sino que también existen muchos desarrollos vacunales para enfermedades no infecciosas como cáncer y alergias, como así también vacunas para la fertilidad y el control de la producción en animales de producción, demostrando lo promisorio de este campo (Meeusen y col., 2007).

# **VIRUS-LIKE PARTICLES**

## 2. VIRUS-LIKE PARTICLES

Las proteínas estructurales de algunos virus poseen la capacidad intrínseca de autoensamblarse en estructuras macromoleculares denominadas VLPs. Estas poseen una forma y tamaño muy similar al virus *wild type*, pero carecen de los ácidos nucleicos virales (Fig. 7). Debido a esto, no son infecciosas y por lo tanto son totalmente bioseguras (Noad y Roy, 2003; Grgacic y Anderson, 2006).



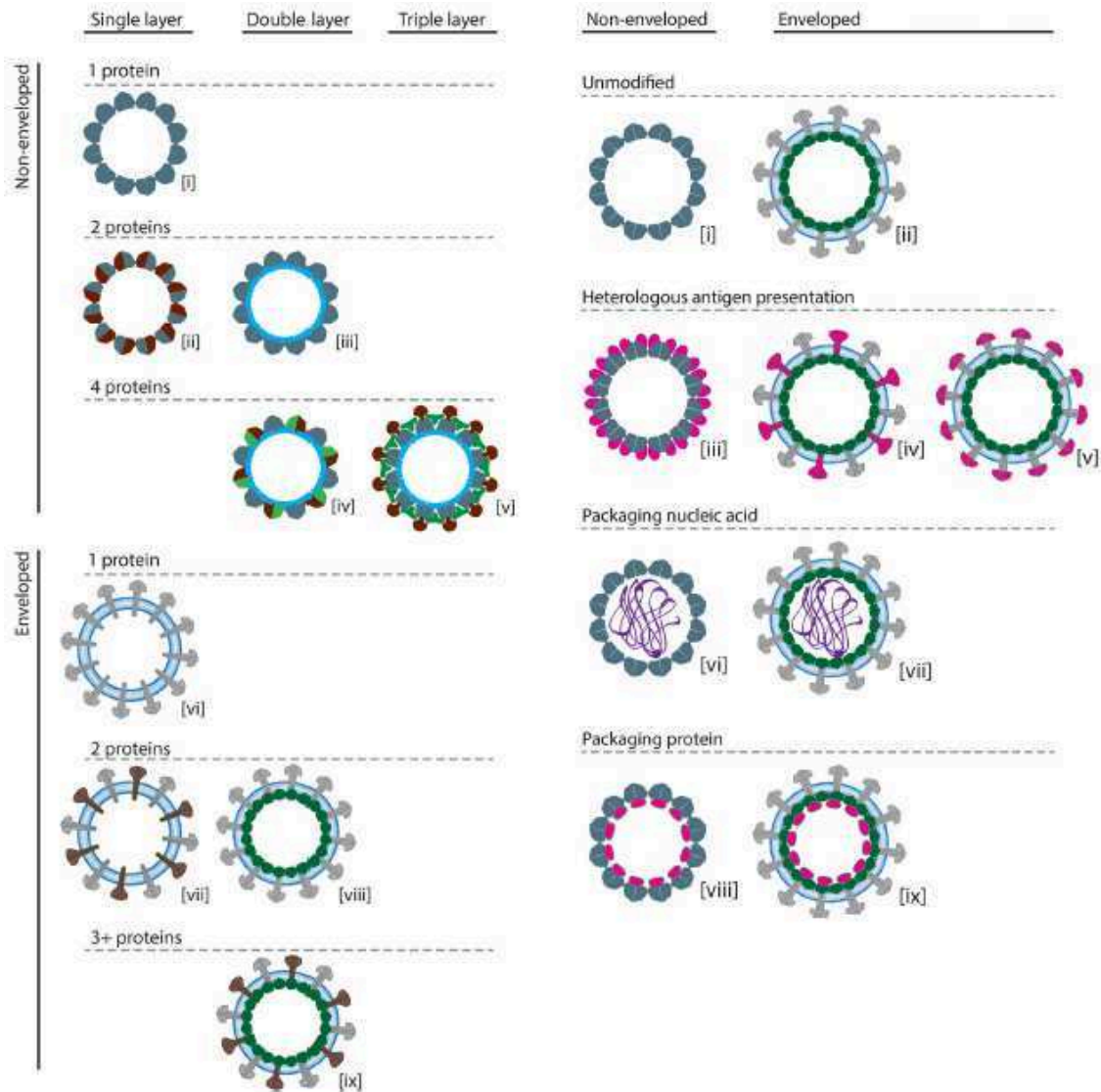
**Figura 7. Representación esquemática de la estructura de las VLPs** (adaptado de Crisci y col., 2012).

Debido a que las VLPs son partículas que carecen del material genético viral, la utilización de estas partículas pseudovirales como inmunógenos anula la posibilidad de reversión que poseen las vacunas atenuadas, como así también la manipulación del virus activo durante la producción de vacunas inactivadas. Además, el efecto deletéreo que sufren las partículas virales durante los procesos de inactivación, los cuales disminuyen considerablemente su inmunogenicidad, no están presentes en el proceso de producción de VLPs (Noad y Roy, 2003; Grgacic y Anderson, 2006; Chakerian y col., 2007; Ludwig y col., 2007).

### 2.1. Clasificación

Existen diversos tipos de VLPs, pudiendo clasificarse según su diversidad estructural o su funcionalidad. En cuanto a su estructura, las VLPs

pueden clasificarse en partículas no envueltas (o “desnudas”) y en partículas con envoltura (Noad y Roy, 2003). Estas VLPs pueden estar, a su vez, formadas por una o más proteínas, pudiendo clasificarse en simple, doble o triple capa (Fig. 8).

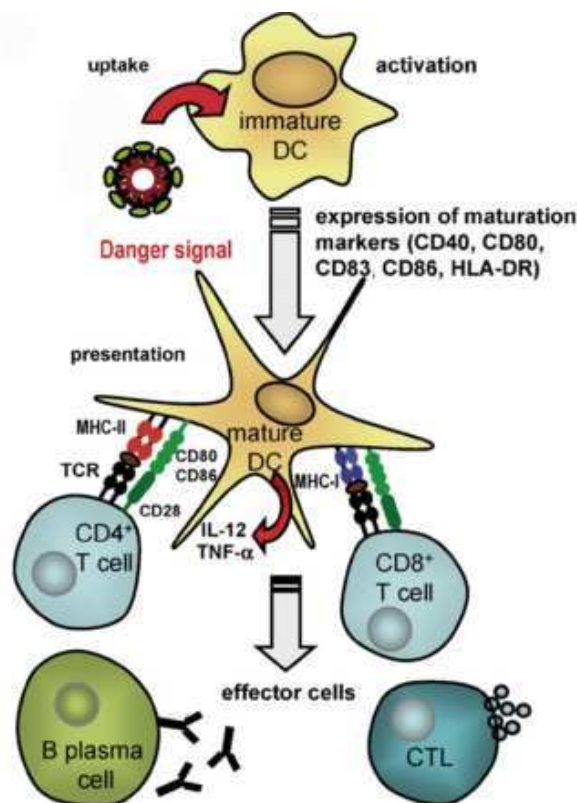


**Figura 8. Clasificación de VLPs.** Estas pueden clasificarse tanto de forma funcional como estructural, según las características tenidas en cuenta (adaptado de Lua y col., 2014).

En cuanto a su funcionalidad, se pueden clasificar en VLPs “no modificadas” (o formadas solamente por proteínas estructurales del virus) y en VLPs quiméricas, pudiendo estar conformadas por proteínas de más de un tipo de virus o por proteínas de fusión, llevando de esa forma antígenos o epitopes heterólogos. A su vez, las VLPs pueden ser utilizadas para *delivery* de ácidos nucleicos o proteínas heterólogas (Fig. 8) (Garcea y Gissmann, 2004; Rodríguez-Limas y col., 2013; Lua y col., 2014).

## 2.2. Respuesta inmune

Las VLPs son capaces de estimular la respuesta inmune innata ya que, como los virus completos, poseen sobre sus superficies diversos tipos de PAMPs capaces de ser reconocidos por las células del sistema inmune, induciendo así el comienzo de una respuesta inmune inflamatoria (Raghuandan, 2011). Por otro lado, la presencia repetitiva de las proteínas sobre la superficie de la VLPs (a diferencia de las vacunas a proteínas solubles) favorece el reconocimiento por parte de los LB, generando el *crosslinking* de sus receptores y su posterior activación. Además, durante el ensamblado de las VLPs las proteínas virales logran plegarse correctamente, pudiendo conservar epítopes conformacionales, sobre todo aquellos que se generan de la yuxtaposición de glicoproteínas que forman trímeros sobre la superficie del virus. Esta característica es clave a la hora de generar la inducción de anticuerpos neutralizantes, parte indispensable de la respuesta inmune humoral en infecciones virales.



**Figura 9. Mecanismos de estimulación del sistema inmune por parte de una VLP.** Una vez internalizada por una DC, las VLPs son capaces de generar su activación, para luego ser presentada a los LT en el contexto de las moléculas del MHC-I y/o MHC-II. De esta forma las VLPs son capaces de inducir una respuesta tanto celular como humoral (adaptado de Ludwig y Wagner, 2007).

Como antígenos exógenos, y gracias a su estructura particulada, las VLPs son eficientemente tomadas y procesadas por las APC (particularmente las CDs), y presentadas en el contexto MHC-II, generando así la maduración de las CDs y la posterior activación de LTh CD4+ (Braun y col., 2012). De forma similar a lo que ocurre con los virus nativos, las VLPs también son procesadas en el citoplasma de las CDs y son presentadas en el contexto del MHC-I a los linfocitos LTCs CD8+, induciendo una fuerte respuesta inmune citotóxica (Bachmann y Jennings, 2010; Murata y col., 2003; Win y col., 2011). Todo esto hace que las VLPs sean excelentes inmunógenos para la generación de una respuesta inmune balanceada, característica muy importante para un candidato vacunal (Fig. 9).

Las VLPs han sido ampliamente utilizadas en el desarrollo de vacunas para uso humano, existiendo en el mercado vacunas disponibles que utilizan esta tecnología. Mientras la primera vacuna recombinante para la hepatitis B fue aprobada en Estados Unidos por su entidad regulatoria (FDA) en 1986, recién en el 2006 se logró la aprobación de una segunda vacuna a base de VLPs, en este caso para el virus del papiloma humano (HPV). Por otro lado, otros candidatos vacunales están en desarrollo expresando VLPs de diversos tipos de virus y en distintos sistemas de expresión (Fig. 10). Un artículo reciente informa que más de 110 VLPs de 35 familias virales han sido construidas y evaluadas en diferentes campos de investigación (Rodríguez-Limas y col., 2013).

En el campo de la medicina veterinaria existe solo un producto comercial a base de VLPs (Porcilis PCV<sup>®</sup>, producido por Intervet International), pero muchos otros candidatos vacunales están en desarrollo (Liu y col., 2011; Brun y col., 2011; Crisci y col., 2012). Esto es así debido a que las VLPs son excelentes candidatos para la producción de vacunas veterinarias ya que poseen características DIVA (*differentiating infected from vaccinated animals*). En veterinaria es muy importante realizar vigilancia epidemiológica y de esa forma poder analizar el estado de los animales dentro de una zona específica de producción, como así también poder saber si el agente etiológico está circulando. Generalmente, estos estudios se llevan adelante con ensayos serológicos (como ELISAs) buscando marcadores específicos de cada patógeno. Si la vacuna posee todos los antígenos que están presentes en el

microorganismo patógeno, es imposible diferenciar entre animales que fueron solo vacunados de los que realmente están o estuvieron infectados. De esta forma, el desarrollo de vacunas con características DIVA es de gran interés para el campo de la veterinaria, sobre todo para ser aplicadas en las zonas productivas (Liu y col., 2013).

Examples of VLPs used for vaccines and vaccine development					
Virus	Particle composition	Type/expression system	Size	Vaccine status	References
HBV	Small envelope protein (HBsAg)	rec VLP (yeast) (Recombivax-HB; Engerix-B)	22 nm	Licensed	[46,47]
	Small envelope protein (HBsAg)	rec VLP (potato)	17 nm	Preclinical	[48]
	PreS1+2 and HBsAg	rec VLP (CHO cells) (Sci-B-Vac; BioHepB)	22 nm	Licensed	[9,10,12,13]
	HBsAg	Native SVP (plasma)	22 nm	Licensed (developing world)	[49]
HPV	L1, major capsid protein	recVLP (mammalian cells; baculovirus; yeast) Gardasil, Cervarix	40–50 nm	Licensed	[50–53]
HEV	Truncated major capsid protein (ORF2)	rec VLP (baculovirus)	23.7 nm		[54–56] [57] (review)
Influenza	HA, NA, matrix	recVLP (baculovirus)	80–120 nm	Preclinical	[14–16]
HCV	Core, E1, E2	recVLP (baculovirus)	40–60 nm	Preclinical	[58–61]
Poliovirus	Capsid (VP0,1,3)	recVLP (baculovirus)	27 nm	None	[3]
HIV	Pr55gag, envelope	recVLP (baculovirus; mammalian cells; yeast)	100–120 nm	Preclinical	[62,63] [64,65] (review) [18] (review)
Ebola virus; Marburg virus	Glycoprotein (GP) and matrix (VP40)	recVLP (mammalian cells)	Filovirus-like particle	Preclinical	[66–68]
Norwalk virus	capsid	rec VLP (baculovirus; transgenic potatoes)	38 nm	Phase I	[69,44,70]
Rotavirus	VP2,VP6,VP7	recVLP (baculovirus)	70–75 nm	Preclinical	[5,71,72]
SARS coronavirus	S, E and M	rec VLP (baculovirus)	100 nm	Preclinical	[73]

*Abbreviations:* HBV, hepatitis B virus; HPV, human papilloma virus; HEV, hepatitis E virus; HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; SARS, severe acute respiratory syndrome.

**Figura 10. Ejemplos de VLPs utilizadas para el desarrollo de nuevas vacunas.** HBV: virus de la hepatitis B. HPV: virus del papiloma humano. HEV: virus de la hepatitis E. HCV: virus de la hepatitis C. HIV: virus de la inmunodeficiencia humana. SARS: virus del síndrome agudo respiratorio (adaptado de Grgacic y Anderson, 2006).

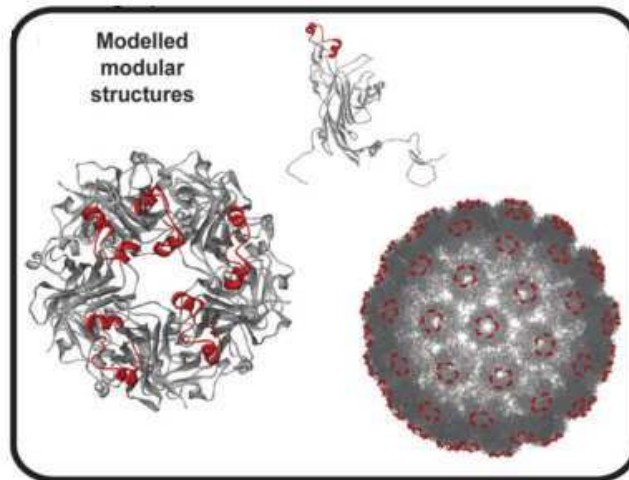
### 2.3. VLPs quiméricas

Algunos tipos de VLPs poseen la capacidad de poder incorporar en su estructura antígenos o epitopes heterólogos, incluyendo aquellos que no podrían autoensamblarse en forma de partícula, formando lo que se conoce como VLPs quiméricas. Esto puede llevarse a cabo expresando proteínas de fusión como parte de la estructura de una VLP o realizando conjugaciones químicas sobre la estructura de la cápside de una VLP preformada y logrando así poder fusionar estructuras no proteicas como, por ejemplo, la nicotina (Grgacic y Anderson, 2006; Tissot y col., 2010).

Las herramientas computacionales son utilizadas para realizar modelados moleculares de posibles estructuras generadas con el agregado de



distintos epitopes, sobre la base de una VLP ya conocida (Fig. 11) (Lua y col., 2014).

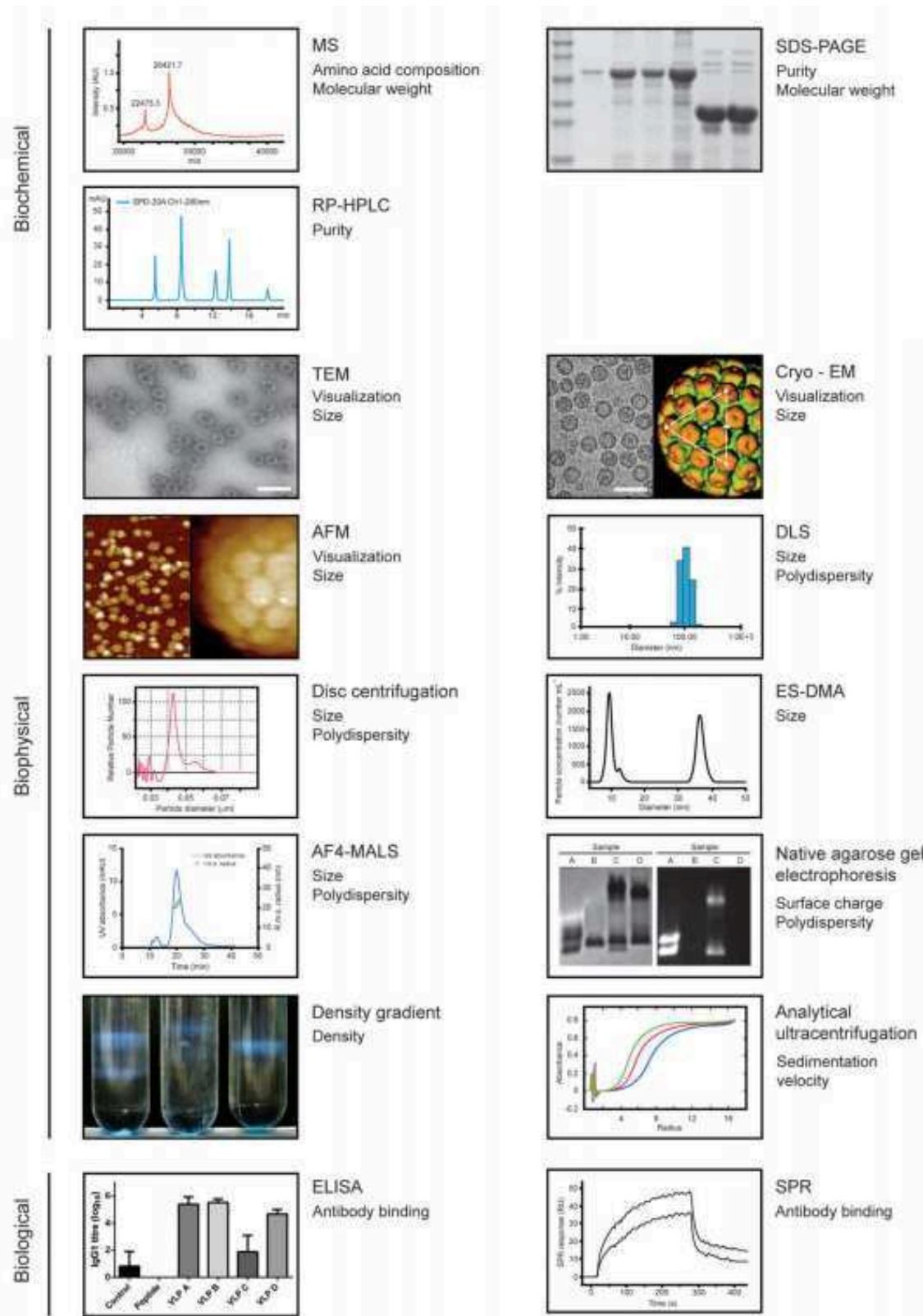


**Figura 11. Herramientas computacionales para el diseño de VLPs quiméricas.** Epitopes previamente estudiados por estudios bioinformáticos son modelados sobre la estructura modular de una VLP conocida (adaptado de Lua y col., 2014).

## 2.4. Caracterización de VLPs

Durante el desarrollo de nuevas VLPs es imprescindible llevar a cabo su correcta caracterización. Una mala interpretación de las características que poseen las partículas puede impactar directamente en la eficiencia del bioproceso, particularmente en los pasos de *downstream*, generalmente diseñados teniendo en cuenta dichas características (Zeltins, 2012; Lua y col., 2014). Con una buena caracterización se puede obtener información acerca de las propiedades fisicoquímicas, biológicas y bioquímicas de las VLPs en estudio (Fig. 12).

Como primer paso de caracterización siempre es necesario llevar adelante la purificación a escala analítica de las VLPs producidas. Generalmente, la técnica de elección en esta etapa es la ultracentrifugación utilizando colchones o gradientes de densidades (producidos con sacarosa, cloruro de cesio o iodixanol). Además de la purificación de las VLPs, con estas técnicas es posible obtener información sobre la densidad de las partículas presentes en la muestra.



**Figura 12. Herramientas analíticas utilizadas para la caracterización de VLPs**, basadas en sus características fisicoquímicas, bioquímicas y biológicas. MS: espectrometría de masas. TEM: microscopía electrónica de transmisión. Cryo-EM: criomicroscopía electrónica. AFM: microscopía de fuerza atómica. DLS: dispersión dinámica de luz. ES-DMA: análisis de movilidad diferencial en electroespray. AF4-MALS: fraccionamiento campo flujo acoplado de dispersión de luz multiángulo. SPR: resonancia plasmónica de superficie (adaptado de Lua y col., 2014).

Luego, la visualización de las VLPs purificadas utilizando microscopía electrónica es imprescindible. Llevando adelante una microscopía electrónica de transmisión (MET), generalmente asociada a una tinción negativa (utilizando acetato de uranilo o ácido fosfotúngstico), es posible obtener información acerca de la forma y el tamaño de las VLPs. Además, es necesario confirmar la presencia de los antígenos expresados sobre la superficie de las partículas que son observadas. Para esto, MET asociadas a inmunomarcaciones utilizando anticuerpos conjugados a oro coloidal son llevadas a cabo. Por otro lado, es posible que durante la preparación de las muestras durante una MET se puedan producir deformaciones o artefactos de la estructura real de las partículas. Técnicas de visualización como la criomicroscopía electrónica y la microscopía de fuerza atómica son utilizadas como alternativa.

Otras técnicas llevadas a cabo durante la caracterización fisicoquímica de las VLPs, y que tienen como objetivo obtener información cuantitativa de las muestras, son la dispersión dinámica de luz (DLS, *dynamic light scattering*), análisis de la movilidad por electroespray y ultracentrifugación analítica (Fig. 12). Entre ellas, el DLS es una de las técnicas más simples y rápidas de llevar a cabo, pudiendo obtener la información sobre el diámetro hidrodinámico de las partículas en una muestra monodispersa.

En cuanto a la caracterización bioquímica, técnicas simples como SDS-PAGE y western blot son llevadas a cabo para el análisis de la composición proteica de las partículas obtenidas. La espectrometría de masas es una técnica muy poderosa si se necesita obtener información sobre el peso molecular de las proteínas que forman parte de las VLPs, como así también de la composición aminoacídica de las mismas. Por otro lado, para estudiar la pureza de las VLPs en una muestra, HPLC utilizando columnas de fase reversa o tamiz molecular son comúnmente utilizadas.

La caracterización biológica de las partículas puede llevarse a cabo estudiando la interacción de las VLPs con anticuerpos, a través de ensayos simples, como ELISA o western blot, o de metodologías más complejas y que brindan mayor información, como la resonancia plasmónica superficial.

Por otro lado, el análisis de la capacidad inmunogénica de las VLPs es indispensable a la hora de proponerlas como un posible candidato vacunal. Para tal fin, es necesario diseñar planes de inmunización de animales de

experimentación para analizar si las VLPs son capaces de generar una respuesta inmune *in vivo*. Generalmente, para confirmar que esta respuesta inmune es realmente protectora, son llevados a cabo ensayos de desafío (*challenge*). En estos experimentos, luego de vacunar a los animales estos son enfrentados con el patógeno, evaluando si son capaces de resolver la infección. En algunos casos, estos ensayos no sirven solamente para evaluar si el candidato vacunal es capaz de generar una respuesta inmune que genere protección, sino también son utilizados para medir la potencia de la muestra en cuestión.

### 2.5. Sistemas de expresión utilizados para la producción de VLPs

Un factor importante a la hora de producir VLPs es el sistema de expresión a utilizar. Esta elección depende, principalmente, del tipo de VLPs que se busque expresar y de sus características estructurales y antigénicas. No todos los sistemas logran expresar correctamente todos los tipos de VLPs (Fig.13). En segundo lugar, los niveles de productividad requeridos serán tenidos en cuenta, aunque esto también dependa, en gran medida, del tipo de VLPs a producir (Fig. 14).

Del amplio espectro de VLPs estructuralmente diversas que están descritos en la bibliografía, el 28% de los casos utiliza bacterias, el 20% levaduras y el 28% el sistema baculovirus/células de insecto, mientras que solo el 9% lo hace utilizando plantas y el 15% células de mamíferos (Zeltins, 2012).

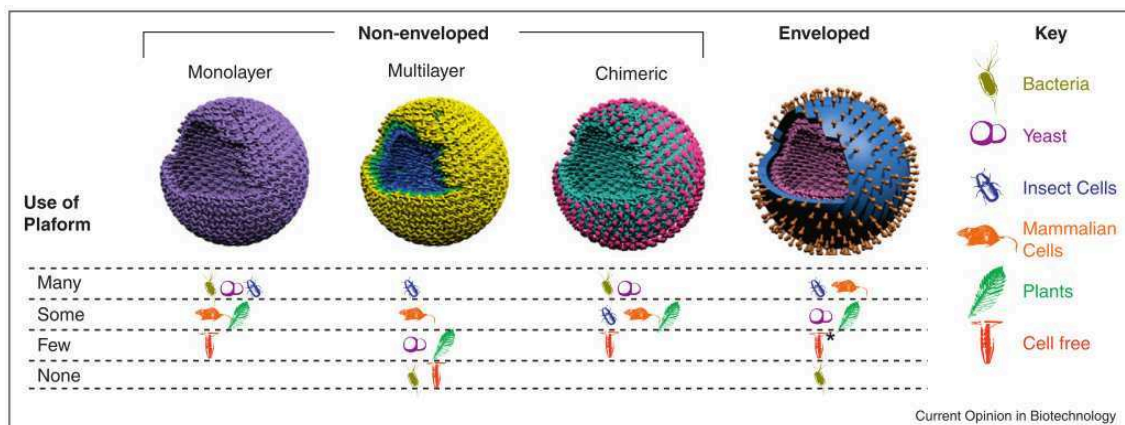
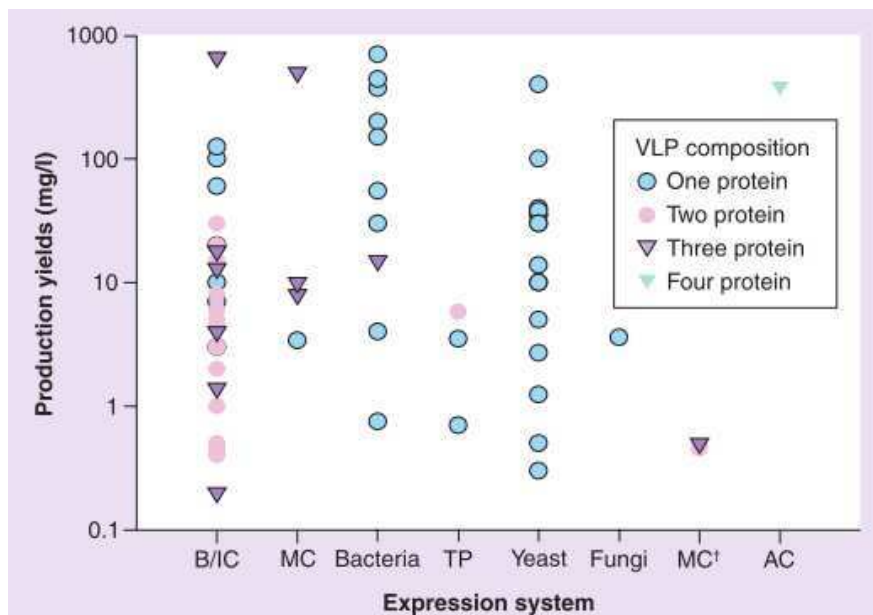


Figura 13. Plataformas de producción utilizadas para la expresión de VLPs con diferentes configuraciones (adaptado de Rodríguez-Limas y col., 2013).

### 2.5.1. Bacterias

Para la producción de VLPs estructuralmente simples, compuestas por una o dos proteínas, el sistema de expresión de elección serán las bacterias, las cuales poseen altos rendimientos (hasta  $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) y condiciones de cultivos muy simples. El principal punto negativo en la utilización de este sistema es que las bacterias son incapaces de realizar modificaciones post-traduccionales a las proteínas (como glicosilaciones), característica imprescindible en muchas proteínas virales que forman parte de VLPs. Por otro lado, muchas veces las proteínas eucariotas son insolubles al ser expresadas en sistemas procariontes y, además, debe asegurarse la ausencia de endotoxinas bacterianas, generando pasos extra de purificación y análisis al bioproceso y aumentando así los costos totales de producción. Debido a todo esto, ninguna VLPs para uso humano producida en bacterias ha llegado al mercado (Roldão y col., 2010).



**Figura 14. Productividades logradas utilizando diversos sistemas de expresión para producir VLPs estructuralmente distintas.** B/IC: sistema baculovirus/células de insecto. MC: células de mamífero. TP: plantas transgénicas. MC†: baculovirus/células de mamífero. AC: células de ave (adaptado de Roldão y col., 2010).

### 2.5.2. Levaduras

Así como las bacterias, las levaduras son un sistema de expresión en el que se ha logrado la producción de VLPs con estructuras simples, obteniéndose altos rendimientos de producción. A diferencia de las bacterias,

existen en el mercado 4 productos basados en VLPs expresadas en levaduras: tres vacunas para hepatitis B (Recombivax HB<sup>®</sup>, Engerix-B<sup>®</sup> y Hepavax-Gene<sup>®</sup>) y una para HPV (Gardasil<sup>®</sup>). La mayor desventaja que poseen las levaduras es que solo son capaces de introducir modificaciones post-traduccionales simples a las proteínas que expresan, no siempre suficientes a la hora de mantener las características antigénicas de las VLPs.

### **2.5.3. Sistema baculovirus/células de insecto**

Utilizando este sistema de expresión se pueden producir VLPs mucho más complejas (de hasta 5 proteínas) y lograr valores de productividad parecidos a los obtenidos en bacterias y levadura. En el mercado existe un producto a base de VLPs expresadas en células de insecto, denominado Cervarix<sup>®</sup> (vacuna para el HPV). La principal limitación que posee este sistema es la contaminación con baculovirus, los cuales son capaces de replicarse y estarán presentes en el cultivo productor contaminando las VLPs. En algunos casos la presencia de estas partículas es beneficiosa ya que los baculovirus poseen capacidad de adyuvante, pudiendo entonces formar parte de la formulación final de la vacuna, adicionando al proceso un respectivo paso de inactivación viral (Roldão y col., 2010).

### **2.5.4. Plantas**

Diversas especies de plantas pueden ser utilizadas para la producción de VLPs, entre ellas tomate, soja y papa. Entre las ventajas de la utilización de este sistema se encuentran los bajos costos de producción y la posibilidad de un fácil proceso de escalado. En contraposición, la imposibilidad de realizar correctas modificaciones post-traduccionales en sus proteínas, los bajos valores de productividad y la inestabilidad de las VLPs expresadas son las principales desventajas de la utilización de plantas transgénicas para la producción de VLPs.

### **2.5.5. Sistemas libres de células**

Otra posibilidad a la hora de producir VLPs es utilizar sistemas libres de células. Se ha descrito el ensamblado de partículas pseudovirales en sistemas libres de células provenientes de bacterias y de levaduras (Rodríguez-Limas y col., 2103). Estos sistemas, muy incipientes en sus desarrollos, son muy versátiles y fáciles de escalar, pero poseen las mismas

limitaciones de otros sistemas en cuanto a la complejidad de las VLPs que pueden ser ensambladas, no pudiendo realizarse complejas modificaciones post-traduccionales.

#### **2.5.6. Células de mamífero**

La principal ventaja de las células de mamífero, muchas veces definitoria a la hora de la elección del sistema de expresión, es la posibilidad de realizar correctas modificaciones post-traduccionales. Dentro de estas, se encuentra la glicosilación en las proteínas, como las que poseen muchas glicoproteínas virales. Estas células son capaces de ensamblar VLPs simple o multicapa (hasta 5 proteínas en su estructura) y, por supuesto, generar VLPs con envoltura. Son precisamente estas características, algunas veces imposibles de obtener con otros sistemas, las que definen que sean las células de mamíferos las de elección, a pesar de los elevados costos y la complejidad muchas veces requerida para cultivar estas células eucariotas.

Como se discutió en esta sección, las VLPs son muy buenos inmunógenos ya que poseen una presentación antigénica muy similar a la del virus *wild type*, pero al carecer de sus ácidos nucleicos no son infecciosas. Tanto las vacunas a base de VLPs disponibles comercialmente, como los innumerables desarrollos actuales, demuestran que las VLPs son excelentes candidatos vacunales capaces de ser producidos en un proceso totalmente bioseguro, sin la manipulación de agentes infecciosos.

# **TECNOLOGÍA DE CULTIVO DE CÉLULAS DE MAMÍFERO**



### 3. TECNOLOGÍA DE CULTIVO DE CÉLULAS DE MAMIFERO

#### 3.1. Líneas celulares de mamífero como plataforma para la producción de bioterapéuticos

Podemos definir a un bioterapéutico como un producto biológico producido utilizando biotecnología moderna para ser utilizado en diagnóstico, terapias o prevención de enfermedades. Aunque muchos productos con estas características siguen siendo generados por técnicas clásicas de producción, más de 100 proteínas terapéuticas recombinantes han sido aprobadas por la FDA hasta la actualidad (Zhu, 2012).

La producción de proteínas recombinantes con aplicaciones biofarmacéuticas es una industria millonaria, con ventas mundiales de hasta US\$ 120.000 millones anuales, con proyecciones de crecimiento de entre 10-20% anual, llegando a US\$ 150.000 millones en el 2015 (Bandaranayake y Almo, 2014).

Técnicas de ADN recombinante, como así también tecnología de hibridomas, son continuamente utilizadas con el objetivo de producir bioterapéuticos como:

- Formas recombinantes de una proteína natural, sin modificaciones (como hormonas de crecimiento humanas, citoquinas, factores de coagulación).
- Derivados de proteínas naturales, con modificaciones (muteínas, vacunas a base de VLPs, proteínas de fusión).
- Células como producto mismo (vacunas terapéuticas para cáncer).
- Vectores virales, plásmidos o siARN (*small interfering* ARNs) que portan información genética para ser utilizados en vacunas o terapia génica.
- Anticuerpos monoclonales terapéuticos.

En la figura 15 puede observarse una lista de los últimos 27 productos aprobados por la FDA (actualizado al año 2011), de los cuales 18 son proteínas recombinantes utilizando células, organismos o animales. De esa selección es notable observar como 12 de las mismas son producidas utilizando células de mamífero, lo que indica que este sistema de expresión es el dominante dentro de la lista.

Product	Year approved	Description	Manufacturer	Expression system	Indication
Fibroblasts, Autologous	2011	A formulation of autologous fibroblast skin-derived cells	Fibrocell science	Patient fibroblasts	Appearance of nasolabial fold wrinkles
Belatacept (CTLA-4-Ig Fusion)	2011	CTLA4-Ig Mutant	BMS	Mammalian	Prevention of acute rejection in adult kidney transplant patients
Yervoy (Ipilimumab)	2011	Anti-CTLA-4 MAb	BMS	Mammalian	Metastatic melanoma
Benlysta (Belimumab)	2011	Anti-Bly5 MAb	HGS	Mammalian	Systemic lupus erythematosus
Prolia (Denosumab)	2010	Anti-RANK Ligand MAb	Amgen	Mammalian	Osteoporosis
Pegloticase (Krytexca)	2010	Pegylated urate oxidase	Savient	<i>E. coli</i>	Chronic refractory gout
Victoza (Liraglutide)	2010	GLP-1 Analog	Novo Nordisk,	Yeast	Diabetes
Pancreaze (Pancrelipase)	2010	Pancreatic enzyme	J & J	Tissue Extraction	Exocrine Pancreatic insufficiency
Xeomin (Incobotulinumtoxin A)	2010	Botulinum toxin A	Merz	Bacteria	Cervical dystonia, blepharospasm
Vpriv (Velaglucerase)	2010	Human glucocerebrosidase	Shire	Mammalian	Gaucher Disease
Menveo (Meningitis Vaccine)	2010	Meningococcal Conjugate Vaccine (3)	Novartis	Bacteria (Corynebacterium)	Prevention of invasive meningococcal disease
Provenge (Prostate Cancer Cellular Vaccine)	2010	Prostatic Acid Phosphatase (PAP)—GM-CSF	Dendreon	Cancer cell	Metastatic prostate cancer
Xiaflex (Collagenase)	2010	Clostridial Collagenase for Injection	Auxilium	Bacteria (Clostridium histolyticum)	Dupuytren's Disease
Lumizyme (Aglucosidase alfa)	2010	Glucosidase alfa	Genzyme	Mammalian (CHO)	Pompe Disease
Prenar 13	2010	Pneumococcal 13-Valent Conjugate Vaccine	Wyeth	Bacteria (Corynebacterium)	Pneumoniae
Actemra (Tocilizumab)	2010	Anti-IL-6 Receptor MAb	Genentech	Mammalian	Systemic juvenile idiopathic arthritis
Cervarix MEDI 501	2009	Human Papilloma Virus (HPV) Vaccine Type 16 and 18 VLP	GSK	Baculovirus	Cervical cancer
Stelama (Ustekinumab)	2009	Anti-IL-12 and IL-23 MAb	Centocor/Johnson & Johnson	Mammalian	Plaque Psoriasis
Arzerra (Ofatumumab)	2009	Anti-CD20 MAb	Genmab	Mammalian	CLL (Chronic Lymphocytic Leukemia)
ATryn (rhATIII)	2009	Antithrombin III	GTC (Genzyme)	r Transgenic Goat	Blood clots
Simponi (Golimumab)	2009	TNF alpha human MAb	Centocor/Johnson & Johnson	Mammalian	Immune dysfunction-related arthritis
Ilaris (Canakinumab)	2009	Anti-IL-1 beta MAb	Novartis	Mammalian	Cryopyrin-associated periodic syndromes
Crtmzia (Certolizumab Pegol)	2008	TNF alpha Inhibitor (r humanized Fab covalently bond to ethylene glycol)	UCB	<i>E. coli</i>	Crohn's disease
Nplate (Romiplostim)	2008	Thrombopoietin Peptidbody, Fc Fusion	Amgen	<i>E. coli</i>	Chronic Immune Thrombocytopenic Purpura (ITP)
Arcalyst (rilonacept)	2008	Interleukin-1 trap	Regeneron	Mammalian (CHO)	CAPS and FCAS
Rotarix (Rotavirus Vaccine)	2008	Live attenuated oral vaccine	GSK	Virus	Rotavirus infection
Cinryze (C1 Inhibitor)	2008	C1 inhibitor derived from human plasma	Lev	Human plasma	Angioedema attacks in with hereditary angioedema

Figura 15. Nuevos productos biofarmacéuticos aprobados por la FDA. (actualizado hasta el año 2011, adaptado de Zhu, 2012).

Si se realiza el estudio económico, analizando los productos de mayor venta del mercado mundial (Fig. 16), el resultado obtenido es el mismo, con dos tercios de los ingresos provenientes de productos manufacturados utilizando células de mamífero (Darby, 2008).

Las figuras 15 y 16 no hacen más que expresar en números el hecho de que las células de mamífero son la plataforma de elección a la hora de producir proteínas recombinantes con complejas modificaciones postraduccionales, como lo son la mayoría de las utilizadas como bioterapéuticos. Además, grandes avances se han logrado en cuanto a la optimización de las condiciones de cultivo de estas células, como así también el desarrollo de nuevos medios de cultivos, haciendo que el proceso se vuelva altamente eficiente logrando aumentar los rendimientos, desde los miligramos por litro que se obtenían en un comienzo hasta las decenas gramos por litro producidos en la actualidad.

Desde la aprobación para su comercialización del activador tisular del plasminógeno humano, como producto recombinante producido en células de mamífero, las células CHO-K1 (*chinese hamster ovary*) han sido el caballo de

batalla para la producción de proteínas de interés terapéutico. Entre las principales características que las hacen una excelente plataforma celular se encuentran su capacidad de adaptarse fácilmente a crecer en suspensión, en altas densidades y utilizando medios libres de suero (Bandaranayake y Almo, 2014).

Product	Revenue US \$ (M)	Date approved	Manufacturer	Expression system	Indication
EPOs	10,794	1989	Amgen, Roche, J & J	Mammalian	Anemia
Insulins	10,132	1982	Eli Lilly, Novo Nordisk, Sanofi-Aventis	<i>E. coli</i>	Diabetes
IFNs	7455	1993	Schering-Plough, Roche, Biogen-Idec Bayer-Schering, Merck-Serono	<i>E. coli</i> and Yeast	Viral infection and cancer
Enbrel	5275	1998	Amgen, Wyeth	Mammalian	Rheumatoid arthritis
Remicade	4948	1998	J & J, Schering-Plough	Mammalian	Rheumatoid arthritis
Rituxan	4600	1997	IDEC, Genentech, Roche	Mammalian	NHL and CLL
Neupogen/Neulasta	4277	1998/2002	Amgen	<i>E. coli</i>	Myelosuppressive in chemotherapy
Clotting Factors	4168	1997	Novo Nordisk, Wyeth, Bayer, Baxter	Mammalian	Hemophilia episodes
Herceptin	4046	1998	Genentech and Roche (Trastuzumab)	Mammalian	Breast cancer
Lovenox	3605	2007	Sanofi-Aventis	N/A	Coronary artery disease
Avastin	3424	2004	Genentech and Roche (Bevacizumab)	Mammalian	Cancer
Humira	3000	2002	Abbott Laboratories (Adalimumab)	Mammalian	Rheumatoid arthritis
Growth Hormones	2545	1985	Pfizer, Novo Nordisk, Eli Lilly, Serono, Roche/Genentech	<i>E. coli</i>	Growth hormone deficiency
Prevnar/Prevenar	2439	2002	Wyeth	Bacterial	Prevention of invasive pneumococcal disease
Gardasil	1481	2006	Merck	Yeast	Prevention of vulvar and vaginal cancer
Erbix	1336	2004	Merck-Serono, BMS	Mammalian	Cancer
Lucentis	1219	2006	Genentech, Novartis (Ranibizumab)	<i>E. coli</i>	Macular degeneration
Synagis	1200	1998	Medimmune	Mammalian	Respiratory syncytial virus infection
Cerezyme	1144	1994	Genzyme	Mammalian	Gaucher Disease

**Figura 16. Productos biofarmacéuticos más vendidos en el mercado mundial.** (actualizado hasta 2007, adaptado de Zhu, 2012).

Desarrollada dos décadas después que las CHO-K1, la línea HEK293 (*human embryonic kidney*) fue la primera línea celular humana en ser transformada, utilizando fragmentos de ADN del serotipo Ad5 del adenovirus (Graham y col. 1977). Desde su establecimiento, las células HEK293 han sido ampliamente utilizadas para la producción de proteínas recombinantes. Aunque se puede encontrar una vasta bibliografía demostrando la expresión de diversas proteínas utilizando esta línea celular, hasta la actualidad un solo producto se encuentra aprobado para su comercialización (Xigris<sup>®</sup>, Eli Lilly and Company). Por otro lado, la mayor aplicación que se le ha dado a estas células es en la producción de vectores virales utilizados en vacunas y terapia génica, habiendo productos bajo evaluación, en fases clínicas II y III (Swiech y col., 2012).

Existen variantes de la línea establecida original, como lo son las 293N3S, desarrollada para crecer en suspensión en biorreactores o la 293S, adaptada para su crecimiento utilizando medios libres de suero. Otras variantes son las HEK293T, que expresan el antígeno T del virus SV40 y las 293-E, que expresan la proteína EBNA1 del virus Epstein-Barr. Utilizando estas líneas celulares se logra una prolongada expresión proteica luego de transfecciones

transientes, debido a la posibilidad de replicación episomal de los plásmidos transfectados (Hess y col., 2012; Bandaranayake y Almo, 2014).

### **3.2. Líneas celulares de mamífero establecidas utilizadas para la producción de VLPs y vacunas virales**

Las líneas celulares comúnmente utilizadas para la producción de vacunas se pueden dividir en dos grupos. Por un lado, líneas celulares convencionales como VERO (*african green monkey*), BHK-21 (*baby hamster kidney*) o MDCK (*Madin-Darby canine kidney*). Estas células crecen en adherencia y generalmente son cultivadas en frascos *Roller*, *Cell Factory* o utilizando *microcarriers*. Las células VERO fueron la primera línea celular de mamífero establecida, y hoy en día es una de las más aceptadas por las entidades regulatorias dado que vacunas de uso humano producidas en este tipo de células han sido utilizadas por más de treinta años. Las líneas celulares VERO y BHK-21 son el sustrato celular utilizado para la producción de vacuna antirrábica humana y veterinaria respectivamente, haciendo que estos tipos celulares cobren relevancia y sean evaluados en el presente trabajo (OMS, 1998; Kallel y col., 2003; Paillet y col., 2009). Por otro lado, existen otros grupo de células de propiedad registrada, utilizadas para la producción de vacunas, como las PER.C6<sup>®</sup> (Johnson & Johnson, Leiden), AGE1.CR<sup>®</sup> (ProBiogen) y EB14<sup>®</sup> (Vivalis) (Josefsberg y Buckland, 2012).

En las últimas décadas, algunas otras líneas celulares han sido utilizadas como plataforma para la producción de vacunas, entre ellas las células CHO-K1 y HEK293. Las células HEK293 han sido ampliamente utilizadas durante las últimas décadas para la producción de vectores virales para terapia génica y han sido propuestas como una nueva plataforma para la producción de vacunas virales (Hess y col. 2012; Le Ru y col. 2010; Petiot y col., 2015). Además, estas células han sido utilizadas para la producción de VLPs de diversos tipos de virus como son el dengue, influenza, el virus del ébola, paperas, el virus de la fiebre del Valle de Rift (*Rift Valley fever virus*), entre otros (Melito y col., 2008; Li y col., 2009; Roldão y col., 2010; Mandell y col., 2010; Walpita y col., 2011; Shang y col., 2012; Thompson y col., 2015). Por otro lado, su utilización como plataforma para la producción de proteínas

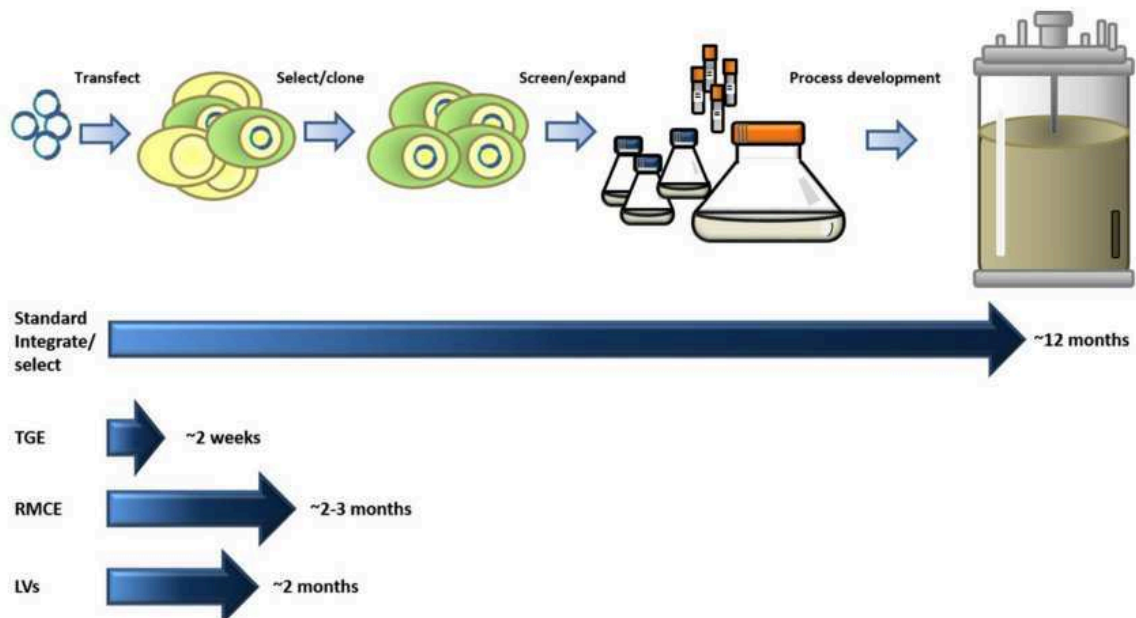
recombinantes con interés terapéutico es cada vez mayor (Swiech y col., 2012; Bandaranayake y Almo, 2014).

### 3.3. Transferencia de material genético y desarrollo de líneas celulares de mamífero

Las metodologías que utilizan la transfección y posterior selección han sido las históricamente utilizadas para el desarrollo de líneas celulares y posterior obtención de un clon productor de una proteína recombinante. Aunque exitoso, este método consume mucho tiempo, entre 4 y 6 meses, desde la transfección del material genético hasta la obtención de una línea productora (Bandaranayake y Almo, 2014).

En las últimas décadas ha habido un gran avance en el desarrollo de nuevas tecnologías aplicadas a la transferencia del material genético, reduciendo drásticamente los tiempos y aumentando la eficiencia global del proceso (Fig. 17).

Aunque las metodologías en desarrollo son numerosas y variadas, entre las mayormente utilizadas para la expresión de genes heterólogos en células de mamífero se encuentran:



**Figura 17. Línea de tiempo para el desarrollo de líneas celulares y posterior producción de un bioterapéutico.** Se comparan los tiempos requeridos para la metodología clásica de transfección/selección con nuevos sistemas de expresión. TGE: *transient gene expression*. RMCE: *Recombinase mediated cassette exchange*. LVs: *lentivirus driven integration* (adaptado de Bandaranayake y Almo, 2014).

### **3.3.1. Transfección transiente (TGE, *transient gene expression*)**

En esta estrategia, muy útil para acortar tiempos de producción, la selección clonal de las líneas celulares no es requerida. Las células son crecidas hasta la escala de producción deseada en la que se realiza una transfección transiente de las mismas. Para tal fin, se utilizan diversos agentes de transfección, siendo los polímeros de polietilenimina (PEI) uno de los más utilizados debido a su buena relación eficiencia/costo. Este último punto es de gran interés durante el diseño de un proceso basado en TGE ya que al aumentar la escala de producción aumentan las cantidades del reactivo de transfección requerido. Por otro lado, un punto a tener en cuenta al llevar a cabo una TGE es la gran cantidad de ADN que se necesita, como así también la calidad del mismo, factor crítico a la hora de producir proteínas para uso humano donde la posibilidad de presencia de contaminantes, como ser endotoxinas bacterianas, debe ser reducida al mínimo (Hacker y col., 2013; Almo y Love, 2014).

Utilizando este sistema de expresión los tiempos de cultivo promedio son de entre 10 y 14 días, ya que las células no logran sobrevivir más tiempo en las condiciones de cultivo, siendo esta una de las principales desventajas del TGE como sistema de expresión. Por otro lado, las células animales logran ser transfectadas con eficiencias aceptables hasta densidades celulares de hasta  $1 \times 10^6$  cél.ml<sup>-1</sup>, valor sobre el cual comienza a observarse una disminución clara en la productividad, efecto denominado “efecto de la densidad celular” (CDE, *cell density effect*), observado en infecciones virales y transfecciones transientes (Petiot y col., 2015). Este sistema de expresión se ha utilizado para producir gran cantidad de proteínas recombinantes, entre ellas vectores virales y VLPs como para su aplicación como candidatos vacunales (Mandell y col., 2010; Cervera y col., 2013; Mignaqui y col., 2013).

### **3.3.2. Intercambio de casete mediado por recombinasas (RMCE, *recombinase mediated cassette exchange*)**

La integración de ADN en el genoma de una célula es un evento generalmente aleatorio. Como resultado de los mismos las inserciones que se obtienen son, muchas veces, no productivas ya que solo aproximadamente el 0,1% del genoma es transcripcionalmente activo. La posibilidad de contar con una metodología que logre insertar un gen de interés en una región activa y

estable del genoma (generalmente sitios conocidos como “*hotspots*”) llevó al desarrollo del RMCE. Esta técnica fue aplicada para el desarrollo de líneas celulares estables productoras de proteínas recombinantes de interés farmacéutico (Wirth y col., 2007; Turan y col., 2011).

Para llevar a cabo esta metodología es necesaria la selección de un clon celular que posea un solo sitio de integración y cuyas características productivas sean interesantes. Generalmente, este proceso se lleva a cabo utilizando un gen reportero (como la GFP) flanqueado por secuencias target para enzimas como las *Flo* o *Cre* recombinasas. Una vez identificado el *hotspot* la secuencia codificante para el gen reportero es intercambiada por el gen de interés, generando de esta forma una línea celular productora. Aunque el avance de estas tecnologías es muy prometedor, hasta el momento solo se han logrado rendimientos moderados (Bandaranayake y Almo, 2014).

### 3.3.3. Delivery viral

Otra metodología que está siendo cada vez más utilizada para la transferencia del material genético durante la generación de líneas celulares productoras es la utilización de vectores virales recombinantes.

Algunos vectores retrovirales, especialmente los lentivirus (LVs) derivados del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (HIV-1), se han utilizado ampliamente durante muchos años como vectores para terapia génica, debido a su elevada capacidad de transducir células, tanto en división como quiescentes. Por supuesto que otros tipo de vectores virales han sido utilizados como herramienta para la transferencia de material genético, como lo son los adenovirus, herpesvirus, vectores adenoasociados, entre otros, pero la utilización de LVs posee la ventaja de que estos vectores insertan el transgen en el genoma del hospedador, característica fundamental a la hora de generar una línea celular estable. Además, las inserciones ocurren, de forma natural, en regiones transcripcionalmente activas del genoma obteniéndose así líneas celulares con alto nivel de expresión y muy estables en el tiempo (Bushman y col., 2005).

Se han utilizado LVs para la producción de proteínas recombinantes de secreción en células HEK293, como así también en células CHO-K1 sin la necesidad de selección de clones (Bandaranayake y col., 2011; Oberbek y col., 2011).

La elección del sistema de transferencia de material genético, como así también la línea celular que se utilizará como plataforma de producción, depende de muchos factores particulares y deberán ser evaluados según los requerimientos de cada caso.

### 3.4. Vectores lentivirales

En las últimas décadas, los sistemas de expresión basados en LVs han evolucionado con el objetivo de optimizar el ensamblado de la partícula lentiviral y aumentar su bioseguridad. Desde la primera generación de LVs utilizados en estudios de terapia génica hasta la actual tercera generación, se han ido removiendo genes accesorios y regulatorios dispensables para el ensamblado de la partícula, como así también se han ido separando las secuencias estructurales en distintos plásmidos, buscando disminuir al mínimo la probabilidad de recombinación y posible generación de un nuevo microorganismo (Delenda, 2004).

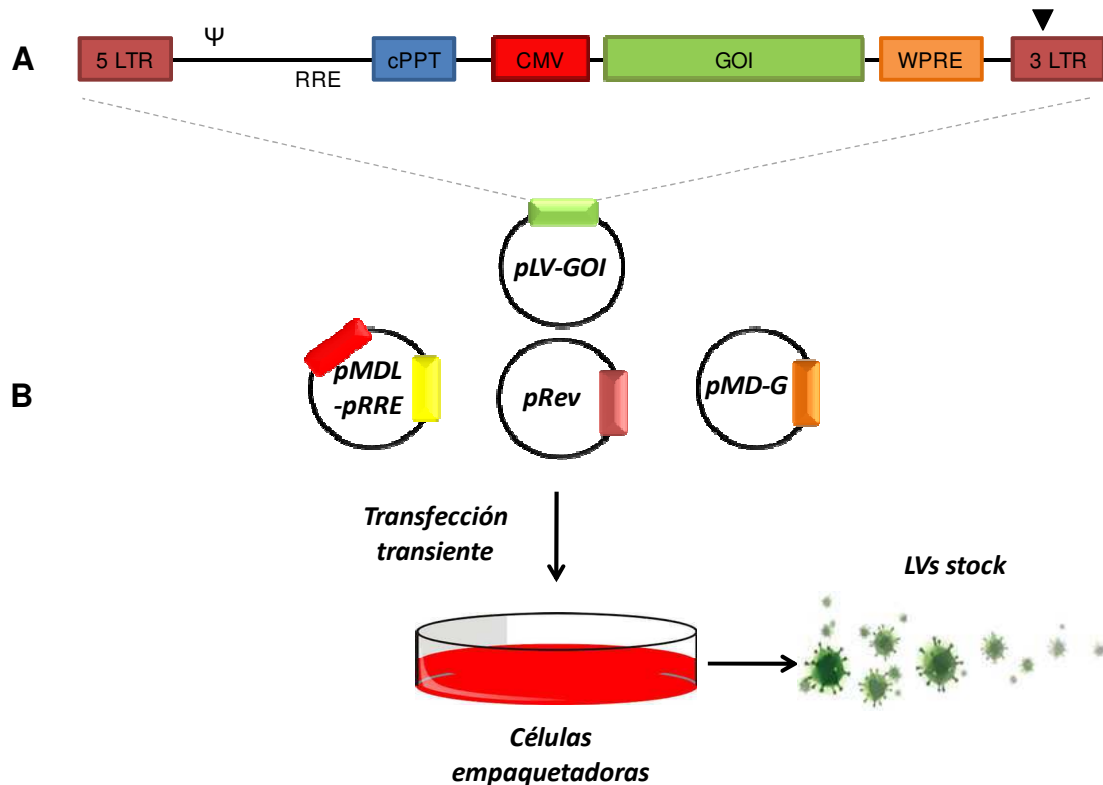
El sistema de LVs de tercera generación está conformado por dos partes principales: el vector de transferencia, el cual posee el transgen de interés, y el sistema de empaquetamiento (Fig. 18).

En el vector lentiviral, también denominado plásmido de transferencia, se encuentran todas las secuencias necesarias para la expresión del transgén de interés, como así también las secuencias *cis*-actuantes requeridas para el correcto ensamblado de la partícula lentiviral (Fig. 18-A). A continuación se detallan las regiones más importantes:

- ✓ **LTR (*long terminal repeats*):** son regiones ubicadas en cada uno de los extremos del ADN proviral, encargadas de actuar como promotores y/o *enhancer* de la transcripción del ARN lentiviral. La región 5´LTR fue modificada, intercambiando el promotor dependiente de *tat* original del HIV-1 por un promotor constitutivo del virus del sarcoma de Rous. La región 3´LTR fue mutada, con el objetivo de generar de esta forma un vector auto-inactivante (SIN, *self-inactivating vector*).
- ✓ **Psi ( $\psi$ ):** secuencia de empaquetamiento, requerida para la incorporación del ARN genómico a las partículas virales.



- ✓ **RRE (*Rev response element*)**: región que posee la secuencia requerida para la unión de la proteína Rev, la cual promueve la exportación del ARN del núcleo al citoplasma.



**Figura 18. Sistema de vectores lentivirales de tercera generación.** **A.** Detalle del vector lentiviral de transferencia el cual posee la secuencia del gen de interés (GOI) regulado bajo la actividad de un promotor viral (CMV), una secuencia de regulación postranscripcional (WPRE), una región rica en purinas (cPPT) como así también el resto de las secuencias *cis*-actuantes para el ensamblado de la partícula viral. LTR: *long terminal repeats*. RRE: *Rev response element*.  $\psi$ : región empaquetadora.  $\blacktriangledown$ : *self-inactivating mutation* (SIN). **B.** Ensamblado de vectores lentivirales por transfección transiente. (Adaptado de Pfeifer, 2010)

- ✓ **cPPT (*central polypurine tract*)**: región rica en purinas que promueve la retrotranscripción viral cuando las partículas lentivirales transducen una célula.
- ✓ **CMV**: promotor constitutivo del citomegalovirus. Este es uno de los promotores mayormente utilizados pero puede ser reemplazado por otros promotores para células eucariotas.
- ✓ **WPRE (*woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element*)**: región estabilizadora del ARN mensajero.

Por otro lado, se encuentran los vectores plasmídicos que portan las secuencias codificantes de las proteínas que serán expresadas *in trans* y son necesarias para que el ARN lentiviral sea ensamblado (Fig. 18-B). En el

sistema lentiviral de tercera generación los vectores utilizados son los siguientes:

- ✓ **pMDL/pRRE:** posee la secuencia codificante de la poliproteína de cápside (Gag) y la secuencia de la retrotranscriptasa viral (Pol).
- ✓ **pREV:** porta la secuencia de la proteína Rev, la cual posee la capacidad de unirse a las secuencias RRE, presentes tanto en pMDL/pRRE como en pLV, y promover su exportación desde el núcleo al citoplasma de la célula transducida.
- ✓ **pGlicoproteína:** este vector posee la secuencia codificante para la glicoproteína de envoltura necesaria para que la partícula sea capaz de transducir las células target. Generalmente, la proteína más utilizada, es la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV) codificada en el vector pMD.G, debido a su amplio tropismo celular y a su elevada estabilidad. Otras proteínas virales de membrana han sido utilizadas, siendo la glicoproteína G del virus de la rabia una de ellas (Mazarakis y col. 2001; Carpentier y col., 2012).

De esta forma, llevando a cabo una transfección transiente de los cuatro vectores lentivirales de tercera generación se producen LVs no replicativos que son obtenidos del sobrenadante de las células empaquetadoras (Fig. 18-B). Utilizando estos LVs para transducir células en cultivo se logran obtener líneas recombinantes con un alto nivel de expresión.

El diseño de genoma fragmentado que posee el sistema lentiviral sigue un simple principio que es evitar la formación de especies con capacidad de replicación (RCL, *replication competent lentivirus*). Para esto, todas las secuencias que codifican proteínas lentivirales fueron eliminadas del vector, mientras que todas las secuencias que son requeridas para un eficiente empaquetamiento fueron retenidas (Fig. 18-A). Sin embargo, una de las preocupaciones del uso de los LVs es la potencial generación de RCL ya que, aunque no se hayan reportado casos detectados, la posibilidad estadística existe (Delenda, 2004).

La generación de RCL puede ocurrir en la célula empaquetadora durante la producción de los LVs, por recombinación entre los vectores codificantes de la proteína de envoltura (VSV-G), las proteínas

empaquetadoras (Gag/Pol) y el vector de transferencia con el transgen, o luego de la introducción del vector a la célula target con elementos retrovirales endógenos.

De acuerdo con la Agencia Médica Europea (EMA: *European Medicines Agency*) y el Comité de Productos Medicinales para Uso Humano (CHMP: *Committee for Medicinal Products for Human Use*), se redactaron documentos que describen como testear RCL en productos retrovirales para las terapias génicas en humanos. Estos comprenden guías sobre el desarrollo y manufactura de vectores lentivirales, y guías suplementarias aportadas por la FDA. Los métodos más comunes para la determinación de RCL son PCR, ELISA para la proteína Gag (p24) y ensayos de genes reporteros (FDA, 2006; Cornetta y col., 2009).

### **3.5. Producción de vacunas virales en células animales cultivadas en biorreactor**

Al momento de pensar en la producción de vacunas virales utilizando células animales, muchos son los factores a tener en cuenta, entre los cuales el sistema de cultivo a utilizar durante la producción es uno de principal importancia. La elección de uno u otro dependerá tanto de los objetivos a cumplir (productividad, calidad del producto, tipo de antígeno a producir, entre otros), como de la disponibilidad y la posibilidad de utilizar dichas tecnologías de cultivo con el sistema de expresión que se posea.

Si se utilizan células en adherencia, diversos soportes están disponibles en el mercado, como son los frascos *Roller*, o sistemas *multilayer* como *Cell Factory* (Nunc), *CellSTACK* (Corning), *CellCube* (Corning), entre otros. Por otro lado, la producción de vacunas virales utilizando biorreactores como sistema de producción ha sido ampliamente estudiada, habiendo diversas formas de operarlos y llevar a cabo la producción del antígeno que forma parte de la vacuna. Esto puede hacerse en cultivos adherentes agitados, utilizando *microcarriers*, o en biorreactores de lecho empaquetado, como por ejemplo los *iCells* (PALL), utilizando también líneas celulares adherentes. La producción de vacunas virales puede llevarse a cabo, también, utilizando células en suspensión, cultivadas en biorreactores tanque agitados, pudiendo aumentar drásticamente los volúmenes de trabajo y de esa forma la capacidad de

producción. El modo de cultivo puede ser *batch*, *fed-batch* o en modo continuo (Gallo-Ramírez y col., 2015).

Cabe destacar que la producción de virus, utilizando cultivos celulares como sustrato de crecimiento, posee dos etapas. En la primera, las células crecen hasta llevar a la densidad celular requerida, y en la segunda se infecta dichas células, para obtener la progenie viral que es el producto buscado. En estos casos, la utilización de sistemas continuos de producción, aunque no imposible, son muy difíciles de llevar a cabo. Esto es así ya que en la mayoría de los casos la producción de virus genera la lisis de la célula productora, dándole al proceso de producción un tiempo acotado por el proceso mismo. Por otro lado, los sistemas continuos son ampliamente utilizados para producción de proteínas recombinantes, más aún en la actualidad donde nuevas tecnologías dan la posibilidad de llegar a altísimas densidades celulares con elevada productividad y prolongada en el tiempo (Warikoo y col., 2012; Croughan y col., 2015). Por lo tanto, poder desarrollar una tecnología que, utilizando células animales recombinantes, produzca de forma continua el antígeno viral en forma de VLP tendría un valor agregado extra para el proceso de producción de la vacuna en cuestión.

# **RABIA**

#### 4. RABIA

La rabia es una zoonosis viral con una mortalidad cercana al 100%, en la cual una numerosa cantidad de animales carnívoros y diversas especies de murciélagos sirven como reservorio natural, pudiendo ser el hombre un huésped accidental. La fuente de infección más importante es la saliva de los animales infectados, aunque puede también aislarse de lágrimas y aspirados bronquiales. El contagio se produce, en la mayoría de los casos, por la mordedura de un animal infectado (Basualdo y col., 1996).

En el ser humano, el período de incubación habitual es de 20 a 40 días, pudiendo variar entre menos de una semana hasta más de un año, pero la evolución hacia la muerte es rápida, entre una y dos semanas. El tiempo que transcurre entre la infección y el inicio de los síntomas depende de la cantidad de virus inoculado y el grado de inervación de la zona. En un comienzo se creía que la cercanía del sistema nervioso central (SNC) a la zona de la mordedura era una causa más para justificar los tiempos de incubación, pero nuevos estudios han revelado que esto no es así y que otros mecanismos podrían ser los responsables. Entre ellos se encuentran mecanismos de silenciamiento por ARN de interferencia endógenos o micro ARN (miARN) que disminuyen la replicación del virus en el músculo (Basualdo y col., 1996; Ministerio de Salud, Argentina, 2015; Hemachudha y col., 2013).

Durante esta fase de incubación, el virus se replica en el tejido muscular del sitio de entrada. Luego, siguiendo el trayecto de los nervios periféricos que inervan la región, avanzan en forma centrípeta hacia el SNC a una velocidad de 3 mm por hora. El virus se introduce en el citoplasma de las neuronas y comienza a replicarse para luego iniciar una diseminación centrífuga. En el mismo momento, alcanza las glándulas salivales y se multiplica en las células secretoras eliminándose por saliva antes que aparezca la sintomatología (Fig. 19) (Jackson, 2013).

Los síntomas iniciales de la rabia son fiebre suave y dolor o parálisis en el sitio de la mordedura. Una vez que el virus se esparció por todo el sistema nervioso, se desarrolla una progresiva encefalitis caracterizada por hidrofobia, aerofobia, convulsiones generales y paro cardiorrespiratorio. En general, todo caso de rabia termina con la muerte del infectado.

La respuesta inmune es ineficiente y no logra evitar la propagación del virus. Esto es debido a que su forma de progresar en el espacio paraneural permite al virus llegar a las neuronas y entrar en las mismas sin que se activen en forma eficiente los mecanismos humorales o celulares de defensa. Por otro lado, se ha demostrado que las DCs son ineficientemente activadas por el virus “calle” que es el que comúnmente se encuentra en infecciones naturales. Recién cuando se presentan los síntomas o poco tiempo antes de ello, aparecen anticuerpos en sangre (Johnson y col., 2010; Hemachudha y col., 2013).

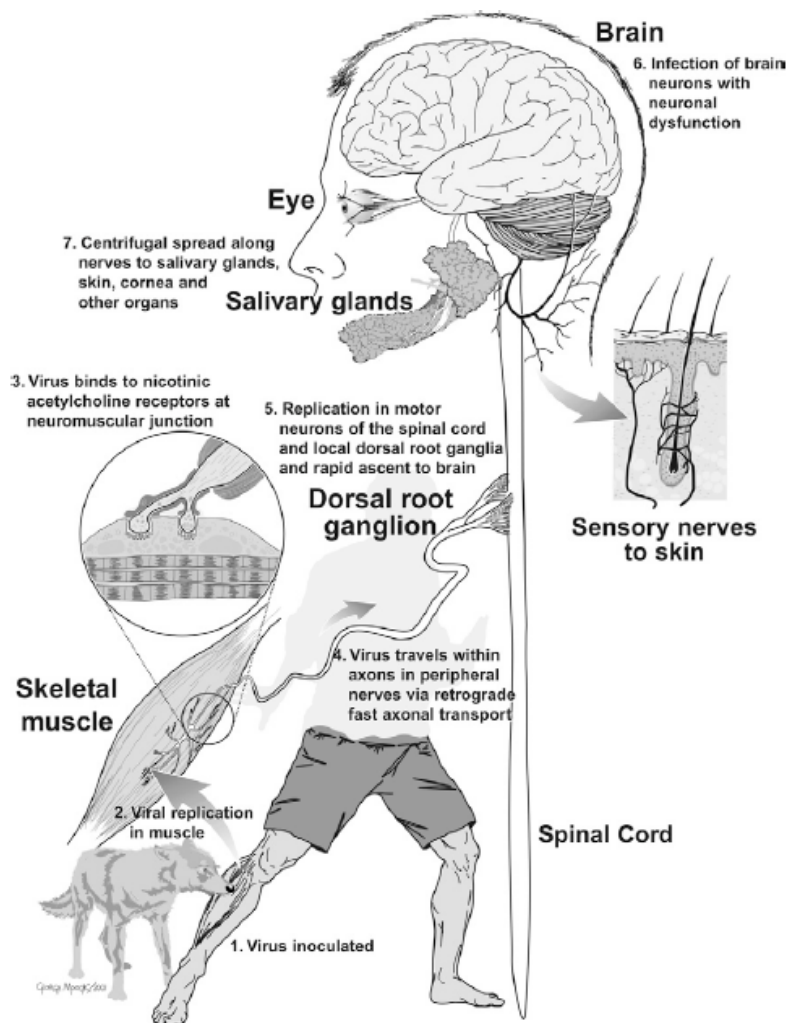


Figura 19. Patogénesis del virus de la rabia luego de una mordedura de un animal infectado (adaptado de Jackson, 2013).

#### 4.1. Agente etiológico

El agente causal de esta enfermedad es el virus de la rabia, el cual pertenece a la familia *Rhabdoviridae*, y dentro de esta al género *Lyssavirus*.

Desde los estudios de Luis Pasteur (Carballal y Oubiña, 1998), las cepas de virus rábico se han clasificado por sus características en:

**Virus calle:** virus aislados de los casos clínicos naturales. Su nombre deriva de su aislamiento de animales rabiosos de la calle y su tiempo de incubación variable. Se elimina por saliva de individuos rabiosos y posee alta patogenicidad por vía intramuscular.

**Virus fijo:** es un virus aislado por Pasteur, a través de pasajes intracerebrales sucesivos del virus calle en animales de laboratorio. Su tiempo de incubación es más o menos constante, de 5 a 7 días, no se elimina por glándulas salivales y posee una patogenicidad reducida por vía intramuscular pero muy alta por vía intracerebral.

El empleo de un panel de anticuerpos monoclonales desarrollados por los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos ha permitido la identificación en nuestro país de 5 variantes (V), cuyos reservorios son el perro (V1 y V2), el murciélago hematófago *Desmodus rotundus* (V3) y los murciélagos insectívoros *Tadarida brasiliensis* y *Lasiurus cinereus* (V4 y V6, respectivamente) (Gury-Dohmen y col., 2009).

### 4.2. Epidemiología

Más de 3.300 millones de personas viven en regiones donde la rabia es endémica y más de 55.000 mueren anualmente de rabia, aunque se cree que este valor está subestimado por falta de información en zonas subdesarrolladas del planeta (OMS, 2007; OMS, 2013). Alrededor del 98% de los casos mundiales de rabia ocurren en zonas donde vive gran cantidad de perros, tanto domésticos como callejeros. Con algunas excepciones, la rabia se encuentra presente en todos los países del mundo.

Desde un punto de vista epidemiológico se consideran tres tipos de rabia, que constituyen problemas sanitarios muy diferentes entre sí. Estos son la rabia urbana, la rabia silvestre y la rabia pareasiente (Basualdo y col., 1996).

**Rabia urbana:** es la que ocurre en las ciudades o grandes conglomerados de población. En ella los principales transmisores de la enfermedad son los perros, por su abundancia y hábitos sociales, y en un porcentaje mucho menor los gatos, que son más escasos y de hábitos más

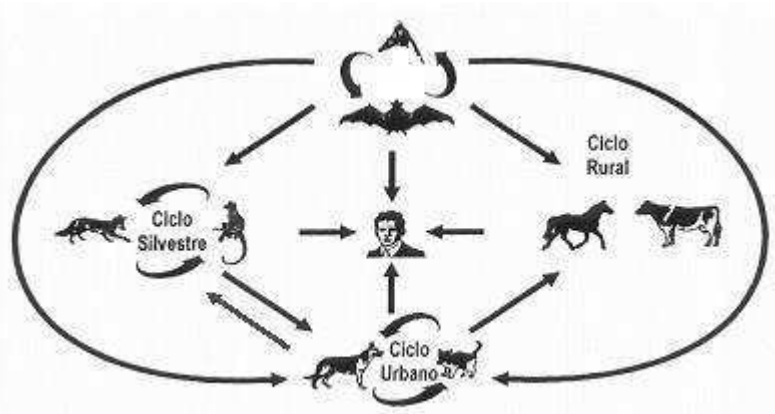


solitarios. Es en la rabia urbana en la que el hombre está más expuesto por convivencia.

**Rabia silvestre:** es la que ocurre en las zonas rurales, selvas y bosques, y en la cual los transmisores son animales silvestres como zorros, zorrinos, mapaches y lobos. La rabia en murciélagos no hematófagos se agrupa dentro de este ciclo. La exposición humana es mucho menor en este caso que en la rabia urbana.

**Rabia pareasiente:** es aquella en la que los transmisores son murciélagos hematófagos, los cuales al alimentarse de sangre muerden principalmente al ganado bovino, en menor grado al equino y muy raramente al hombre. El control de la rabia pareasiente es muy importante ya que grandes pérdidas económicas pueden generarse por un brote (Shwiff y col., 2013).

Si bien son ciclos independientes y con reservorios específicos, puede haber enlaces entre ellos, con la consiguiente transmisión del virus desde una especie a otra y accidentalmente al hombre. La característica de esta transmisión entre especies es que no se perpetúa y no origina brotes epidémicos (Fig. 20).



**Figura 20. Ciclos biológicos del virus de la rabia.** Silvestre, urbano y rural (rabia pareasiente). Son reservorios independientes del virus, pero de todos el hombre puede ser huésped accidental (adaptado de Basualdo y col., 1996).

### 4.3. Situación de la rabia en la Argentina

#### 4.3.1. Evolución histórica

En la década del sesenta la República Argentina presentaba una compleja situación con doce provincias con transmisión de rabia canina. Es en el año 1976 cuando la enfermedad adquiere mayor magnitud y gravedad con 19 casos de rabia humana y 5.573 casos de rabia animal. A raíz de tal

situación, se fortalece el Programa de Control de Rabia tomando medidas de intervención basadas en vacunación masiva de animales, eliminación de reservorios sin dueño, vigilancia epidemiológica y educación para la promoción de la salud. Esto se ve reflejado en la Ley N° 22.953 que declara de interés nacional, en todo el territorio de la República, la lucha antirrábica, y se detalla en el Manual de Normas y Procedimiento para la Vigilancia, Prevención y Control de la Rabia del Ministerio de Salud de la Nación (Ministerio de Salud, Argentina, 2015).

Se logró entonces reducir en el período 1988-1997 a tres las provincias afectadas, presentando ya para el período 1998-2006 brotes solamente en las provincias de Jujuy y Salta (Fig. 21). Desde esa fecha hasta la actualidad la situación es similar, presentándose casos de rabia canina, bovina y, principalmente, en murciélagos sobre todo en las provincias del norte de argentina (Cisterna, 2015).



**Figura 21. Evolución histórica de la rabia canina en Argentina.** (período 1960-2006, fuente: Departamento de Zoonosis y Vectores. Ministerio de Salud de la Nación, 2008).

#### 4.3.2. Rabia humana

En la República Argentina, el último caso de rabia humana transmitida por perro se había registrado en 1994 en la provincia de Tucumán, pero en el año 2008 se notificó otro caso en la provincia de Jujuy, en un niño de 8 años. El mismo había sido atendido en el mes de abril en un servicio de salud por causa de una herida por mordedura de perro en la vía pública, recibiendo curaciones

básicas, antibióticos y vacuna antitetánica, pero no vacunación antirrábica. En el mes de julio del mismo año, ingresó al Hospital de Niños con cuadro de encefalitis y a los pocos días de internación, falleció. Más tarde fue confirmada rabia como causa de muerte (Gury-Dohmen y col., 2009).

En el año 1997 se notificó un caso de rabia humana por la variante vampiro (*Desmodus rotundus*) en la provincia de Chaco, y en la provincia de Corrientes en el año 2001 se registró el último caso humano debido a un accidente por mordedura de vampiro (Ministerio de Salud, Argentina, 2008). Si bien el ciclo urbano (perro y gato) juega un rol fundamental en la posibilidad de casos de rabia en el hombre, por su convivencia con estos animales domésticos, no hay que descuidar la vigilancia del ciclo salvaje, como por ejemplo a los murciélagos insectívoros, que pueden infectar accidentalmente a animales domésticos y también al hombre.

#### **4.4. Prevención y tratamiento**

Las medidas de prevención luego de una posible exposición al virus de la rabia incluyen a su vez intervenciones dirigidas a la atención de la persona mordida y al animal agresor. En el caso de una mordedura, se debe realizar el lavado de la herida con agua y jabón, sin cepillar y luego colocar un antiséptico como yodo povidona, alcohol iodado o clorhexidina. Inmediatamente evaluar la necesidad de tratamiento específico con vacuna antirrábica y de ser necesario gammaglobulina, de acuerdo a las características de la herida (localización, profundidad, extensión y número de heridas) (Jackson, 2011).

Por otro lado, también es necesaria la atención del animal agresor. En el caso de canes y felinos, si fueran asintomáticos en el momento de la agresión, es importante que sean mantenidos en observación durante 10 días. Estos animales pueden variar su período de incubación desde días a años, pero en general el promedio es de 60 días. No obstante, la excreción del virus por saliva aparece de 2 a 5 días antes de los síntomas y persiste hasta su muerte. Por esto, el animal debe ser observado no menos de 10 días, considerando que si en el transcurso de ese período permanece vivo y asintomático no existe riesgo de transmisión de rabia y la persona agredida no debe ser vacunada. En el caso de que por la gravedad de las heridas se haya iniciado el tratamiento, éste debe suspenderse. Si el animal muere durante la observación, debe ser

analizado para confirmar o descartar el diagnóstico de rabia e iniciar, en caso positivo, el tratamiento de la persona agredida.

Una situación muy habitual es que el animal agresor no se pueda localizar, por ejemplo cuando se trata de perros callejeros. En ese caso, se asume como animal rabioso y se inicia la vacunación inmediatamente. Diferente es la situación para animales silvestres (zorros, monos, murciélagos), ya que en ellos el comportamiento de la enfermedad (síntomas, incubación) no ha sido estudiado. En este caso no se realiza la observación del animal y la conducta a seguir es el sacrificio y análisis de laboratorio. Mientras se esperan los resultados, se inicia el tratamiento.

Como se mencionó anteriormente, la rabia es una enfermedad para la cual hasta la actualidad no existe tratamiento curativo efectivo. Dejando de lado muy pocas excepciones, las personas que llegan a presentar síntomas clínicos de la enfermedad inevitablemente mueren. Es por esto que el tratamiento consiste en la vacunación post-exposición, la cual se lleva a cabo en personas que hayan tenido contacto con el virus rábico, ya sea a través de un animal enfermo o accidente de laboratorio (CDC, 2008; Jackson, 2011; Yousaf y col., 2012).

En el caso de grupos de alto riesgo, tales como personal de laboratorio, servicios antirrábicos, programas de control de rabia animal, veterinarios y guardaparques, se debe realizar una profilaxis pre-exposición. En estos casos el esquema de inmunización es diferente al tratamiento post-exposición (Tabla 1).

**Tabla 1.** Esquemas de vacunación para tratamientos pre y post-exposición, utilizando vacunas producidas en cultivo celular (adaptado de Warrel, 2012).

TRATAMIENTO PRE-EXPOSICIÓN					
<b>Dosis</b>	1°	2°	3°	4° (boost)	
<b>Días</b>	1	7	28	30	
TRATAMIENTO POST-EXPOSICIÓN					
<b>Dosis</b>	1°	2°	3°	4°	5°
<b>Días</b>	1	3	7	14	28

Otro tema de vital importancia en la propagación y contagio de la enfermedad es la estrecha relación que existe entre el número de casos de

rabia canina y los resultantes en el hombre. Estudios demuestran que con un 70% de cobertura en la vacunación de perros de compañía se lograría reducir significativamente la probabilidad de un posible brote de rabia canina y por consiguiente la transmisión al ser humano (Davlin y VonVille, 2012). Es por esto que es obligatoria en nuestro país la vacunación anual contra la rabia de perros domésticos y por lo cual se llevan a cabo programas gratuitos de vacunación masiva de perros de la calle, por parte de los gobiernos, tanto municipales como provinciales. Aunque bien intencionadas, generalmente estas intervenciones estatales no se llevan a cabo de forma planeada y constante, haciendo que sus resultados no sean significativos a largo plazo, más teniendo en cuenta que la revacunación de perros es anual.

Todo lo dicho recalca la necesidad de una producción constante y continua de vacunas antirrábicas, tanto veterinaria como de uso humano, ya que su administración a animales domésticos es indispensable para controlar la propagación del virus y, por otro lado, es el único tratamiento efectivo hasta la actualidad para el ser humano.

### **4.5. Vacuna antirrábica**

Las vacunas para rabia disponibles en el mercado, tanto para seres humanos como para animales, son en su gran mayoría a virus inactivado, utilizando algunas de las cepas de virus fijo como la Pitman Moore (PM) o la cepa Pasteur (PV). Existen dos tipos de vacunas, según la plataforma utilizada para producirla:

#### **4.5.1. Vacuna producida en tejido nervioso**

Esta fue la primera vacuna antirrábica disponible, desarrollada por Luis Pasteur hacia finales de 1800 siendo así la rabia la tercer enfermedad para la cual se obtuvo una vacuna (Briggs, 2012; Hicks y col., 2012). En esta primera vacuna se inyectaban suspensiones inactivadas de virus de la rabia producido en cerebro de conejo adulto. En 1955, los doctores Fuenzalida y Palacios realizaron considerables mejoras en la vacuna, produciendo el virus en cerebro de ratón lactante (CRL), reduciendo así los efectos adversos generados por la mielina presente en el tejido nervioso de animales adultos.

La vacuna se administra por vía subcutánea, preferentemente en zonas glúteas altas o región deltoidea y, si bien en general es bien tolerada, pueden manifestarse efectos adversos como prurito, dolor e induración en la zona de inoculación. En raros casos se han reportado complicaciones, como síndrome de Guillain-Barré, parálisis ascendente de Landry y encefalitis desmielinizantes. Por otro lado, la potencia que poseen estas vacunas es baja por lo cual se necesitan una gran cantidad de dosis para generar protección.

Aunque esta vacuna es aún utilizada en países en desarrollo, entre los que figura la Argentina, sobre todo en campañas para la vacunación masiva de animales, la Organización Mundial de la Salud recomienda fuertemente su reemplazo por vacunas producidas en cultivos celulares (OMS, 2007).

### **4.5.2. Vacunas producidas en cultivo celular**

En la actualidad, la gran mayoría de las vacunas comerciales son producidas en cultivos celulares, utilizando varios tipos de células animales siendo las más utilizadas las BHK-21 y VERO. Este tipo de vacunas están basadas en virus purificado de sobrenadante de cultivo, concentrado por ultracentrifugación e inactivado. Son más inocuas que la CRL y poseen mayor potencia. En la tabla 1 se presenta los esquemas de vacunación utilizando este tipo de vacunas.

La vacuna comercial para uso humano mayormente utilizada a nivel mundial es la Verorab producida por la empresa Sanofi-Pasteur, la cual utiliza células VERO para la producción de virus rábico cepa PM (Frazatti-Gallina y col., 2004; Toovey, 2007). Para las vacunas antirrábicas veterinarias existe una variedad de ofertas siendo las vacunas inactivadas producidas en células BHK-21 las mayormente utilizadas (Kallel y col., 2002; Kallel y col., 2003; Yang y col., 2013). Luego de ser producido e inactivado, al preparado vacunal se le agrega un adyuvante, siendo el hidróxido de aluminio el más utilizado.

Para la producción de las vacunas antirrábicas hoy disponibles en el mercado es necesaria la producción del virus de la rabia activo, lo que conlleva varios puntos a tener en cuenta. Por un lado, la necesidad de inactivación del virus, generalmente por medios físicos (UV) o químicos (beta-propiolactona o acetiltilamina), genera un efecto deletéreo sobre las proteínas virales disminuyendo así la antigenicidad del preparado vacunal haciendo que la

cantidad de virus necesario para llegar a la potencia requerida sea mayor. Por otro lado, para la producción de virus de la rabia son requeridos altos niveles de contención ya que se trata de un virus con una letalidad cercana al 100%, generando altos costos estructurales de producción.

Bourhy y col. describen cómo, luego de más de 100 años de disponibilidad de vacunas efectivas, la rabia sigue siendo una enfermedad a la cual se la ha descuidado, aumentando cada año el número de casos de rabia humana, sobre todo en países en desarrollo. Entre las causas probables se encuentra la falta de una vigilancia epidemiológica con la cual obtener datos que logren un abordaje racional de las políticas a llevar a cabo para palear el avance esta enfermedad, pero también debido al elevado costo del tratamiento post-exposición en humanos (Bourhy y col., 2010). Esta situación genera la necesidad de desarrollar vacunas de nueva generación, de bajo costo y efectivas, utilizando un menor número de dosis.

#### **4.6. Desarrollo de nuevos candidatos vacunales para rabia**

En las últimas décadas numerosos intentos de desarrollar nuevas vacunas antirrábicas han sido llevado a cabo (Ertl, 2009; Hicks y col., 2012; Yang y col., 2013), utilizando diversas tecnologías entre las que se encuentran:

##### **4.6.1. Vacunas atenuadas**

Estudios llevados a cabo para atenuar el virus de la rabia han demostrado que la modificación más importante para reducir la patogenicidad del mismo es el reemplazo del codón 333, correspondiente a una arginina, en la secuencia de la glicoproteína viral (Tuffereau y col. 1989). Cepas virales atenuadas para las cuales se comprobó eficacia, como la SAD (Street-Alabama-Dufferin), Flury y ERA (Evelyn-Rokitnicki-Abelseth), han sido aplicadas como vacuna para la rabia silvestre en norteamérica y Asia, y como vacuna veterinaria en Canadá y Corea a fines de los años 70. En 2004 la OMS dejó de recomendar la utilización de este tipo de vacunas atenuadas debido a su menor estabilidad térmica y mayores riesgos de aplicación.

#### **4.6.2. Vacunas a subunidades proteicas**

Un gran número de grupos ha intentado desarrollar candidatos vacunales utilizando como inmunógeno solo la glicoproteína G del virus, antígeno de mayor importancia y hacia el cual están dirigidos los anticuerpos neutralizantes (Burger y col., 1991; Tomar y col., 2011; Patiño y col., 2014; Koraka y col., 2014). Tanto purificada del mismo virus o expresada de forma recombinante en levaduras o células de insecto, estos intentos no lograron colmar las expectativas de protección. Cabe destacar que la glicoproteína G no se encuentra de forma monomérica sino formando trímeros sobre la superficie del virión. Estudios revelaron que gran parte de los epitopes para los cuales los anticuerpos neutralizantes poseen afinidad se encuentran formando parte de las yuxtaposiciones de los monómeros haciendo que, cuando se utiliza como inmunógeno la proteína de forma soluble, la respuesta inmune inducida sea ineficiente para generar protección (Ertl, 2009).

#### **4.6.3. Vacunas a ADN**

La glicoproteína G también fue utilizada numerosas veces para generar vacunas a ADN, clonando su secuencia codificante en vectores plasmídicos que son inyectados a animales de experimentación. Las respuestas inmunes generadas, utilizando diversas rutas de inoculación, fueron muy bajas en el corto plazo, debido a que el gen debe ser primero expresado en la célula hospedadora (transcripción y luego traducción), demorando inevitablemente la respuesta inmune. Esto pone en tela de duda si este tipo de vacunas puede ser utilizado para tratamientos post-exposición, donde una respuesta inmune eficiente pero sobre todo rápida es requerida para frenar el avance del virus hacia el SNC (Saxena y col., 2008; Kaur y col, 2010).

#### **4.6.4. Vacunas utilizando vectores virales**

Vectores virales portando el gen de la glicoproteína G han sido estudiados como base para el desarrollo de una vacuna antirrábica (Benmaamara y col., 2009; Tan y col., 2010; Shen y col., 2010). Se han evaluado distintos tipo de virus recombinantes (adenovirus, poxvirus, herpesvirus, virus adeno-asociados y otros virus de origen animal) con resultados variados. Aunque eficientes para generar una respuesta inmune robusta, la presencia de anticuerpos neutralizantes endógenos contra estos



virus en el ser humano reducen drásticamente la respuesta inmune que puede ser inducida. Algunos desarrollos utilizando vectores virales como vacunas antirrábicas han sido aprobados para su comercialización, pero solo para rabia silvestre, mayormente en Norteamérica.

### **4.6.5. Vacunas producidas en plantas**

Con el objetivo de desarrollar una vacuna antirrábica oral, se han llevado a cabo estudios de expresión de la glicoproteína G en plantas (tomate, tabaco, espinaca y maíz) (Tiwari y col, 2009; Loza-Rubio y col., 2012). Aunque la proteína expresada posee un buen nivel de glicosilación y la respuesta inmune inducida genera protección en ratones, restan resolver diversos desafíos a la hora de proponer a las plantas como plataforma para la producción de vacunas. Entre ellos se encuentran los variables rendimientos obtenidos entre generaciones, la reducción de los tiempos necesarios para la obtención del inmunógeno y, por supuesto, la posibilidad de ser aprobadas por las entidades regulatorias.

Como ya se mencionó, la rabia es inevitablemente mortal si no se aplica el único tratamiento disponible, la vacunación. Por otro lado, la vacunación de animales, sobre todo de perros de compañía, es crucial a la hora de disminuir la probabilidad de infección en el hombre. Dejando de lado algunos casos de vacunas para la rabia silvestre que fueron aprobados y están comercialmente disponibles, los demás desarrollos comentados no fueron debidamente evaluados en ensayos clínicos ni comparados con las vacunas antirrábicas actuales. Resulta necesario, entonces, el desarrollo de una nueva vacuna para la rabia, utilizando nuevas tecnologías, sin la utilización del virus de la rabia activo, haciendo el proceso y el producto mismo más seguro.

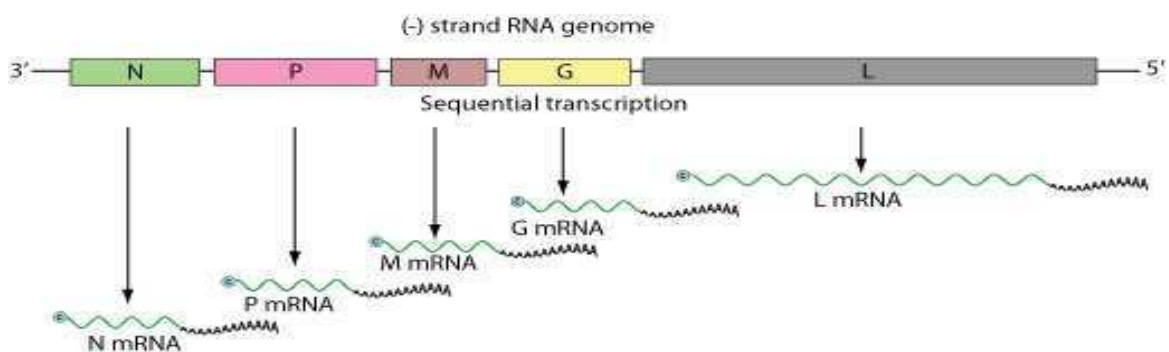
# VIRUS DE LA RABIA

## 5. VIRUS DE LA RABIA

El virus de la rabia pertenece a la familia de los *Rhabdoviridae*, y dentro de ésta al género *Lyssavirus*. Éste es un virus envuelto, que posee una estructura en forma de bala, con un extremo redondeado y otro plano. Todos los virus de la familia *Rhabdoviridae* tienen un tamaño aproximado de 180 nm de largo y 80 nm de ancho. Su genoma está constituido por ARN simple cadena (ARNsc) polaridad negativa no segmentado, posee un tamaño de 11-12 kpb (kilo pares de bases) y codifica para 5 proteínas (Fig. 22).

Tres de estas proteínas forman la nucleocápside del virus (N, nucleoproteína; P, fosfoproteína y L, ARN polimerasa ARN dependiente), la cual a su vez está rodeada por una membrana fosfolipídica que posee gran cantidad de copias de otra proteína viral que es la glicoproteína G. La proteína M es conocida como proteína de matriz y está descrito que interacciona tanto con la nucleocápside como con la envoltura lipídica (Harty y col., 1998; Yousaf y col., 2012).

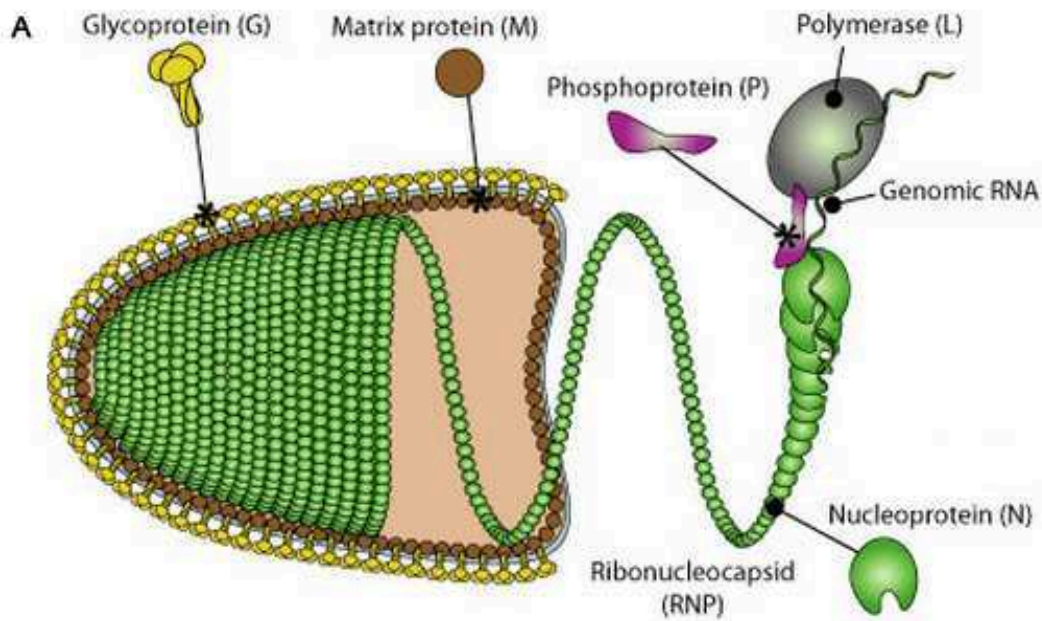
El material genético del virus está envuelto de forma helicoidal por aproximadamente 1.200 copias de la proteína N o nucleoproteína (Knipe y Howley, 2007). Ésta posee un tamaño de entre 55-62 kDa y está compuesta por 450 aminoácidos. El ARN junto con esta proteína y varias copias de P y L forman la ribonucleoproteína (RNP), complejo activo que controla tanto la transcripción como la replicación del genoma viral (Fig. 23-A).



**Figura 22. Esquema del genoma del virus de la rabia.** N: nucleoproteína. P: fosfoproteína. M: proteína de matriz. G: glicoproteína G. L: ARN polimerasa (adaptado de [www.viralzone.expasy.org](http://www.viralzone.expasy.org)).

En los viriones, la RNP está rodeada por aproximadamente 1.800 copias de la proteína de matriz, la cual condensa la nucleocápside, formando un complejo RNP-proteína M, muchas veces llamado “esqueleto” del virus, ya que es esta estructura la que le da al virus su forma característica (Fig. 23-B). La

proteína M es la más pequeña (22-25 kDa) y está formada por una sola cadena polipeptídica de 200 aminoácidos que no presenta fosforilaciones ni glicosilaciones, pero posee una región central con prevalencia de residuos hidrofóbicos que sugiere una importante capacidad para unirse a membranas. Esta proteína interacciona también con el dominio intracitoplasmático de la glicoproteína G de membrana, formando un enlace entre la nucleocápside del virión y la envoltura lipídica (Mebatsion y col., 1998).



**Figura 23. Virus de la rabia.** A. Representación esquemática de una partícula viral. B. Morfología del virus observado al microscopio electrónico de transmisión. (adaptado de [www.viralzone.expasy.org](http://www.viralzone.expasy.org)).

### 5.1. Glicoproteína G

La envoltura del virus está formada por una bicapa fosfolipídica en la cual se encuentran insertadas gran cantidad de copias de la glicoproteína G, acomodándose en forma de trímeros, que se proyectan sobre la superficie viral como espículas de 10 nm de longitud (Fig. 23). Esta proteína está constituida por 505 aminoácidos y posee un peso molecular entre 62 y 67 kDa (Gaudin y col., 1992; Gaudin y col., 2002). Se encuentra anclada a la membrana a través de un dominio hidrofóbico de 20 aminoácidos cercanos al extremo carboxilo terminal, el cual está seguido por el dominio intracitoplasmático de unos 29 aminoácidos. Está clasificada como una proteína de membrana del tipo I (Fig. 24).



**Figura 24. Representación esquemática de la estructura polipeptídica de la glicoproteína G del virus de la rabia.** Se detallan sus respectivos dominios. SP: péptido señal. E: ectodominio. TM: dominio transmembrana. C: dominio citoplasmático.

Esta proteína es el principal antígeno del virus, induciendo la activación tanto de LTh como de LTC. Por otro lado, la glicoproteína G es la única con capacidad de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes ya que es la única proteína viral expuesta en la superficie del virión (Macfarlan y col., 1986; Johnson y col., 2010).

En la estructura polipeptídica de la glicoproteína G del virus de la rabia fueron descritos dos sitios antigénicos de gran tamaño (sitios II y III), un sitio más pequeño (sitio *a*) y varios epitopes aislados en la estructura proteica de la glicoproteína. El sitio II se extiende en dos partes, desde los aminoácidos 34 a 42 y desde el 198 al 207. Estos péptidos están unidos en la estructura terciaria de la proteína por un puente disulfuro entre los residuos 35 y 207. El sitio III está formado por los aminoácidos 333 a 338. Finalmente, el sitio *a* está compuesto por dos residuos aminoacídicos, 342 y 343 (Gaudin y col., 2002).

Es la única proteína del virus que se encuentra glicosilada y posee de dos a cuatro sitios de N-glicosilación dependiendo de la cepa. En la membrana plasmática de las células infectadas, la glicoproteína G se acumula en *clusters* o microdominios, de unos 100-150 nm de diámetro (Knipe y Howley, 2007).

Estos son zonas de la membrana ricas en esta proteína, formados sin la interacción con otros componentes de la estructura del virus.

La glicoproteína G es la responsable de la adsorción específica del virus a los receptores virales en la superficie de las células blanco (Fig. 25-1). El receptor para neurotrofinas p75 está propuesto como uno de los posibles ligandos para la interacción del virus con la célula huésped. A pesar de estas evidencias, el rol de p75 en infecciones de rabia está todavía bajo discusión, ya que otros candidatos han sido propuestos como receptores, incluyendo moléculas de adhesión neuronal, entre otros (Langevin y col., 2002; Schnell y col., 2010; Gluska y col., 2015).

### 5.2. Ciclo de replicación del virus de la rabia

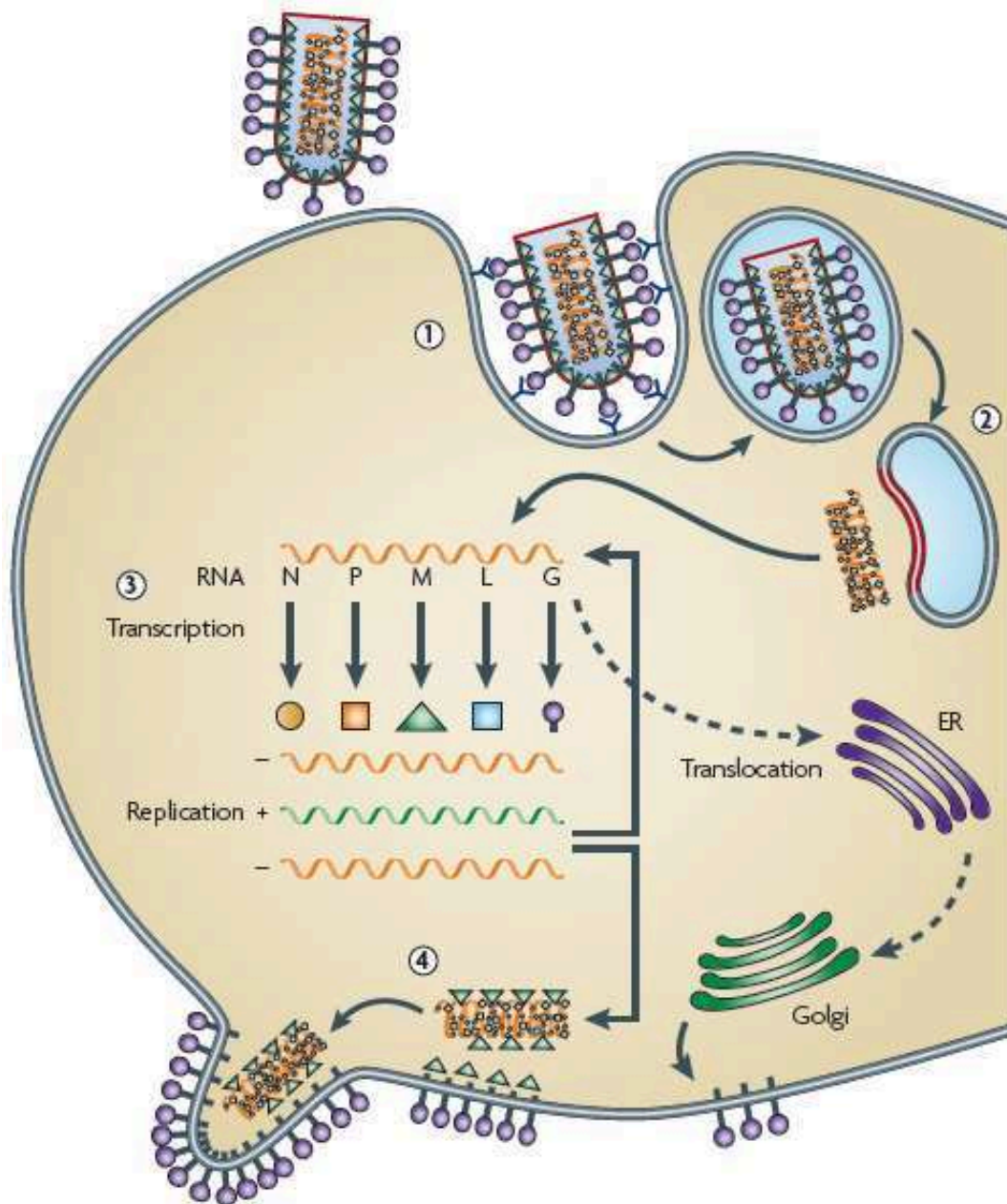
Luego de la interacción con su receptor, el virus ingresa a la célula por endocitosis e induce la liberación de la nucleocápside viral al citoplasma celular ya que, al acidificarse en los lisosomas, la glicoproteína G cambia su conformación facilitando la fusión de la membrana lisosomal con la envoltura viral (Fig. 25-2) (Schnell y col., 2010).

En una segunda fase, los componentes del virión son producidos (transcripción a partir del ARNsc, replicación y síntesis proteica) (Fig. 25-3). A diferencia del resto de las proteínas virales, la glicoproteína G es trasladada hacia el retículo endoplasmático en donde, vía trans Golgi, se producen las modificaciones post-traduccionales sobre su estructura. La fase final del ciclo de replicación es el ensamblado de todos los componentes de la RNP y el brote final de los viriones hacia el exterior celular, tomando su envoltura fosfolipídica a partir de la membrana plasmática de la célula (Fig. 25-4).

Algo importante de analizar es cuales son las proteínas virales que cumplen un rol central durante el brote o "*budding*" viral. Okumura y Harty detallan como este es un proceso concertado entre dos proteínas estructurales del virus: G y M.

Mientras la proteína M termina por condensar la RNP en plena formación, es capaz de interactuar también con la bicapa fosfolipídica de la membrana plasmática de la célula, vía sus dominios ricos en prolina (denominados "*late budding domains*" o "*L-domains*") (Wirblich y col., 2008). Esto último promueve la curvatura de la membrana, lo que se podría describir

como un “efecto empuje” desde el interior (“*push effect*”) (Okumura y Harty, 2011).



**Figura 25. Ciclo de replicación del virus de la rabia.** N: nucleoproteína. P: fosfoproteína. M: proteína de matriz. L: ARN polimerasa. G: glicoproteína. ER: retículo endoplasmático (adaptado de Schnell y col., 2010).

Estas interacciones de M con la membrana plasmática de la célula ocurren en los *clusters* de glicoproteína, promoviendo además la curvatura de la membrana, efecto que se describe como “tracción” desde el exterior celular (“*pull effect*”) (Okumura y Harty, 2011). Este rol central de la proteína G en el *budding* viral fue demostrado en diversos estudios. Se ha descrito como la

sola expresión de las glicoproteínas de los *Rhabdovirus* (rabia y VSV) en células *in vitro* genera la liberación de vesículas vacías ricas en proteína G, lo que confirma que dichas proteínas poseen una actividad exocítica autónoma. Además, la eficiencia de replicación durante infecciones con virus de la rabia deficiente en G se ve reducida hasta 30 veces (Mebatsion y col., 1996). Aunque no está completamente dilucidado, se cree que el dominio citoplasmático de G es quien estaría interviniendo para que esto ocurra (Schnell y col., 1998; Okumura y Harty, 2011).

Resumiendo, se puede decir que el paso final del ciclo de replicación del virus de la rabia, en el que los viriones son liberados hacia el exterior celular ("*budding*"), está promovido tanto por la proteína de matriz como por la glicoproteína G. Este punto tendrá particular importancia durante el planteo de la hipótesis de la presente tesis.



# **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

### HIPÓTESIS

De todo lo expresado en la introducción se desprende la importancia que tiene el desarrollo un nuevo candidato vacunal para la rabia. En este sentido, se pretende crear un nuevo proceso de producción de vacunas para la rabia que sea bioseguro e innovador. Esta nueva vacuna debiera poseer una eficacia similar o mayor a las vacunas actuales y su proceso de producción no debiera comprometer el uso de virus en su estado activo. Debe ser producida utilizando tecnología de última generación.

Las VLPs son excelentes candidatos para el desarrollo de vacunas virales, por generar una respuesta inmune robusta y, principalmente, por ser no infecciosas ya que son partículas estructuralmente similares a los virus y carecen de material genético.

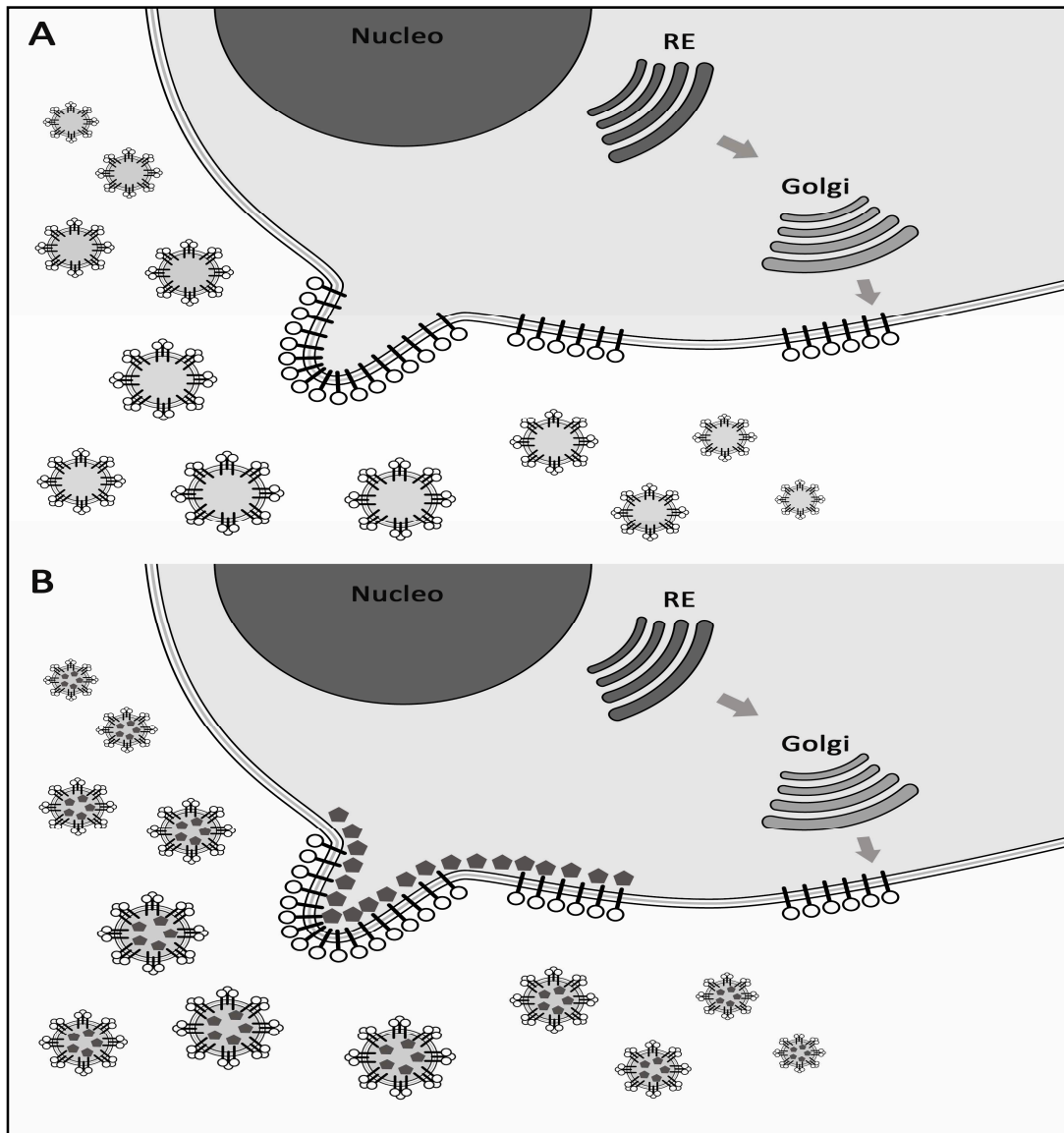
Para desarrollar una nueva tecnología de producción de vacunas a base de VLPs se planificaron dos estrategias para ser llevadas a cabo utilizando cultivos de células animales:

- A. Expresar en forma recombinante únicamente la glicoproteína G del virus de la rabia
- B. Co-expresar en forma recombinante la glicoproteína G y la proteína matriz (M) del virus de la rabia

La glicoproteína G es el principal antígeno viral, induce la síntesis de anticuerpos neutralizantes y participa en el *budding* de las partículas virales durante el ciclo de replicación viral. La proteína M es una proteína estructural responsable de contener la nucleocápside viral y de interactuar con la glicoproteína G. Si bien las VLPs no contienen material genético viral, la propuesta de expresar conjuntamente la proteína M tiene que ver con suministrar una proteína más a la estructura de la VLP que contribuya a una mayor estabilidad.

### OBJETIVO GENERAL

Obtener VLPs con propiedades inmunogénicas, a partir de la expresión de proteínas recombinantes del virus de la rabia en células animales, con el fin de establecer una plataforma de producción de vacunas recombinantes.



**Figura 26. Estrategias para la generación de VLPs del virus de la rabia en células de mamífero. A.** Expresando solo la glicoproteína G. **B.** Co-expresando la glicoproteína G y la proteína M.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. **Desarrollar líneas celulares recombinantes productoras de RV-VLPs para el virus de la rabia (RV-VLPs).**
  - 1.1. Construir vectores de expresión para células eucariotas.
  - 1.2. Desarrollar líneas celulares HEK293, BHK-21 y VERO, que expresen de forma recombinante las proteínas G y M del virus de la rabia.
  - 1.3. Comparar la expresión de RV-VLPs en cada línea celular.

### **2. Caracterizar fisicoquímicamente las RV-VLPs producidas y estudiar sus propiedades inmunogénicas.**

- 2.1. Analizar las partículas pseudovirales producidas y determinar si la expresión de ambas proteínas virales es necesaria para su producción.
- 2.2. Estudiar las características fisicoquímicas e inmunogénicas de las RV-VLPs obtenidas.
- 2.3. Confirmar la capacidad de las RV-VLPs de generar una respuesta inmune protectora en animales de experimentación.

### **3. Obtener un clon celular productor de RV-VLPs.**

- 3.1. Obtener y seleccionar clones por sus características productivas.
- 3.2. Estudiar al clon seleccionado analizando su productividad y estabilidad.
- 3.3. Adaptar el clon productor a condiciones de crecimiento en suspensión, utilizando medios libre de suero.
- 3.4. Evaluar la producción de RV-VLPs en estas condiciones. Estudiar las características de las partículas obtenidas.

### **4. Cambiar de escala la producción de RV-VLPs.**

- 4.1. Cultivar el clon productor de RV-VLPs en biorreactor.
- 4.2. Evaluar la potencia de vacuna antirrábica de las RV-VLPs producidas en estas condiciones.

# RESULTADOS

# **Desarrollo de líneas celulares productoras RV-VLPs**

## 1. DESARROLLO DE LÍNEAS CELULARES PRODUCTORAS DE VIRUS—LIKE PARTICLES PARA EL VIRUS DE LA RABIA (RV-VLPs)

### 1.1. Construcción de vectores de expresión para células eucariotas

Con el objetivo de expresar en células de mamífero las proteínas del virus de la rabia, se construyeron vectores lentivirales de tercera generación como herramienta de transferencia de material genético. Para tal fin, fue necesario como primer paso clonar las secuencias codificantes de cada una de las proteínas en los vectores lentivirales de transferencia, para luego llevar a cabo el ensamblado de los lentivirus y su posterior titulación.

#### 1.1.1. Construcción de los vectores de transferencia pLV-CMV-GlycoG y pLV-CMV-M

La secuencia codificante de la glicoproteína G del virus de la rabia fue amplificada a través de una reacción de PCR, utilizando como templado el plásmido de clonado pGlycoGHis (GeneArt, Life Technologies). El fragmento amplificado y purificado a partir de un gel de agarosa fue digerido con el par de enzimas de restricción *NheI* y *Sall*, para luego ser ligado al vector lentiviral de transferencia pLV-PLK (Prieto y col., 2011) digerido con las enzimas *XbaI* y *Sall* (la enzima *XbaI* genera un extremo compatible con la enzima *NheI*). El vector obtenido fue denominado pLV-CMV-GlycoG (Fig. 27-A).

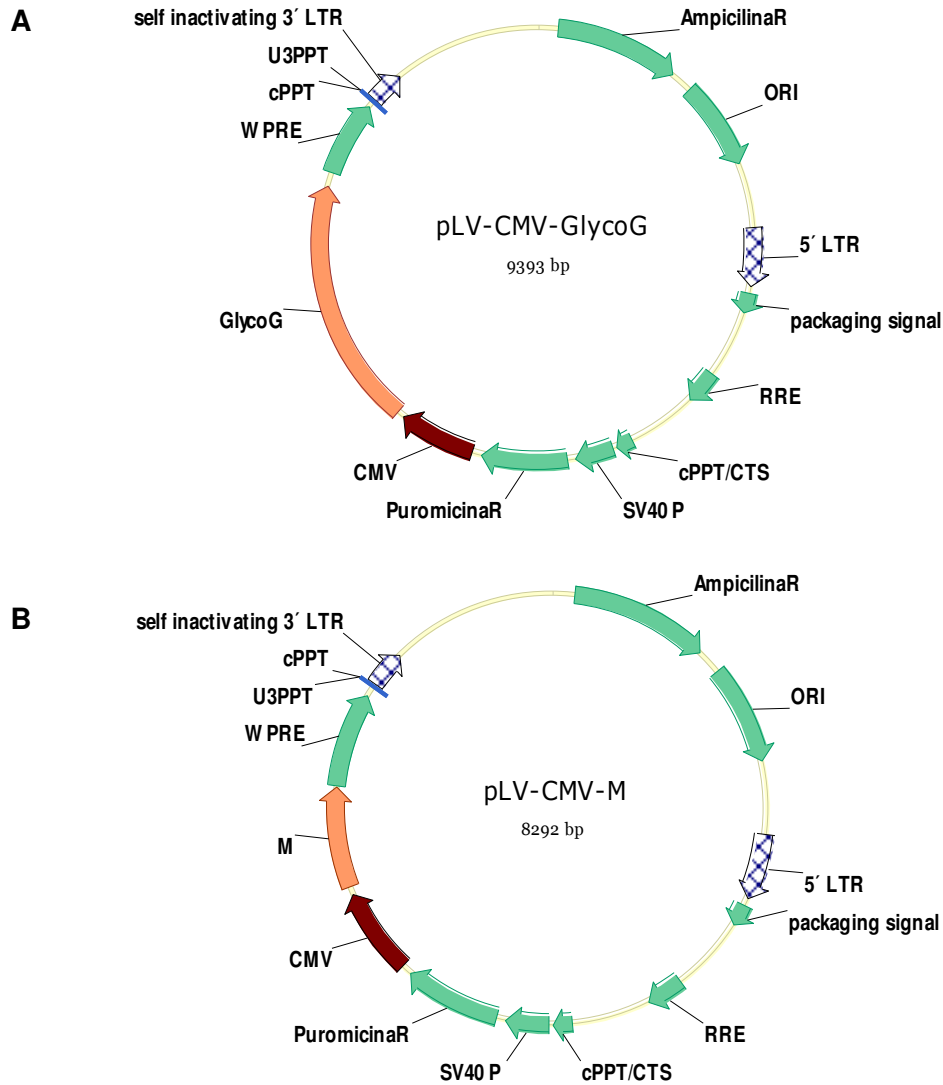
La secuencia codificante de la proteína M fue digerida a partir del vector de clonado pM2rv (GeneArt, Life Technologies), utilizando las enzimas de restricción *NheI* y *Sall*, para luego ser ligado dentro al vector lentiviral de transferencia pLV-PLK digerido con las enzimas *XbaI* y *Sall*. El vector obtenido fue denominado pLV-CMV-M (Fig. 27-B).

La identidad de ambos vectores fue analizada por perfil de restricción y confirmada finalmente por secuenciación.

#### 1.1.2. Producción de los vectores lentivirales LV-G y LV-M

Para llevar a cabo el ensamblado de los vectores lentivirales de tercera generación se transfectaron de forma transiente células de la línea HEK293 con cuatro plásmidos: pRSV-REV, pMD.G, pMDL/pRRE (Naldini y col., 1996; Dull y col., 1998) y los vectores de transferencia pLV-CMV-GlycoG y

pLV-CMV-M, en cada caso. Al cabo de 48 h post-transfección, los sobrenadantes celulares se cosecharon y almacenaron a -70°C. Uno de los viales conteniendo los LVs fue empleado para la titulación.



**Figura 27. Mapa de los vectores de transferencia codificantes de las proteínas el virus de la rabia.** La secuencia codificante de las proteínas del virus de la rabia (G y M) fueron clonadas en el sitio de múltiple clonado, *downstream* del promotor CMV. WPRE: *posttranscriptional regulatory element of woodchuck hepatitis virus*. cPPT: *central polypurine tract*. RRE: *rev response element*. LTRs: *long terminal repeats*. **A.** Vector correspondiente a la glicoproteína G. **B.** Vector correspondiente a la proteína M.

### 1.1.3. Titulación de los vectores lentivirales

Para la determinación del título de partículas lentivirales se empleó el kit de titulación *QuickTiter Lentivirus Titer Kit* (Cell Biolabs Inc.). Este kit fue diseñado para detectar únicamente la proteína p24 del virus del HIV que se



encuentra asociada a partículas. La titulación se efectuó a partir de un estándar de proteína p24 recombinante provisto con el kit.

Utilizando este kit se calcula el título físico (cantidad de proteína p24 del virus HIV-1 asociada a partículas lentivirales ensambladas), expresándolo en partículas lentivirales por mililitro (PL.ml<sup>-1</sup>). Este valor no es el título infeccioso, generalmente expresado en unidades de transducción por mililitro (UT.ml<sup>-1</sup>), para lo cual es necesario llevar a cabo un método que cuantifique las partículas lentivirales con capacidad de transducir eficientemente células. De todas formas, el título infeccioso se puede aproximar (aunque varía entre líneas celulares) teniendo en cuenta que por lo general 10<sup>6</sup> UT.ml<sup>-1</sup> corresponden a 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> PL.ml<sup>-1</sup>. Los títulos obtenidos para los dos stocks de lentivirus producidos se detallan en la tabla 2.

**Tabla 2:** Cálculo del título de partículas lentivirales.

LV	Conc. de proteína p24 asociada a PL (ng.ml <sup>-1</sup> )	Título físico (PL.ml <sup>-1</sup> )	Título infeccioso aproximado (UT.ml <sup>-1</sup> )
LV-G	15,5	1,9 x 10 <sup>8</sup>	1,9 x 10 <sup>6</sup>
LV-M	19,7	2,5 x 10 <sup>8</sup>	2,5 x 10 <sup>6</sup>

### 1.2. Desarrollo de líneas celulares recombinantes

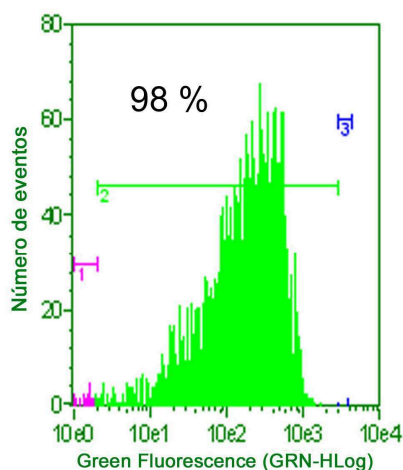
El primer objetivo del presente trabajo fue evaluar el ensamblado de RV-VLPs en diferentes líneas celulares de mamífero. Se trabajó con las líneas celulares establecidas HEK293, VERO y BHK-21, y los resultados obtenidos en cada una de ellas fueron comparados.

Con ese objetivo, entonces, se llevó a cabo la construcción de líneas recombinantes que expresan las proteínas G y M del virus de la rabia. Como primer paso, se comenzó con una primera transducción, utilizando el lote de lentivirus LV-G, para generar líneas celulares que expresen la glicoproteína G del virus de la rabia, para luego re-transducir dichas líneas recombinantes con los vectores que portan la secuencia de la proteína M y construir así líneas celulares que expresen ambas proteínas.

### 1.2.1. Construcción y análisis de la línea celular recombinante HEK293

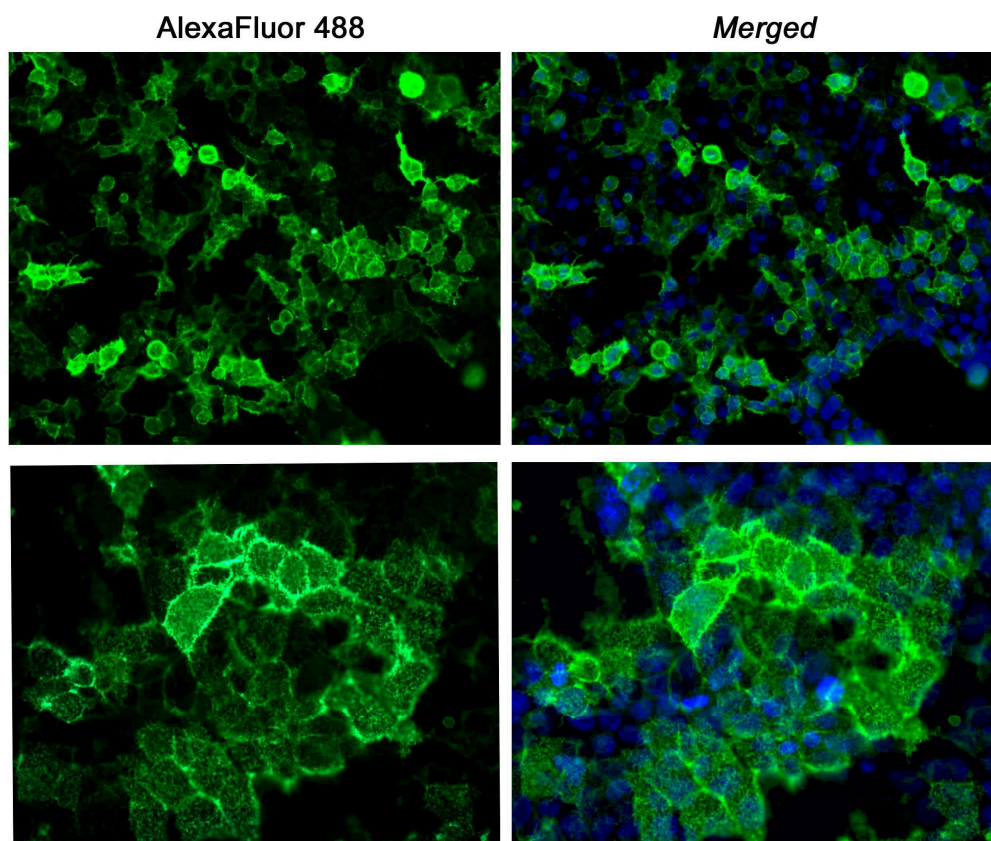
Células HEK293 fueron transducidas con una alícuota del stock de lentivirus LV-G a una multiplicidad de infección (MDI) de 20. Luego de 96 h de incubación, se adicionó al medio de cultivo el antibiótico puromicina, a una concentración de  $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , como agente de selección. Luego de que el control de muerte (células no transducidas) presentara una viabilidad del 0%, el antibiótico fue retirado del cultivo y las células recombinantes obtenidas fueron denominadas LHEK-G.

Posteriormente, y con el objetivo de analizar la expresión de la glicoproteína G por parte de la línea LHEK-G, las células fueron analizadas por citometría de flujo, utilizando un anticuerpo monoclonal específico para dicha proteína (AB5) (Ramirez, 2008) y un anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo AlexaFluor 488. La línea LHEK-G presentó un 98% de células fluorescentes (Fig. 28), confirmando la eficiencia de transducción por parte de los vectores lentivirales y la funcionalidad de la secuencia génica utilizada.



**Figura 28. Análisis de la expresión de la glicoproteína G del virus de la rabia en células HEK293, por citometría de flujo.** La línea celular LHEK-G fue incubada con el anticuerpo monoclonal anti-G (AB5) y posteriormente con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado al fluoróforo AlexaFluor 488. Marker 1: Células negativas. Marker 2: Células positivas.

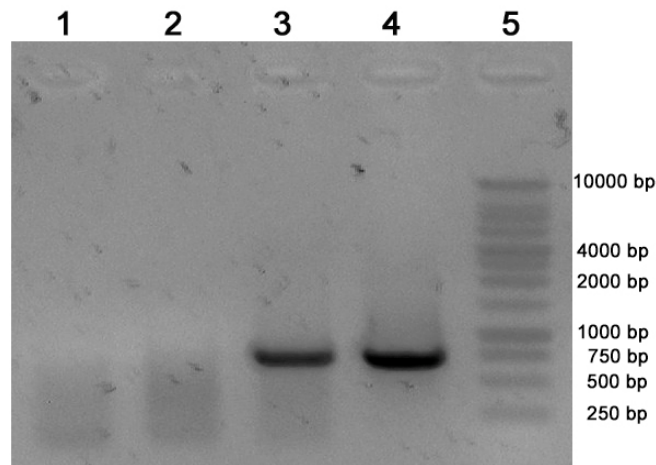
Luego, y utilizando el mismo par de anticuerpos, se llevó a cabo una microscopía de fluorescencia sobre la línea LHEK-G para analizar la localización subcelular de la glicoproteína G del RV. Como puede observarse en la figura 29, la proteína en estudio está presente en la superficie celular, anclada a la membrana plasmática, como está descrito para las glicoproteínas que forman parte de la estructura de los virus con envoltura.



**Figura 29. Análisis de la expresión de la glicoproteína G del virus de la rabia en células HEK293, por microscopía de fluorescencia.** Células de la línea estable LHEK-G, fijadas con una solución de paraformaldehído al 4%, fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-G (AB5) y posteriormente con un anticuerpo secundario anti-ratón, conjugado al fluoróforo AlexaFluor 488. Se realizó una tinción diferencial de núcleos con DAPI. Se muestran dos campos a diferentes aumentos y la superposición de ambas tinciones (*Merged*).

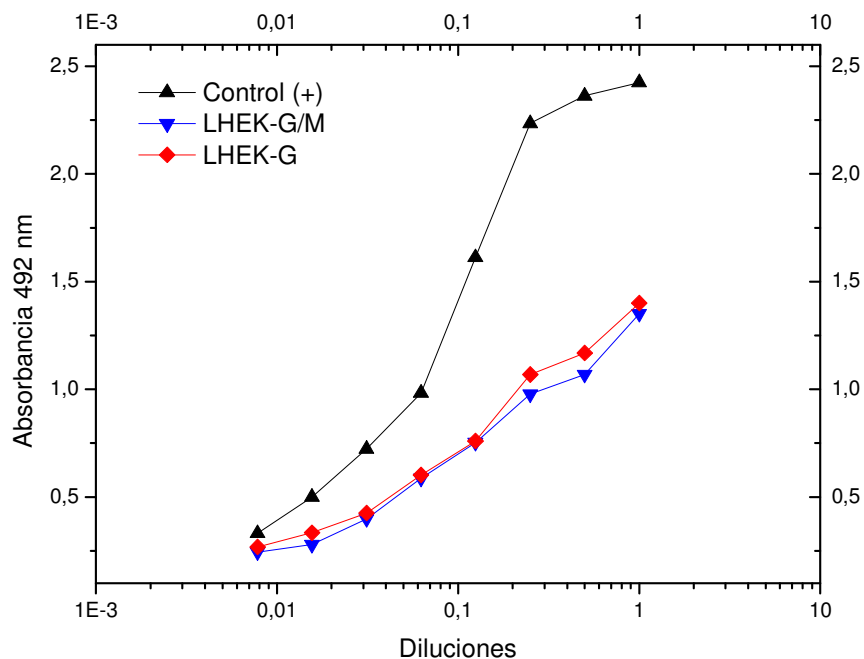
Una vez que fue confirmada la expresión de la glicoproteína G, la línea celular LHEK-G fue re-transducida con el vector lentiviral LV-M, generando de ésta forma una nueva línea celular denominada LHEK-G/M.

Debido a que no existen en el mercado anticuerpos que sean capaces de reconocer específicamente a la proteína M del virus de la rabia, el análisis de la expresión de dicha proteína por parte de la línea celular LHEK-G/M fue llevado a cabo a través de un ensayo de RT-PCR. En la figura 30 puede observarse un fragmento de aproximadamente 700 pares de bases, correspondiente a la secuencia codificante de la proteína M, solo presente en la muestra de ARN extraído de la línea celular LHEK-G/M.



**Figura 30. RT-PCR para analizar la expresión de la proteína M en células HEK293.** ARN total de las células de las líneas LHEK-G y LHEK-G/M fue purificado y la reacción de retrotranscripción llevada a cabo utilizando una enzima transcriptasa reversa (M-MLV RT) y un oligo-dT. El ADN complementario obtenido fue utilizado como templado en una reacción de PCR específica para la secuencia de la proteína M. Carril 1: Control negativo. Carril 2: LHEK-G. Carril 3: LHEK-G/M. Carril 4: Control positivo de la PCR (plásmido conteniendo la secuencia codificante de la proteína M). Carril 5: Marcador de peso molecular.

Finalmente, y con el objetivo de analizar si las líneas celulares desarrolladas eran capaces de producir VLPs que broten al sobrenadante de cultivo, se llevó a cabo un ELISA sándwich específico para la detección de la glicoproteína G (única proteína expuesta al exterior del virus).



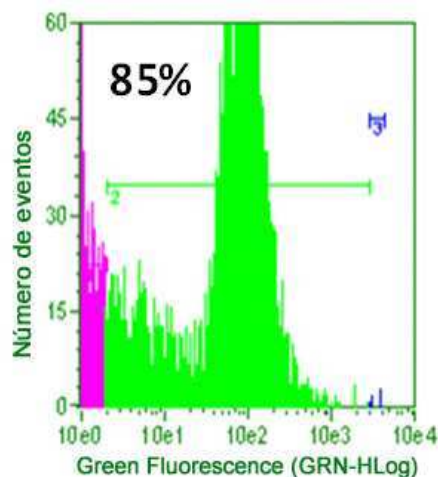
**Figura 31. Detección de RV-VLPs en sobrenadante de cultivo de células HEK293 por ELISA sándwich.** Se utilizó como control positivo de reacción una muestra de virus de la rabia inactivado.

Como puede observarse en la figura 31, se pudo detectar en los sobrenadantes de las líneas celulares establecidas la presencia de glicoproteína G. Por otro lado, se puede ver que la co-expresión de la proteína M junto con la proteína G no estaría aumentando o modificando de algún manera el brote de RV-VLPs, o la cantidad de proteína viral presente en el sobrenadante de cultivo.

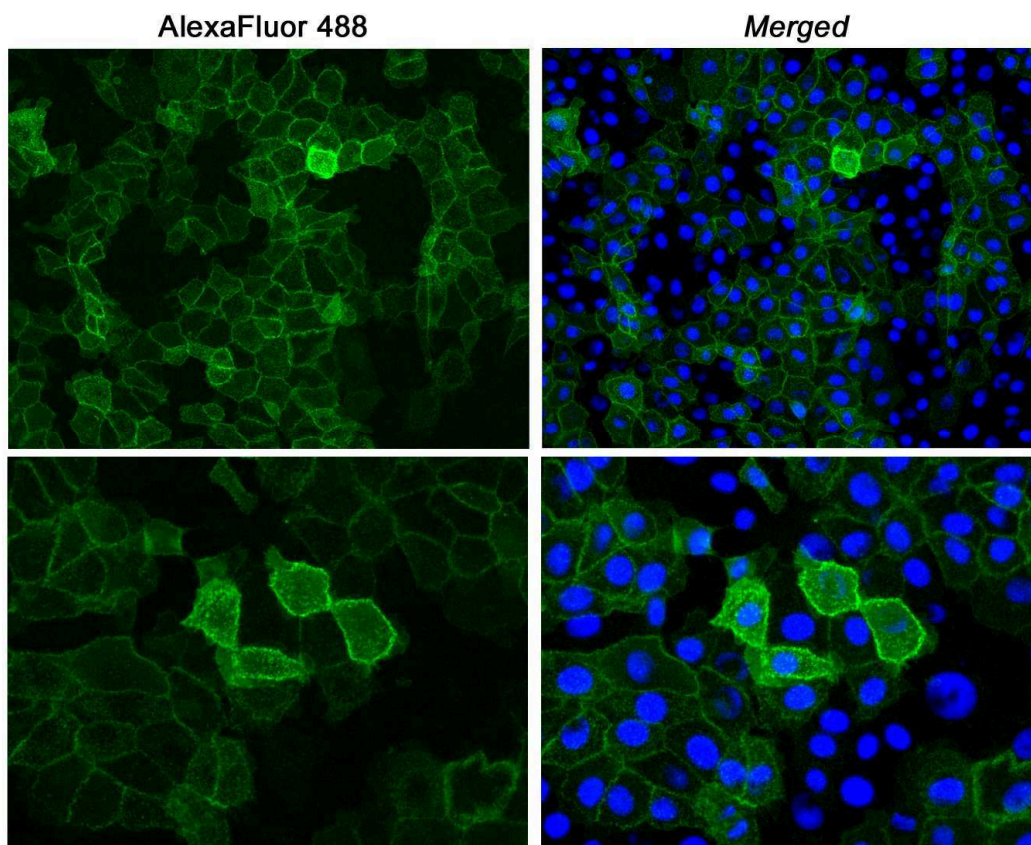
### 1.2.2. Construcción y análisis la línea celular recombinante VERO

Células de la línea establecida VERO fueron transducidas con el vector lentiviral LV-G con una MDI de 20, generando la línea recombinante que fue denominada LVERO-G. Luego de ser seleccionadas con el agente de selección puromicina, las células fueron analizadas por citometría de flujo, obteniéndose un 85% de células fluorescentes (Fig. 32).

Para confirmar que la glicoproteína G se localizaba correctamente en la membrana plasmática, las células fueron analizadas por microscopía de fluorescencia. Como se observa en la figura 33, la intensidad de fluorescencia específica se concentra sobre la membrana celular de las células productoras confirmando la correcta localización subcelular de la proteína.



**Figura 32. Análisis de la expresión de la glicoproteína G del virus de la rabia en células VERO, por citometría de flujo.** La línea celular LVERO-G fue incubada con el anticuerpo monoclonal anti-G (AB5) y posteriormente con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado al fluoróforo AlexaFluor 488. Marker 1: Células negativas. Marker 2: Células positivas.



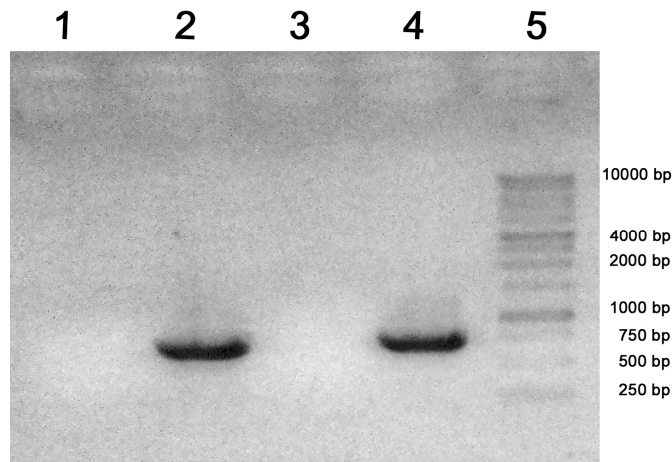
**Figura 33. Análisis de la expresión de la glicoproteína G del virus de la rabia en células VERO, por microscopía de fluorescencia.** Células de la línea estable LVERO-G, fijadas con una solución de paraformaldehído al 4%, fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-G (AB5) y posteriormente con un anticuerpo secundario anti-ratón, conjugado al fluoróforo AlexaFluor 488. Se realizó una tinción diferencial de núcleos con DAPI. Se muestran dos campos a diferentes aumentos y la superposición de ambas tinciones (*Merged*).

Posteriormente, la línea celular LVERO-G fue re-transducida para obtener células que expresen la proteína M junto con la glicoproteína G, generando así la línea estable LVERO-G/M. La expresión de M por parte de esta línea celular recombinante fue analizada por RT-PCR.

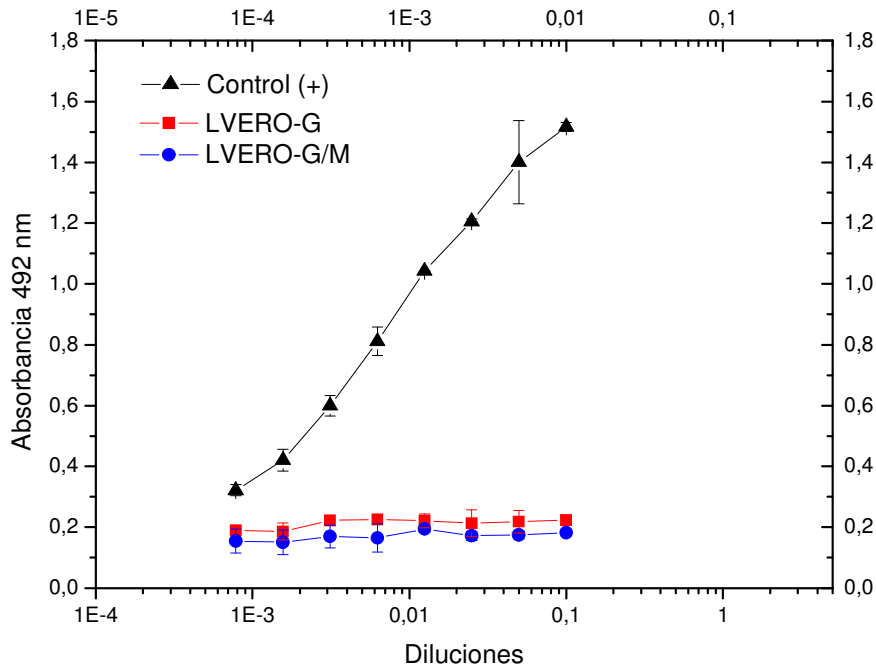
Como puede observarse en la figura 34, una banda de 700 pares de bases fue detectada en el carril 2, correspondiente al ARN mensajero obtenido de la LVERO-G/M.

Para evaluar la expresión de RV-VLPs en sobrenadante de cultivo de las líneas celulares obtenidas, se llevó adelante un ensayo de ELISA sándwich. Como puede observarse en la figura 35, no pudo detectarse presencia de proteína viral en los sobrenadantes de ninguna de los dos cultivos, resultado sorpresivo ya que el nivel de expresión de proteína evaluado por citometría de flujo había sido satisfactorio y, además, la microscopía de fluorescencia había

demostrado que la glicoproteína se encontraba localizada correctamente, sobre la membrana plasmática de las células. Una mayor discusión de esos resultados se detalla al final de este capítulo.



**Figura 34. RT-PCR para analizar la expresión de la proteína M en células VERO.** ARN total de las células de las líneas LVERO-G y LVERO-G/M fue purificado y la reacción de retrotranscripción llevada a cabo utilizando una enzima transcriptasa reversa (M-MLV RT) y un oligo-dT. El ADN complementario obtenido fue utilizado como templado en una reacción de PCR específica para la secuencia de la proteína M. Carril 1: Control negativo. Carril 2: LVERO-G/M. Carril 3: LVERO-G. Carril 4: Control positivo de la PCR (plásmido conteniendo la secuencia codificante de la proteína M). Carril 5: Marcador de peso molecular.



**Figura 35. Detección de RV-VLPs en sobrenadante de cultivo de células VERO, por ELISA sándwich.** Se utilizó como control positivo de reacción una muestra de virus de la rabia inactivado.

### 1.2.3. Construcción y análisis la línea celular recombinante BHK-21

De la misma forma que fue llevado a cabo para las líneas celulares HEK293 y VERO, células BHK-21 fueron transducidas utilizando el vector lentiviral LV-G con una MDI de 20, generando de esta forma la línea celular que fue denominada LBHK-G. El análisis de la expresión de la glicoproteína G por citometría de flujo demostró que la línea celular recombinante poseía solo un 74% de células positivas y con una intensidad de fluorescencia (*X-mean*) muy baja.

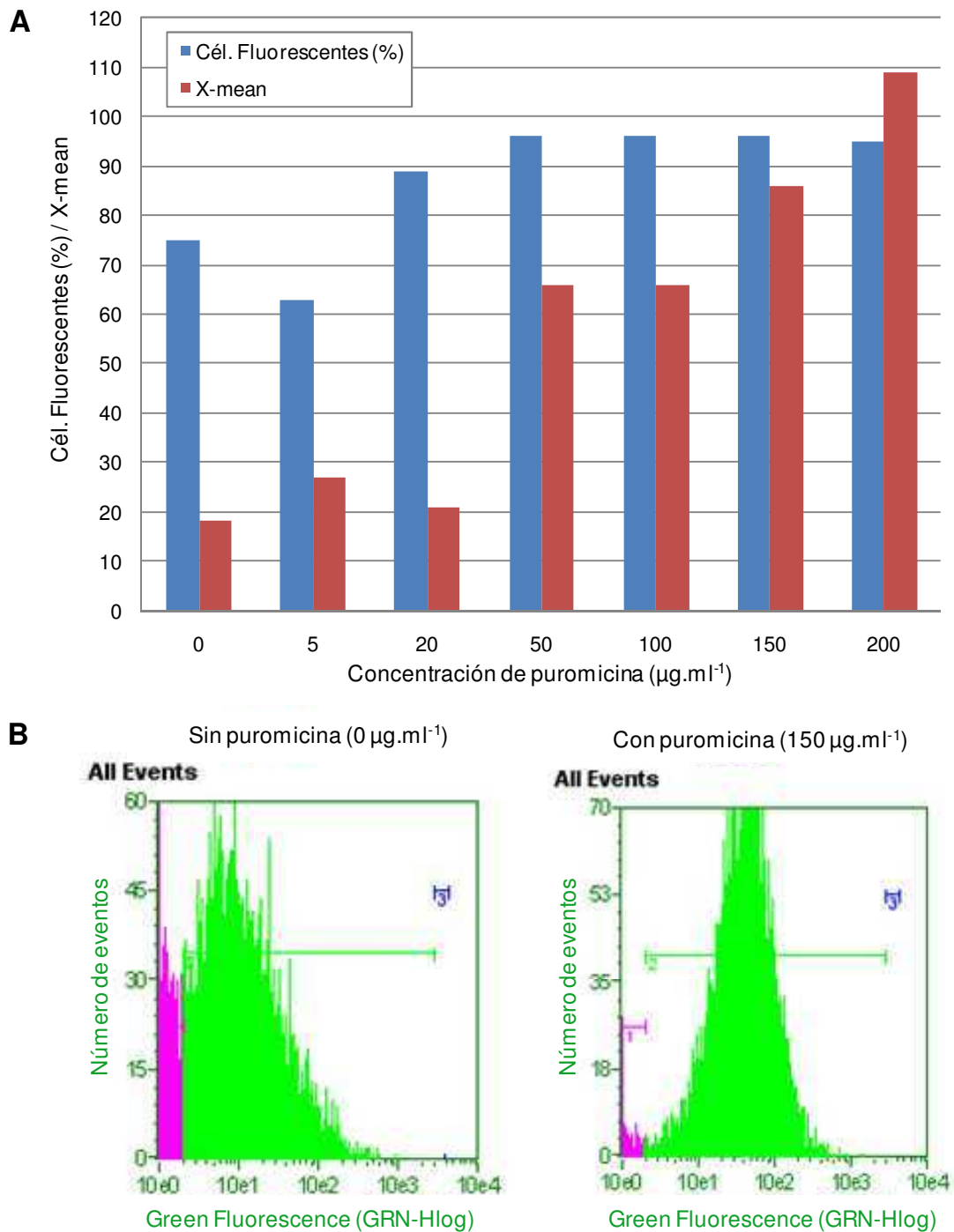
Teniendo esto en cuenta, y con el objetivo de obtener una línea con mayor nivel de expresión, se llevo a cabo un protocolo de presión selectiva gradual desarrollado en nuestro laboratorio (Prieto y col., 2011). En este protocolo, las células son incubadas con concentraciones crecientes del agente de selección (en este caso es el antibiótico puromicina), pero dicho aumento se realiza de forma gradual, cambiando el sobrenadante de cultivo cada 5-7 días por medio fresco con una concentración mayor del antibiótico. Con esta metodología se pretende enriquecer el cultivo en las células que expresan un mayor nivel del transgen.

En el caso de la línea celular estable LBHK-G, se logró obtener un cultivo capaz de ser resistente hasta  $150 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de puromicina, logrando incrementar el porcentaje de células que expresan la glicoproteína G hasta un 96%, con un aumento de la intensidad de expresión (*X-mean*) de entre 5-6 veces, con respecto a la línea sin presionar (Fig. 36).

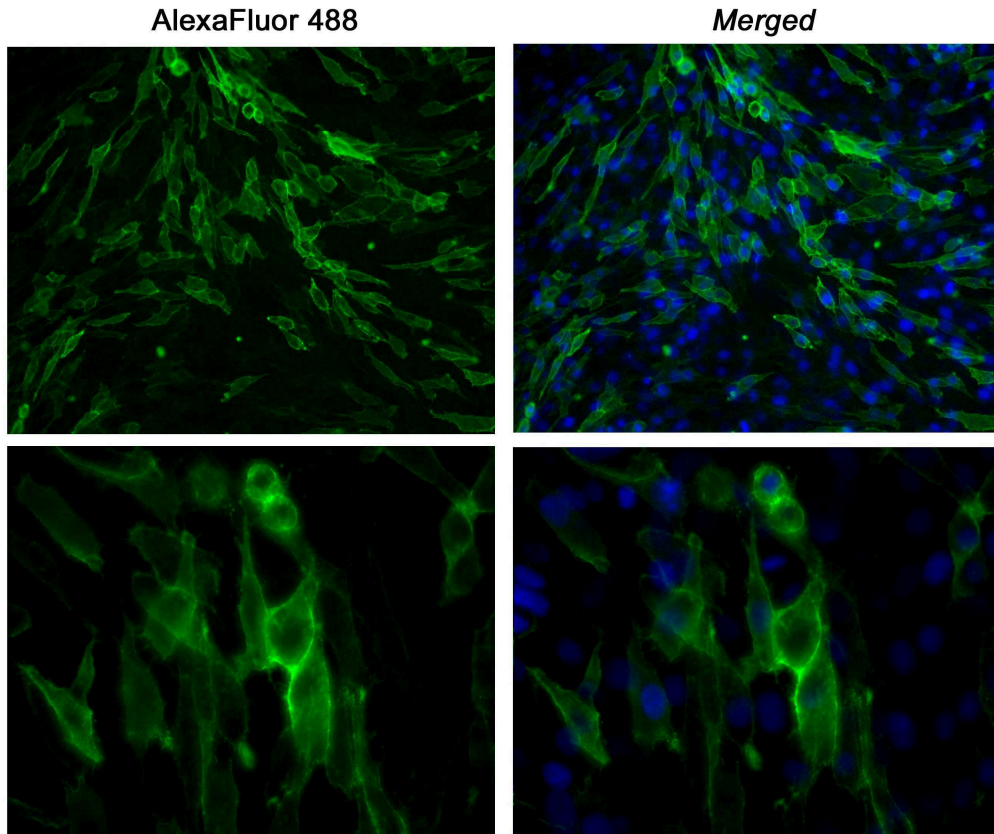
Una vez finalizado el protocolo de selección, la línea celular fue analizada por microscopía de fluorescencia para estudiar la localización subcelular de la glicoproteína G (Fig. 37).

Luego de confirmada la expresión de la glicoproteína G y su correcta localización en la membrana plasmática de la célula, la línea celular LBHK-G fue re-transducida con el objetivo de generar una línea celular que exprese a la proteína M del virus de la rabia junto con la G. Ya que no se disponía de un anticuerpo capaz de reconocer específicamente a dicha proteína, se confirmó la presencia de transcripto en la línea LBHK-G/M llevando a cabo una reacción de RT-PCR (Fig. 38).

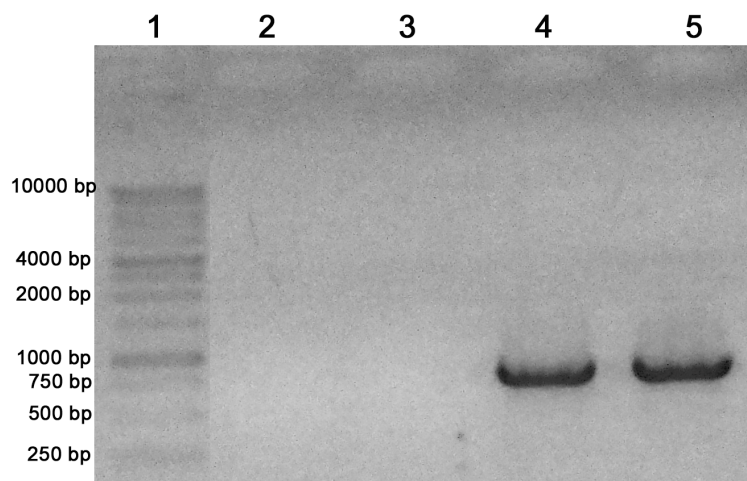




**Figura 36. Protocolo de selección gradual con puromicina.** La línea celular LBHK-G fue incubada gradualmente con concentraciones crecientes puromicina, logrando aumentar su porcentaje de células fluorescentes. **A.** Se grafica el porcentaje de células fluorescentes y la intensidad de expresión (*X-mean*) de las células que fueron resistentes a cantidades crecientes de puromicina. **B.** Histogramas obtenidos de la citometría de flujo de las células sin presionar y de las que lograron ser resistentes a 150 µg.ml<sup>-1</sup> de puromicina.

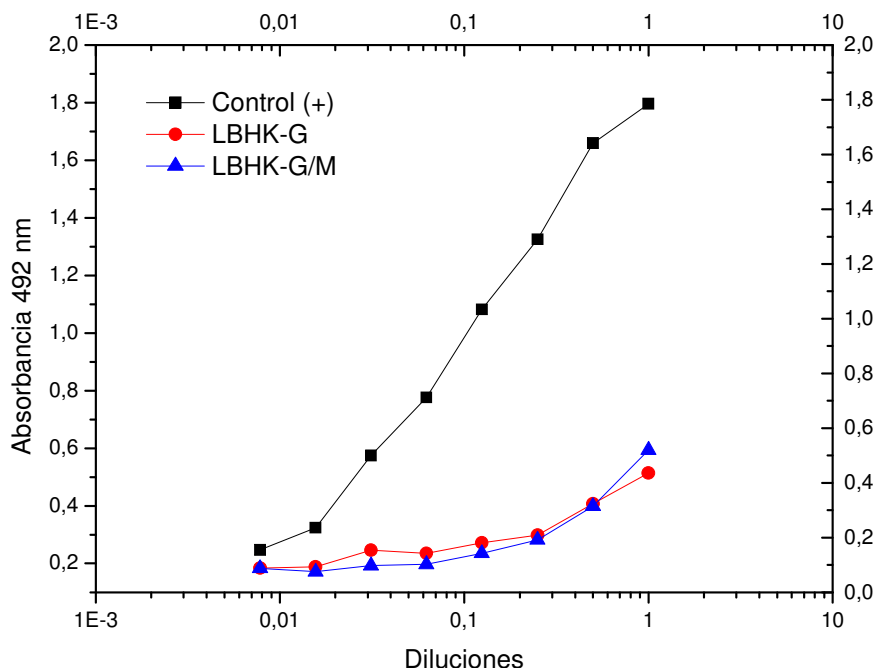


**Figura 37. Análisis de la expresión de la glicoproteína G del virus de la rabia en células BHK-21, por microscopía de fluorescencia.** Células de la línea estable LBHK-G, fijadas con una solución de paraformaldehído al 4%, fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-G (AB5) y posteriormente con un anticuerpo secundario anti-ratón, conjugado al fluoróforo AlexaFluor 488. Se realizó una tinción diferencial de núcleos con DAPI. Se muestran dos campos a diferentes aumentos y la superposición de ambas tinciones (*Merged*).



**Figura 38. RT-PCR para analizar la expresión de la proteína M en células BHK-21.** ARN total de las células de las líneas LVERO-G y LVERO-G/M fue purificado y la reacción de retrotranscripción llevada a cabo utilizando una enzima transcriptasa reversa (M-MLV RT) y un oligo-dT. El ADN complementario obtenido fue utilizado como templado en una reacción de PCR específica para la secuencia de la proteína M. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Control negativo. Carril 3: LBHK-G. Carril 4: LBHK-G/M. Carril 5: Control positivo de la PCR (plásmido conteniendo la secuencia codificante de la proteína M).

Posteriormente, las líneas celulares fueron analizadas por ELISA sándwich y, como puede observarse en la figura 39, se pudo detectar la presencia de RV-VLPs en los sobrenadantes de cultivo, pero en un nivel bastante bajo. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el nivel de expresión entre las líneas celulares LHEK-G y LHEK-G/M.



**Figura 39. Detección de RV-VLPs en sobrenadante de cultivo de células BHK-21, por ELISA sándwich.** Se utilizó como control positivo de reacción una muestra de virus de la rabia inactivado.

### 1.3. Análisis comparativo de los resultados obtenidos para cada una de las líneas recombinantes

De las secciones anteriores puede verse que se lograron obtener líneas celulares recombinantes HEK293, VERO y BHK-21 que expresan la glicoproteína G, la cual se encuentra anclada a la membrana plasmática de las células. Por otro lado, se generaron también líneas celulares que co-expresan la proteína M junto con la glicoproteína G. Sin embargo, analizando los ensayos de ELISA llevados a cabo para cada tipo de línea celular (Figs. 31, 35 y 39), se puede observar que solo en las muestras de sobrenadante de las dos líneas HEK293 se pudieron detectar VLPs en cantidad considerable (cabe aclarar que estos ensayos de ELISA son llevados a cabo con una finalidad cualitativa y semi-cuantitativa ya que no se poseía un estándar para calcular una concentración en ese momento). Las líneas celulares BHK-21 presentaron

un nivel de productividad de RV-VLPs muy bajo y en las líneas celulares VERO no pudo detectarse, con este ELISA sándwich, VLPs en sobrenadante. Estos resultados fueron sorprendentes ya que, como se discutió anteriormente, estas células recombinantes expresan la glicoproteína correctamente, tal cual lo demuestran los ensayos de citometría y microscopía de fluorescencia.

Con el propósito de determinar si las membranas celulares estarían jugando un rol determinante en la generación de las VLPs, se decidió utilizar las diferentes líneas celulares como células empaquetadoras de vectores lentivirales. Para el ensamblado de estos vectores se llevó a cabo la metodología descrita en el apartado 1.1.2. de este capítulo, pero en lugar de utilizar el vector pMD.G, se utilizó el vector pZC-GlycoG (vector de expresión para células eucariotas que porta la secuencia codificante de la glicoproteína G del virus de la rabia, descrito en el Anexo III). De esta forma, los vectores lentivirales producidos están pseudotipados con la glicoproteína del virus de la rabia y no la del VSV. El vector de transferencia utilizado en este caso fue el pLV-GFP, el cual porta la secuencia codificante de la GFP.

Al momento de cosechar los lentivirus, las células empaquetadoras fueron analizadas por citometría de flujo para obtener el porcentaje de células transfectadas (GFP positivas). El objetivo de este paso fue poder realizar una inferencia de qué porcentaje de células estaba produciendo LVs, ya que solo las células que fueron correctamente transfectadas son las que logran empaquetar las partículas lentivirales.

Posteriormente, el título de lentivirus fue calculado por citometría de flujo y expresado en unidades de transducción por mililitro ( $UT \cdot ml^{-1}$ ). El valor obtenido fue corregido para representar el título que se hubiera obtenido si el 100% de las células se hubieran transfectado e independizarnos de la capacidad de transfección que posee cada línea celular.

Como puede observarse en la tabla 3, las células BHK-21 y VERO fueron mucho menos eficientes que las células HEK293 a la hora de producir un vector viral recombinante que posee a la glicoproteína G de rabia como proteína de membrana. El título de lentivirus obtenido fue de casi dos órdenes de magnitud menor para BHK-21 y más de tres órdenes de magnitud menor para el caso de las células VERO.

**Tabla 3:** Eficiencia de producción de vectores lentivirales utilizando diferentes líneas celulares como células empaquetadoras.

Línea celular empaquetadora	Título de lentivirus (UT.ml <sup>-1</sup> )	Porcentaje de células transfectadas (%)	Título con respecto al 100% de células transfectadas (UT.ml <sup>-1</sup> )
HEK293	4x10 <sup>7</sup>	96	4,16x10 <sup>7</sup>
BHK-21	6x10 <sup>5</sup>	96	6,25x10 <sup>5</sup>
VERO	1x10 <sup>4</sup>	78	1,25x10 <sup>4</sup>

Aunque no puede asegurarse que los procesos moleculares por los cuales los lentivirus y las RV-VLPs brotan hacia el sobrenadante de cultivo sean los mismos, con estos resultados se puede concluir que la capacidad para ensamblar partículas virales por parte de las líneas VERO y BHK-21 es menor que la observada para las células HEK293. Por otro lado, esto se corresponde con las abundantes publicaciones que describen a las células HEK293 como una eficiente plataforma para producción de vectores virales, tanto para terapia génica como para su aplicación en vacunas, como así también la expresión de VLPs de diversos tipos virales utilizando estas células (Hess y col. 2012; Le Ru y col. 2010; Nadeau y col., 2003; Petiot y col., 2012; Petiot y col., 2015).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento, y con el objetivo de poder llevar a cabo la caracterización de las RV-VLPs, se decidió seguir trabajando solo con las líneas recombinantes HEK293. En el siguiente capítulo se detallan los experimentos llevados a cabo con las RV-VLPs expresadas por LHEK-G y LHEK-G/M y los análisis realizados para evaluar las diferencias entre ambas.

# **Caracterización de RV-VLPs**

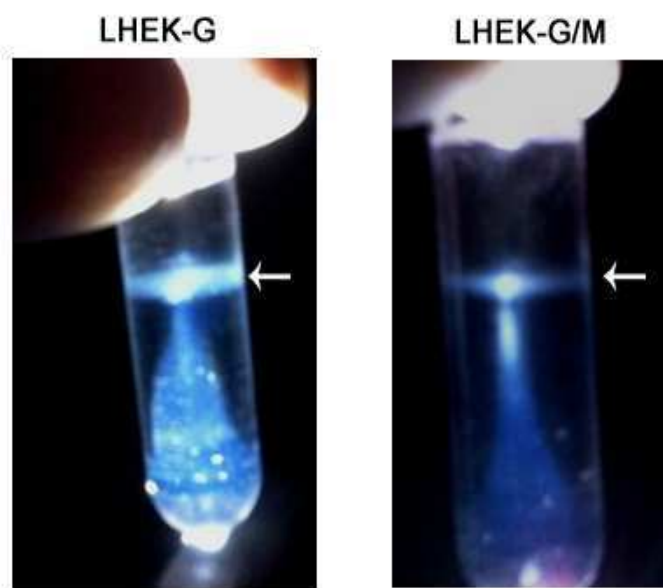
## 2. CARACTERIZACIÓN DE LAS RV-VLPs

### 2.1. Caracterización fisicoquímica y morfológica de las RV-VLPs

Una vez elegida la línea celular HEK293 para seguir estudiando las RV-VLPs generadas, se llevaron a cabo diversas metodologías con el objetivo de caracterizar morfológica y fisicoquímicamente las partículas producidas. Por un lado se buscó estudiar su forma y tamaño, como así también dilucidar si existían diferencias entre las VLPs generadas por las líneas LHEK-G y LHEK-G/M. Principalmente se buscó analizar si la proteína M estaría formando parte de la estructura de la VLP y si su expresión en conjunto con G confería alguna característica particular y/o ventaja por sobre las VLPs generadas por la línea LHEK-G.

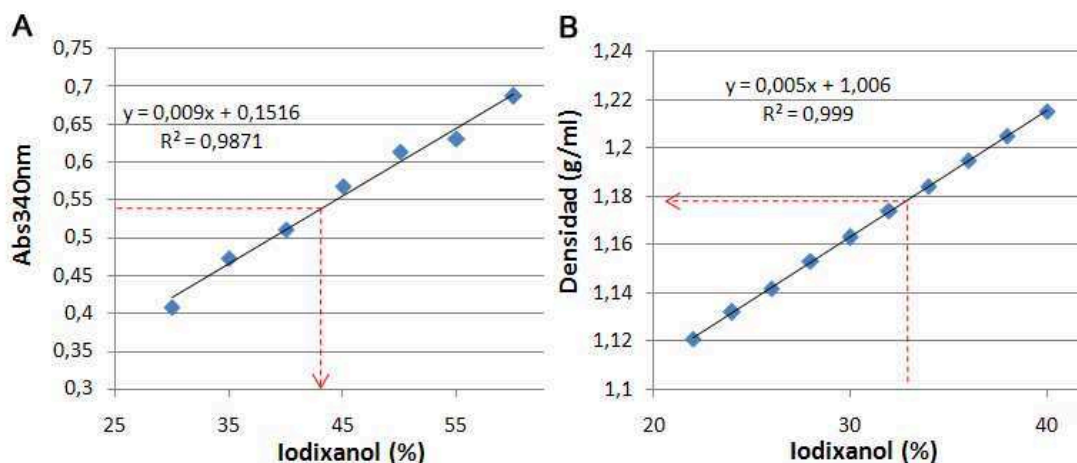
#### 2.1.1. Purificación de VLPs por ultracentrifugación en gradiente. Análisis de la densidad de partícula

Las líneas celulares recombinantes fueron cultivadas en frascos T triple, en medio de cultivo conteniendo 1% de SFB. Cada 48-72 h el medio de cultivo fue renovado y el sobrenadante conteniendo las VLPs fue cosechado. Estas RV-VLPs fueron concentradas y purificadas por ultracentrifugación en gradiente de densidades. Se pudo observar una sola banda en cada gradiente, las dos aproximadamente a la misma altura del tubo (Fig. 40).



**Figura 40. Ultracentrifugación de RV-VLPs en gradiente de densidad con iodixanol.**  
Fotografías de las bandas obtenidas luego del proceso de purificación.

Las bandas fueron alicuotadas cuidadosamente y su densidad calculada analizando la densidad óptica de las muestras. Utilizando iodixanol es posible inferir la densidad de las bandas obtenidas (y por lo tanto de las partículas presente en las mismas). Esto se logra midiendo la absorbancia a 340 nm y calculando con ese valor el porcentaje de iodixanol correspondiente a cada muestra (Fig. 41-A). Luego, utilizando valores de referencia establecidos por el fabricante (Fig. 41-B), es posible calcular la densidad de la muestra.



**Figura 41. Cálculo de densidad de partícula por absorbancia a 340 nm.** A. Gráfica experimental confeccionada con soluciones estándar de iodixanol a concentraciones conocidas. B. Gráfica confeccionada con datos teóricos suministrado por el fabricante.

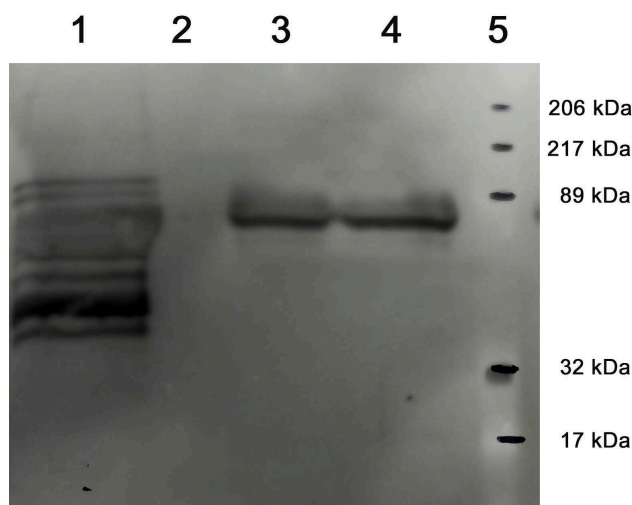
Analizando muestras de 3 ensayos de ultracentrifugación independientes se obtuvieron valores de densidades en el rango de 1,15-1,16 g.ml<sup>-1</sup> para ambas muestras. Este valor de densidad es menor que el descripto para el virus de la rabia (1,20 g.ml<sup>-1</sup>) (Neurath y col., 1966), lo cual se corresponde con lo esperado ya que, al contrario de en las VLPs, el virus no es una partícula vacía sino que en su interior se encuentra la nucleocápside.

Posteriormente, se llevó a cabo una ultrafiltración para realizar un cambio de buffer. Para tal fin se utilizaron dispositivos AmiconUltra (Millipore) de 100.000 MWCO y buffer NTE (0,15 M NaCl; 1,0 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl; pH 7,4).

Con esta muestra purificada se realizó un ensayo de *western blot* con dos objetivos. En primer lugar, confirmar la presencia de la glicoproteína rábica en las bandas obtenidas en el gradiente y, en segundo lugar, analizar si en las VLPs expresadas por la línea LHEK-G/M estaba también presente la proteína M. Para tal fin, y recordando que no se disponía de anticuerpo monoclonal específico para detectar dicha proteína, se utilizó un anticuerpo policlonal de



conejo anti-virus de la rabia y una muestra de lisado de virus como control positivo (Fig. 42).



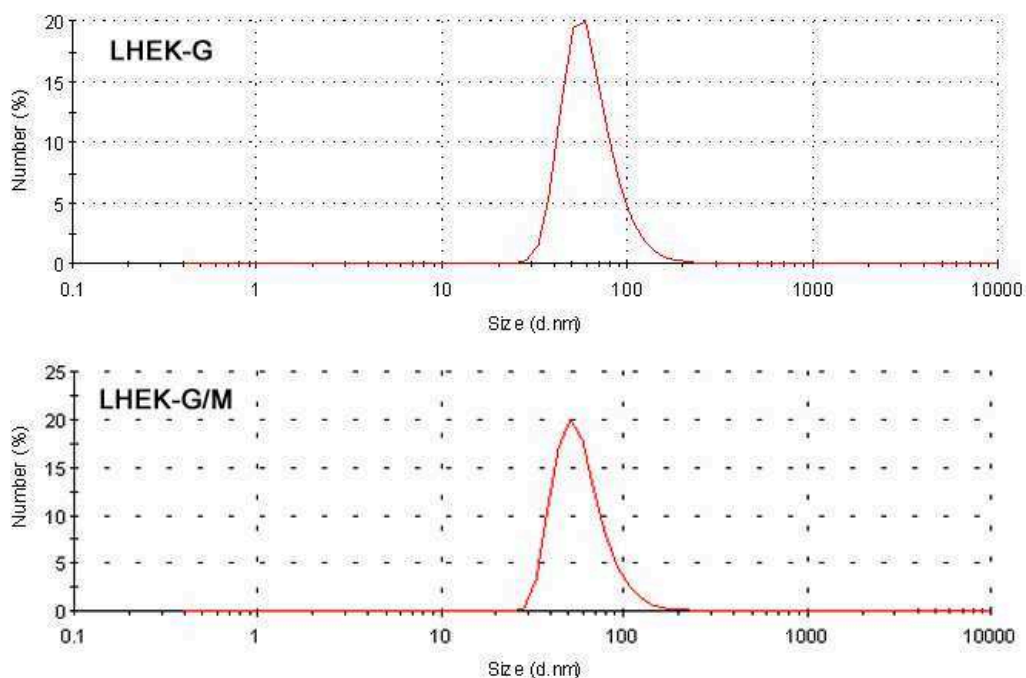
**Figura 42. Western blot de RV-VLPs purificadas.** Las muestras fueron corridas en un SDS-PAGE al 10% y luego transferidas a una membrana de PVDF. Luego, se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo anti-virus de la rabia y, posteriormente, con un anticuerpo secundario conjugado a HRP. Se reveló por quimioluminiscencia. Carril 1. Control positivo: muestra de lisado de virus de la rabia. Carril 2: Carril vacío. Carril 3. RV-VLPs producidos por LHEK-G. Carril 4. RV-VLPs producidos por LHEK-G/M. Carril 5. Marcador de peso molecular.

En la figura 42 se puede observar que ambas muestras de RV-VLPs purificadas contienen a la glicoproteína del virus de la rabia y que dicha proteína posee el peso molecular esperado (62-67 kDa). Por otro lado, no se logró observar una banda correspondiente a la proteína M en la muestra de VLPs de la línea LHEK-G/M a la altura del peso molecular correspondiente (25 kDa). Dicho resultado puede deberse a que efectivamente la proteína M no está siendo incorporada a la estructura de la VLP o a que el suero policlonal utilizado no posee título suficiente para detectarla en estas condiciones. Como puede verse, en la muestra de lisado de virus tampoco se observa una banda de peso molecular esperado para M. Las consecuencias de estos resultados en la elección final de la estrategia para producir RV-VLPs inmunogénicas serán discutidas al final de este capítulo.

### 2.1.2. Análisis del diámetro de partícula por DLS

Muestras de RV-VLPs purificadas fueron analizadas por DLS para obtener información sobre el diámetro hidrodinámico y distribución de partícula. Utilizando un equipo *ZetaSizer Nano ZS* (Malvern Zetasizer, Malvern Instruments Ltd.) se analizaron las VLPs producidas por las líneas celulares

recombinantes LHEK-G y LHEK-G/M, obteniéndose valores promedios de  $64 \pm 24$  nm y  $60 \pm 23$  nm respectivamente (Fig. 43).



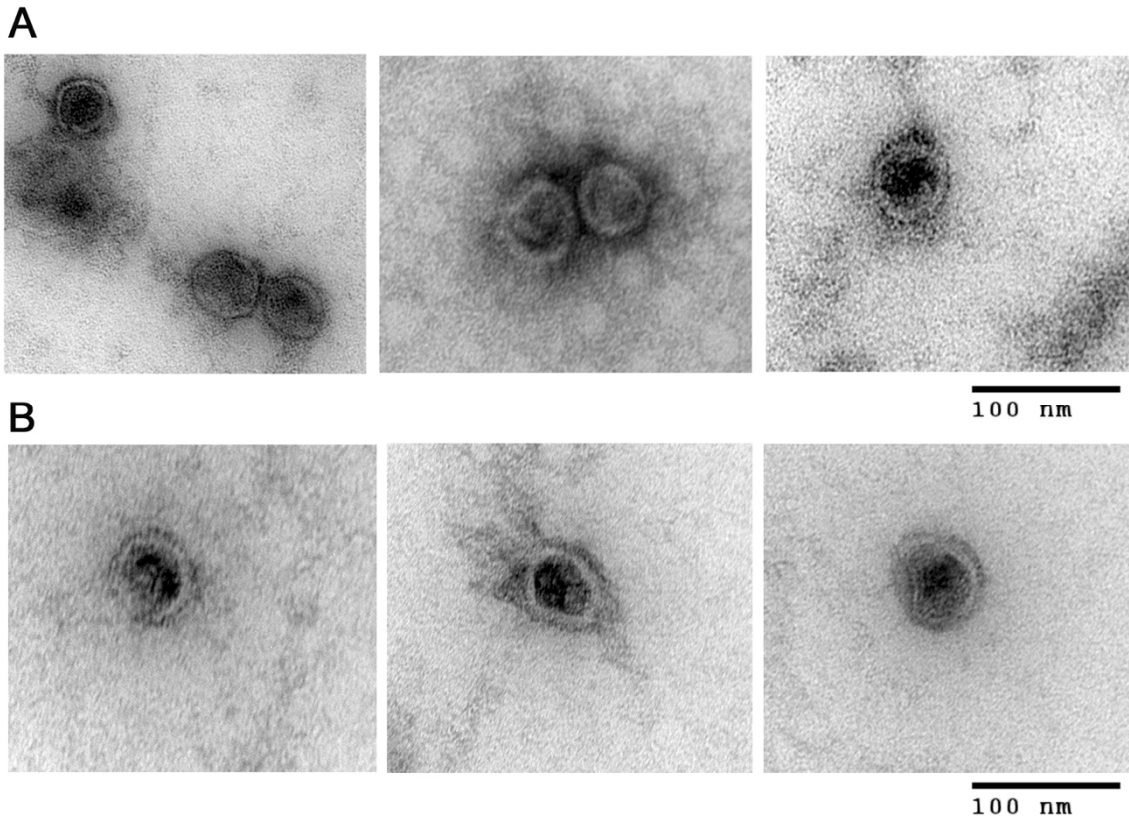
**Figura 43. Análisis del diámetro de partícula por DLS.** Las muestras de VLPs purificadas fueron analizadas con un equipo *ZetaSizer Nano ZS* (Malvern Instruments Ltd.). El software *Nanov510* fue utilizado para procesar los resultados y convertir la medida basada en intensidad a una distribución basada en el número de partículas (*Number %*).

### 2.1.3. Análisis morfológico de las RV-VLPs

Posteriormente, se llevó a cabo una MET con el objetivo de analizar la morfología de las RV-VLPs producidas y de confirmar si las VLPs producidas por LHEK-G/M poseían alguna diferencia estructural visible con las producidas por LHEK-G (Fig. 44).

Como puede verse en la figura, se observaron partículas circulares de un tamaño aproximado de 50 nm de diámetro (En el Anexo I se presentan las fotos originales con sus respectivas medidas de tamaño tomadas con el software acoplado a la cámara del MET). Este resultado se corresponde con el obtenido en los ensayos de DLS, teniendo en cuenta que utilizando esta última metodología se mide la capa de contraiones que rodea a la partícula en solución aumentando así levemente el valor del diámetro, efecto que no está presente en MET.

Por otro lado, puede observarse la envoltura fosfolipídica de las RV-VLPs, proveniente de la membrana plasmática de la célula productora, como está descrito para las VLPs envueltas (Piljman, 2015).



**Figura 44. Microscopía electrónica de transmisión de muestras de RV-VLPs purificadas.** Se realizó una tinción negativa con una solución de acetato de uranilo al 2%. **A.** VLPs producidas por la línea recombinante LHEK-G. **B.** VLPs producidas por LHEK-G/M.

Finalmente, se puede ver en las micrografías que no existen diferencias en las estructuras de las VLPs generadas por las dos líneas celulares. En ambas muestras, las partículas observadas son circulares, envueltas, con un tamaño similar y aparentemente están vacías (se observa el agente de tinción electronegativo en su interior).

## 2.2. Comparación entre las RV-VLPs producidas por las líneas LHEK-G y LHEK-G/M: ¿existen diferencias?

De los análisis realizados previamente a muestras de VLPs purificadas de ambas líneas celulares se puede ver que las partículas producidas poseen la misma densidad, forma, diámetro hidrodinámico y que ambas contienen a la glicoproteína G como parte de su estructura. Por otro lado, solo se pudo confirmar la presencia de ARN mensajero de la proteína M en las células de la línea LHEK-G/M, pero no su localización subcelular ni la presencia de la misma como parte de la estructura de las RV-VLPs. Esta situación de incertidumbre nos llevó a plantearnos dos posibilidades:

- ✓ La proteína M no se estaría incorporando a la estructura de las VLPs, por lo cual las partículas analizadas son esencialmente las mismas (formadas solo por glicoproteína G y envoltura).
- ✓ La proteína M sí estaría formando parte de la estructura de las VLPs (probablemente interaccionando con la parte interna de la membrana fosfolipídica a través de sus *L-domains* (PPxY motifs) (Harty y col., 1999) pero no se logró detectar su presencia con las herramientas analíticas disponibles.

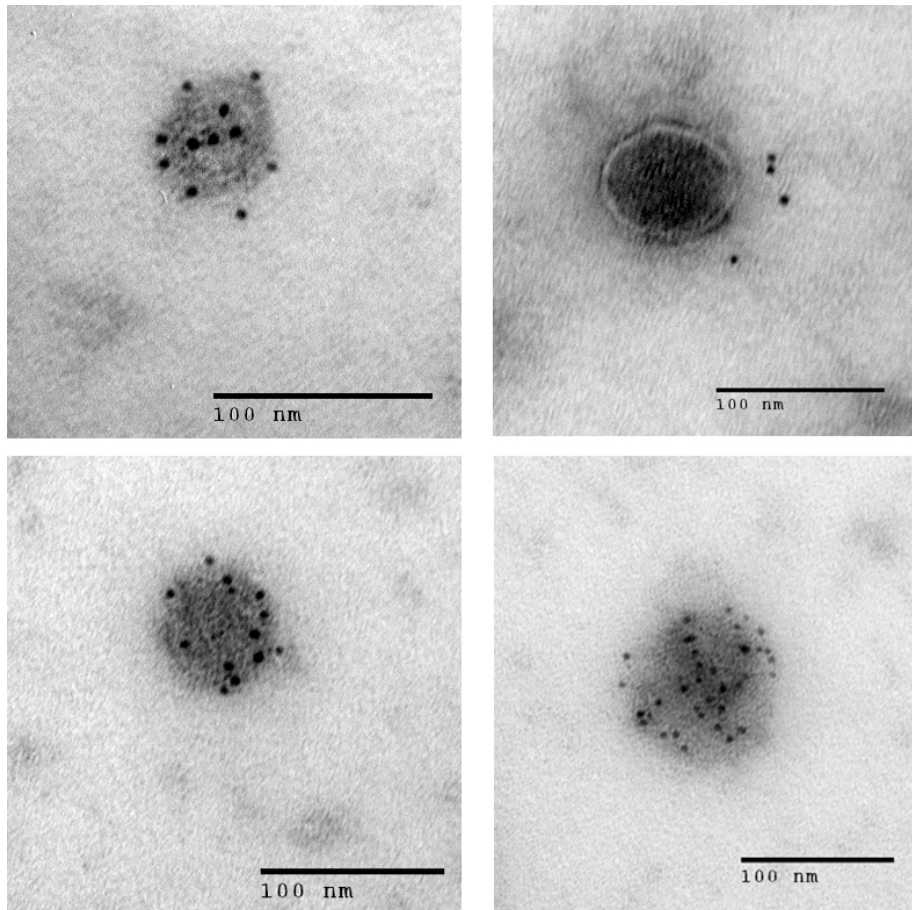
En ambas opciones, las RV-VLPs obtenidas poseen las mismas características morfológicas y las líneas celulares que las producen lo hacen con la misma productividad (analizado semi-cuantitativamente por ELISA sándwich, Fig. 31). De esta forma, se ve que la co-expresión de la proteína M en la estrategia de producción de VLPs de rabia no estaría confiriendo ninguna característica diferencial o beneficiosa.

Por lo tanto, teniendo en cuenta que la expresión de M en conjunto con G no aumenta el nivel de expresión (no mejora el *budding* de VLPs) y que no aporta características estructurales que puedan ser beneficiosas (por lo menos las analizadas con las metodologías disponibles) se decidió seguir trabajando solamente con la línea celular recombinante LHEK-G.

### **2.3. MET asociada a inmunomarcación con oro de RV-VLPs**

Con el objetivo de confirmar que las partículas observadas al microscopio electrónico poseían efectivamente a la glicoproteína G como parte de su estructura, se llevó a cabo una MET asociada a una inmunomarcación con oro coloidal. Para tal fin, una muestra de VLPs fue incubada, en primera instancia, con un anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína G (AB5) (Ramirez, 2008) y, posteriormente, con un anticuerpo secundario conjugado a partículas de oro de 6 nm de diámetro.

En la figura 45 se observa cómo las partículas de oro se encontraron asociadas a la superficie de las RV-VLPs, demostrando de esta manera que la glicoproteína G del virus de la rabia se encuentra anclada en la envoltura de las partículas pseudovirales producidas.



**Figura 45. Inmunomarcación con oro de RV-VLPs observadas al MET.** Muestras de VLPs purificadas fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-G (AB5) y posteriormente con un anticuerpo secundario conjugado a partículas de oro coloidal de 6 nm de diámetro.

#### 2.4. Análisis de la inmunogenicidad de las RV-VLPs

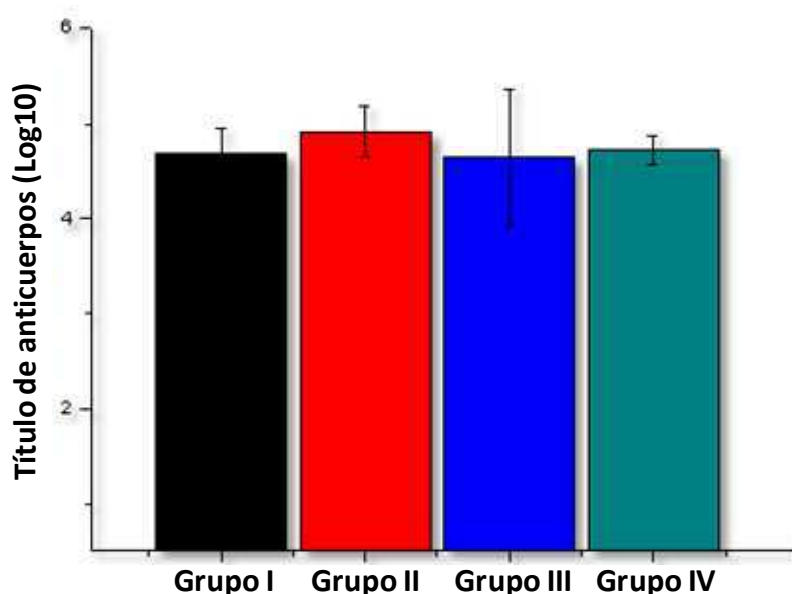
De la caracterización fisicoquímica llevada a cabo con las RV-VLPs producidas en células HEK293 se pudo confirmar su tamaño, forma, radio hidrodinámico y densidad, como así también obtener información acerca de la antigenicidad de las mismas, ya que anticuerpos específicos (sueros hiperinmunes en los casos de western blot y ELISAs) fueron capaces de reconocer a la glicoproteína G formando parte de la estructura de la partícula.

Para seguir caracterizando las RV-VLPs y confirmar si estas partículas pseudovirales eran capaces de generar una respuesta inmune *in vivo* se llevó a cabo un plan de inmunización utilizando ratones como animales de experimentación. Se inyectaron cuatro grupos de animales, al grupo I se le inyectó una cantidad de VLPs equivalente a una dilución 1/20 de una vacuna para uso humano (cuantificadas por ELISA sándwich equivalente a 0,3  $\mu$ g proteína total) y al grupo II una cantidad 10 veces mayor (3  $\mu$ g).

Como controles positivos se inyectaron otros dos grupos de animales ( $n=4$ ). El grupo III fue inmunizado con una vacuna antirrábica veterinaria (Bagovac Rabia, Biogénesis Bagó) y el grupo IV con una vacuna de uso humano (Verorab, Sanofi-Pasteur). Con los sueros de los animales inmunizados obtenidos se analizó la respuesta inmune humoral generada, por ELISA específico indirecto y citometría de flujo.

#### 2.4.1. ELISA específico indirecto

Con los sueros de los animales inmunizados se llevó a cabo un ELISA específico indirecto y se calculó el título de anticuerpos específicos.



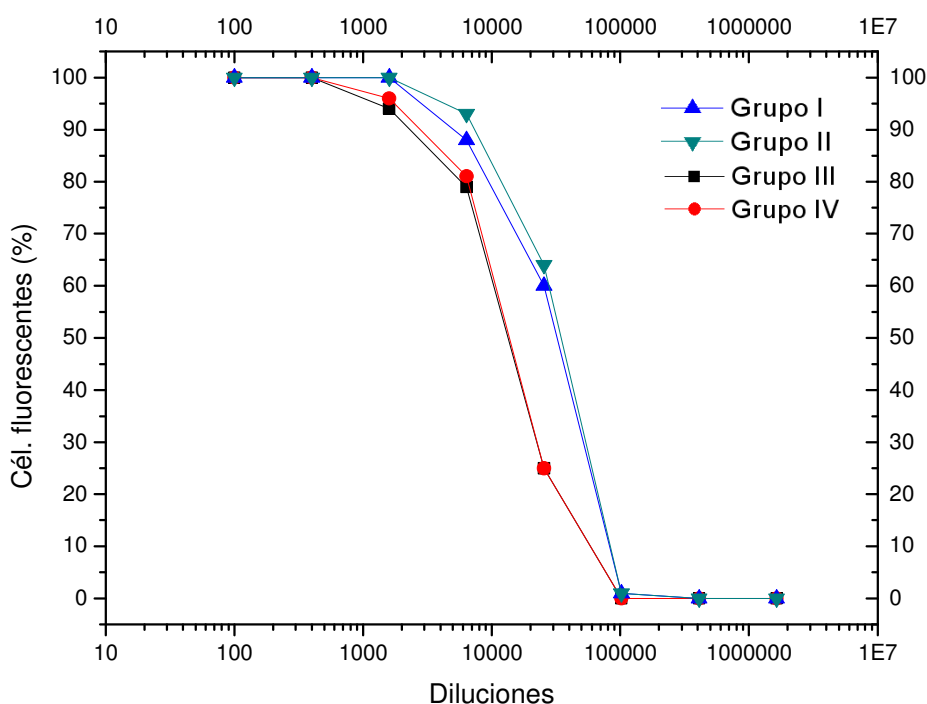
**Figura 46. ELISA específico indirecto para calcular el título de anticuerpos generados en el plan de inmunización.** Se utilizaron VLPs purificadas para sensibilizar la placa y los títulos de anticuerpos fueron calculados como la dilución mayor al valor de *cut off*, calculado como la absorbancia del control negativo más dos desviaciones estándar. **Grupo I:** animales inmunizados con 0,3  $\mu\text{g}$  de RV-VLPs. **Grupo II:** 3  $\mu\text{g}$  de RV-VLPs. **Grupo III:** vacuna veterinaria. **Grupo IV:** vacuna humana.

Como puede observarse en la figura 46, las VLPs fueron capaces de generar una respuesta inmune humoral específica. A su vez, la respuesta inducida fue comparable con la generada por las vacunas comerciales (habiendo sido inyectada la misma cantidad de antígeno). Por otro lado, se puede ver que el título de anticuerpos obtenido en los dos grupos de VLPs fue casi idéntico. Esto puede deberse a que con 0,3  $\mu\text{g}$  de VLPs el sistema inmune ya se encontraba suficientemente estimulado, por lo cual el aumento de la cantidad de inmunógeno en el grupo que fue inyectado con 3  $\mu\text{g}$  de VLPs no generó un incremento sustancial del título de anticuerpos. Este resultado tiene

gran importancia, ya que las RV-VLPs producidas en estas condiciones serían capaces de generar una respuesta inmune específica de anticuerpos, aún utilizando una pequeña cantidad de antígeno.

#### 2.4.2. Citometría de flujo

Con el objetivo de confirmar el resultado anterior, los sueros de animales vacunados fueron analizados por citometría de flujo, llevando a cabo un protocolo desarrollado en nuestro laboratorio (ver Anexo II). En el mismo, los anticuerpos presentes en la muestra a evaluar interaccionan con la glicoproteína G anclada a la membrana de un clon celular VERO y, luego de una incubación con un anticuerpo secundario fluorescente, el resultado es analizado por citometría de flujo. A mayor cantidad de anticuerpos anti-G presentes, mayor porcentaje de células fluorescentes.



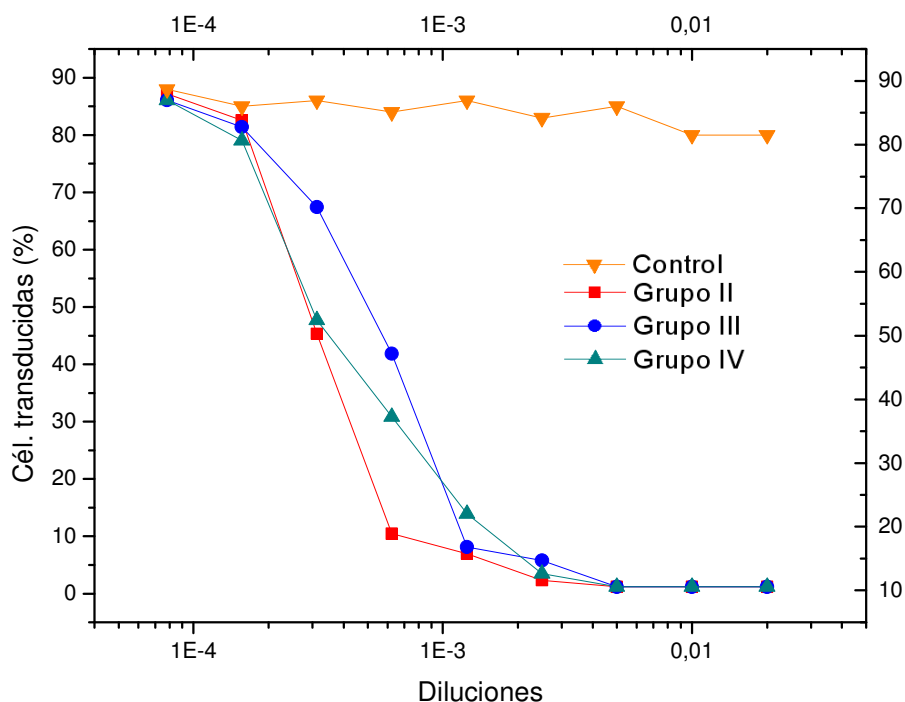
**Figura 47. Análisis de la respuesta inmune desarrollada en la inmunización de ratones con VLPs mediante citometría de flujo.** Una cantidad fija de células de un clon celular VERO que expresa la proteína G en su membrana fue incubado con diluciones seriadas de los sueros a evaluar. Posteriormente, las células fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti ratón conjugado al fluoróforo AlexaFluor 488 y analizadas por citometría de flujo. Se obtuvo el valor de porcentaje de células fluorescentes en cada muestra. **Grupo I:** animales inmunizados con 0,3 µg de RV-VLPs. **Grupo II:** 3 µg de RV-VLPs. **Grupo III:** vacuna veterinaria. **Grupo IV:** vacuna humana.

En la figura 47 puede verse que los anticuerpos inducidos por las VLPs fueron capaces de interaccionar con la glicoproteína G presente en la

membrana de las células VERO. Este resultado, además de informar que el nivel de anticuerpos específicos en las muestras de VLPs es comparable con las vacunas comerciales, demuestra que dichos anticuerpos son capaces de interactuar con la glicoproteína de forma nativa, formando trímeros en la superficie celular, así como lo hacen los anticuerpos neutralizantes en la superficie del virión durante una infección (Gaudin y col., 1992).

### 2.4.3. Ensayo de neutralización

Para confirmar la hipótesis anterior, se desarrolló un ensayo de neutralización de la transducción de vectores lentivirales, los cuales están pseudotipados con la glicoproteína G del virus de la rabia y portan la secuencia codificante de la GFP. En este experimento se incubó durante 1 h a 37°C una cantidad fija de lentivirus con diluciones seriadas de los sueros a evaluar. La mezcla de virus recombinantes y anticuerpos es utilizada luego para transducir células HEK293 que, 72 h más tarde, son analizadas por citometría de flujo (ver Anexo III).



**Figura 48. Análisis de la capacidad neutralizante de los anticuerpos mediante citometría de flujo.** Una cantidad fija de lentivirus son incubados con diluciones seriadas de los sueros a evaluar y, posteriormente, agregados a un cultivo de células HEK293. 72 h después, las células son analizadas por citometría de flujo para obtener el porcentaje de células transducidas. Un anticuerpo no relacionado fue utilizado como control. **Grupo II:** animales inmunizados con 3 µg de RV-VLPs. **Grupo III:** vacuna veterinaria. **Grupo IV:** vacuna humana. **Control:** anticuerpo no relacionado.



Los resultados obtenidos (Fig. 48) demostraron que los anticuerpos inducidos por las RV-VLPs son capaces de neutralizar vectores virales en solución, reduciendo totalmente la capacidad de los mismos de transducir células. Teniendo en cuenta que en el lentivirus la glicoproteína G se encuentra anclada a la membrana de su envoltura (analizado por *western blot*, ver Anexo III) de la misma forma que ocurre en el virus de la rabia, los resultados aquí mostrados nos estarían dando la información de que las RV-VLPs son capaces de inducir la producción de anticuerpos específicos, con un título comparable con las vacunas comerciales y que, además, poseen capacidad neutralizante.

La neutralización es una de las funciones principales que poseen los anticuerpos durante una infección del virus de la rabia, logrando impedir la migración del virus hacia el sistema nervioso central, por lo cual el análisis de la inducción de anticuerpos neutralizantes es esencial a la hora de determinar la eficacia de un plan de inmunización o evaluar la potencia de una vacuna para rabia (Moore y Hanlon, 2010).

### **2.5. Ensayos de protección: NIH *potency test***

Hasta el momento se evaluó la capacidad de las RV-VLPs de inducir una respuesta inmune específica de anticuerpos y, además, que estos anticuerpos poseen capacidad neutralizante, pero esto no confirma totalmente que esa respuesta inmune generada sea capaz de proteger a animales inmunizados frente a una infección con el virus activo. En el caso de la rabia, el ensayo de referencia de “*challenge*” es el ensayo de potencia para vacuna antirrábica del NIH (*National Health Institute potency test*) (Wilbur y Aubert, 1996).

El ensayo de potencia del NIH generalmente se utiliza para medir, como lo dice su nombre, la potencia de un lote de vacuna. En el ensayo se inmunizan grupos de animales con diluciones del lote de vacuna a evaluar y con una vacuna estándar evaluada previamente y valorada con el estándar internacional suministrado por la OMS (*6th International Standard for Rabies vaccine, NIBSC*). De esta forma, se obtiene un valor de potencia para la muestra evaluada, que va a depender, entre otros factores, de la concentración de antígeno rábico presente en la misma.

En este caso, el ensayo de potencia se llevó a cabo con el objetivo primario de evaluar si la respuesta inmune generada por las RV-VLPs es capaz de

proteger a los ratones de una posterior infección, o sea de confirmar la eficacia como vacuna de las RV-VLPs desarrolladas.

Debido a que, como se aclaró previamente, en el ensayo de potencia del NIH es necesario manipular virus de la rabia y que en nuestro laboratorio no es posible su manipulación debido a falta de la infraestructura correspondiente, estos ensayos fueron realizados en colaboración con otros laboratorios, entre los cuales se encuentra el Departamento de Rabia y Enfermedades de Pequeños Animales de SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). Cabe destacar que esta es la entidad encargada de la aprobación de cada lote de vacuna antirrábica veterinaria que sale al mercado en la Argentina.

Los resultados de la prueba de potencia llevada a cabo con una muestra de RV-VLPs purificadas demostraron que, más allá del valor final de potencia obtenido en el ensayo, la respuesta inmune inducida por nuestro candidato vacunal fue capaz de proteger a ratones inmunizados frente a una infección con el virus de la rabia activo. Una muestra de VLPs inyectada en una dilución 1/5 (dilución mayor utilizada en el ensayo) fue capaz de proteger al 91% de los animales vacunados (Fig. 85, en Anexo IV).

Una vez comparada con una muestra de vacuna de referencia, la muestra de RV-VLPs ensayada presentó un valor de potencia de vacuna antirrábica de  $1,1 \text{ UI.ml}^{-1}$ , valor por encima de la potencia mínima requerida para un lote de vacuna veterinaria ( $1 \text{ UI.ml}^{-1}$ ) (Wilbur y Aubert, 1996). La entidad regulatoria envió un resultado de ensayo informando que el lote de vacuna analizado fue aprobado.

### **2.6. Conclusiones parciales**

De los resultados obtenidos en esta etapa del trabajo se puede concluir que expresando solo la glicoproteína G del virus de la rabia en células HEK293 se pueden obtener VLPs que brotan hacia el sobrenadante de cultivo. Estas RV-VLPs son partículas circulares, con envoltura fosfolipídica y con un diámetro promedio de 60 nm, aproximadamente. La glicoproteína G se encuentra anclada en la membrana de las RV-VLPs y la densidad de las partículas es menor a la descrita para el virus de la rabia. Por otro lado, se pudo demostrar que las VLPs producidas son inmunogénicas, induciendo una respuesta inmune humoral comparable a la inducida por vacunas antirrábicas

comerciales. Además, se analizó la presencia de anticuerpos neutralizantes y, finalmente, se demostró que las RV-VLPs son capaces de proteger animales de experimentación a un desafío con el virus de la rabia activo. Estos resultados confirmaron a las RV-VLPs como candidato vacunal, por lo que se prosiguió con el trabajo, con el objetivo de obtener un clon celular productor.

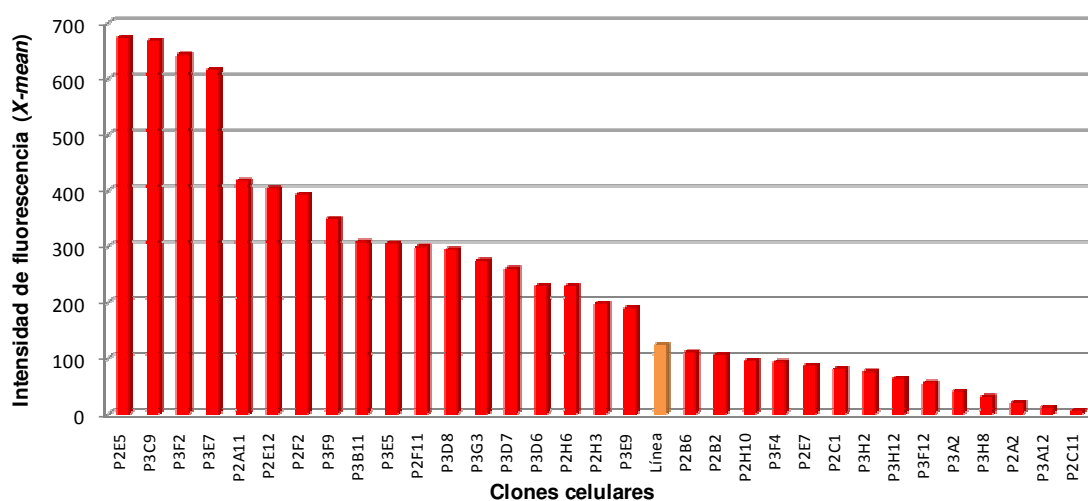
# **Obtención de un clon productor de RV-VLPs**

### 3. OBTENCIÓN DE UN CLON PRODUCTOR DE RV-VLPs

#### 3.1. Clonado de la línea celular LHEK-G y selección de un clon productor

A partir de los resultados de la sección anterior, y con el objetivo de incrementar el nivel de producción de RV-VLPs, se llevó adelante el clonado de la línea LHEK-G. La selección de un clon celular es un paso clave a la hora de obtener un cultivo productor de una proteína recombinante (o partículas pseudovirales en este caso) ya que, a diferencia de la línea celular, la expresión del transgen, como así también los parámetros de crecimiento y consumo de nutrientes y producción de metabolitos de un clon celular son homogéneos.

En este caso, el clonado se realizó llevando a cabo la técnica de dilución límite (Freshney, 2000), cultivando la línea LHEK-G en placas de 96 pocillos a razón de una célula por pozo. Luego de entre 10 y 15 días, los cultivos en los que se observó crecimiento de un solo clon celular fueron analizados por citometría de flujo (Fig. 49).



**Figura 49. Análisis del clonado celular de la línea LHEK-G por citometría de flujo.** Las células de cada clon fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-G (AB5), luego con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado al fluoróforo AlexaFluor 488 y, finalmente, analizadas por citometría de flujo. Se grafica la intensidad de fluorescencia (*X-mean*) obtenido para cada clon y, con otro color, el valor obtenido para la línea LHEK-G.

Ya que la misma línea celular LHEK-G poseía un porcentaje de células fluorescentes cercano al 100% (Fig. 28), en este caso se evaluó la intensidad de fluorescencia obtenida en la citometría de flujo (valor denominado *X-mean* por el software del equipo). La intensidad de fluorescencia presentada en la

citometría es proporcional al nivel de expresión de glicoproteína G y, por lo tanto, a la producción de RV-VLPs liberadas al sobrenadante de cultivo.

Del resultado de este ensayo fue seleccionado el clon adhP2E5 debido a que presentó el mayor nivel de expresión entre todos los clones analizados, con un valor 6 veces mayor al de la línea LHEK-G de origen.

### **3.2. Caracterización del clon productor adhP2E5**

La obtención de un clon productor a partir de una línea celular tiene dos motivos principales. En primer lugar, buscar el cultivo de mayor productividad. Dentro de una línea celular existen clones que poseen nivel de expresión mayor y otros menor que la línea de origen. Durante el desarrollo de un proceso de producción de un biológico se buscará seleccionar los clones que mayor productividad presenten, como aquí se muestra con el clon productor de RV-VLPs adhP2E5. Por otro lado, es muy importante que el cultivo productor posea un crecimiento homogéneo y, principalmente, que la expresión de la proteína de interés sea estable a lo largo del tiempo. Esto generalmente se logra con un clon celular y no con una línea, en la que la heterogeneidad celular es grande.

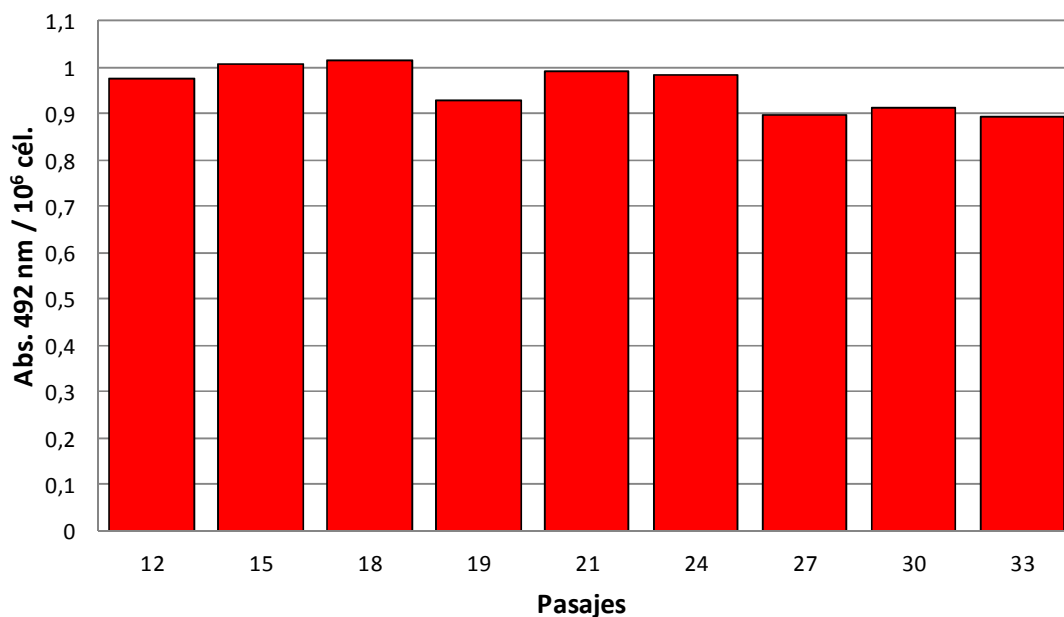
En este contexto, llevamos adelante la caracterización del clon adhP2E5 con el objetivo de poseer el mayor conocimiento posible del cultivo.

#### **3.2.1. Estabilidad**

Una vez seleccionado el clon adhP2E5, fue analizado para evaluar su estabilidad en el tiempo. El objetivo de estos experimentos fue evaluar, de forma semi-cuantitativa, si la producción de VLPs disminuía luego de un tiempo prolongado en las mismas condiciones de cultivo. Con esta finalidad, el clon adhP2E5 se mantuvo en cultivo, siendo subcultivado cada 48-72 h siempre a la misma concentración celular inicial (todos los “pasajes” se realizaron a  $1 \times 10^5$  cél.ml<sup>-1</sup>). Se cosechó el sobrenadante de cultivo luego de 72 h de expresión y se conservó a -20 °C para su posterior análisis.

Luego de 8 semanas de cultivo los sobrenadantes fueron descongelados y evaluados por ELISA sándwich. En este caso, ya que no se poseía un estándar para poder calcular la productividad específica de producción de RV-VLPs, se llevó a cabo un análisis semi-cuantitativo graficando la

absorbancia de cada muestra, en la región en la que las curvas eran paralelas, y se la refirió a un millón de células en el tiempo analizado (Fig. 50).



**Figura 50. Estudio de la estabilidad de expresión del clon adhP2E5, analizado por ELISA sándwich.** Se gráfica la absorbancia a 492 nm obtenida para cada muestra y luego referida a un millón de células en el intervalo de tiempo de producción analizado (72 h).

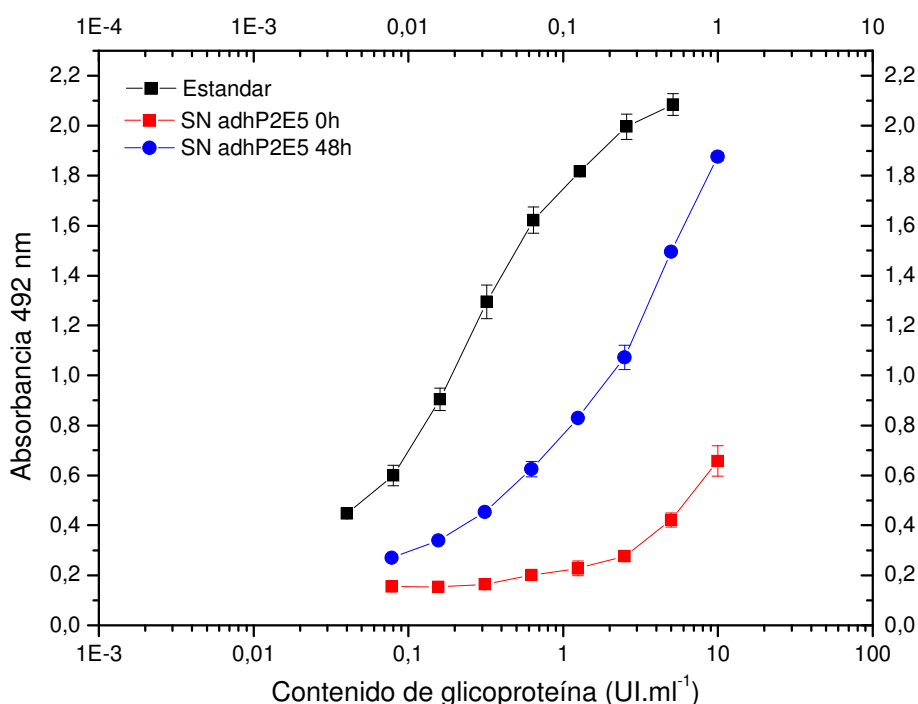
Como puede observarse en la figura 50, no se observó una tendencia de decaimiento de la expresión del clon adhP2E5 durante todo el tiempo de cultivo evaluado. Cabe destacar que el tiempo evaluado (casi 2 meses de cultivo) es muy superior a la duración de una posible fermentación en modo continuo, que puede durar un tiempo aproximado de 30 días.

### 3.2.2. Productividad

Luego, se evaluó la productividad específica de expresión de RV-VLPs del clon adhP2E5 por ELISA sándwich. En este caso, se utilizó como referencia el estándar internacional de vacuna antirrábica suministrado por la OMS (*6th International Standard for Rabies vaccine, NIBSC*). Este estándar puede ser utilizado en ensayos *in vivo*, para evaluar la potencia de vacuna antirrábica, y también en ensayos *in vitro* como inmunodifusión radial y ELISA, para evaluar la cantidad de antígeno rábico que posee la muestra, expresando el resultado en unidades internacionales (UI.ml<sup>-1</sup>) de contenido de glicoproteína G del virus de la rabia.

Para determinar la productividad específica del clon adhP2E5 se calculó el contenido de glicoproteína G en sobrenadantes de cultivo luego de 48 h de

expresión y se referenció al número de células promedio que existió en el cultivo durante ese tiempo (Fig. 51). Se obtuvo un valor de  $1,1 \times 10^{-6}$  UI.cel<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, aproximadamente unas 5 a 6 veces mayor que la productividad obtenida para la línea celular LHEK-G. ( $0,2 \times 10^{-6}$  UI.cel<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>), información que se corresponde con lo observado en la citometría de flujo durante la selección de clones (Fig. 50).



**Figura 51. Análisis de productividad específica del clon adhP2E5.** Se analizó por ELISA sándwich y se expresó en unidades internacionales de contenido de glicoproteína G por mililitro (UI.ml<sup>-1</sup>).

### 3.2.3. Análisis de la producción de lentivirus con capacidad de replicación (RCL)

Si bien no ha sido reportado en la bibliografía la detección de RCL, la probabilidad teórica de que ocurra existe, por lo cual es importante evaluarlo cuando se utilizan estos vectores virales recombinantes como herramienta de transferencia de material genético (FDA, 2006; Cornetta y col., 2009). El ELISA de p24 es el ensayo comúnmente más utilizado, ya que puede realizarse de forma simple y rutinaria (Sastry y col. 2003).

En este caso, y con el objetivo de detectar la proteína viral Gag (p24), se llevó a cabo el ELISA analizando muestras de sobrenadantes de cultivo del clon adhP2E5 pre y post-concentración por ultracentrifugación (300 veces), ya que si existieran RCL en un cultivo de adhP2E5 esas partículas virales



recombinantes se co-purificarían con las VLPs. El resultado del ensayo fue negativo para ambas muestras, confirmando que en el sobrenadante de cultivo del clon adhP2E5 no habría RCL o, por lo menos, no serían detectables con este método (el límite de detección de la metodología es  $0,33 \text{ ng.ml}^{-1}$  de p24).

Por otro lado, se llevaron a cabo ensayos de qPCR con el objetivo de detectar posibles inserciones de las secuencias codificantes de las proteínas lentivirales, en el genoma del clon adhP2E5. Se buscó la presencia/ausencia de secuencias correspondientes a la proteína de cápside (Gag), a la polimerasa viral (Pol) y a la glicoproteína (VSV-G). En estos ensayos de qPCR, en el cual es posible detectar una única copia de las secuencias *target*, el resultado fue negativo.

Cabe destacar que para realizar un análisis minucioso de la producción de RCL por parte de un cultivo recombinante generado utilizando LVs, deben llevarse a cabo también otros ensayos de referencia, especialmente el análisis de RCL en stocks de LVs utilizando células C8166, las cuales son permisivas a la infección y replicación del virus HIV-1, como así también la evaluación de la actividad transcriptasa reversa por ensayo FPERT (*Fluorescent Product Enhanced Reverse Transcriptase assay*) (FDA, 2006).

### **3.2.4. Análisis del número de copias del transgen**

Un estudio interesante de llevar a cabo para la caracterización de un clon productor, es el análisis del número de copias de transgen que fueron insertadas en su genoma. Esto es importante ya que, al poseer esa información, se puede evaluar la estabilidad de los insertos luego de un tiempo de cultivo, por ejemplo luego de una fermentación.

Con ese objetivo entonces, y utilizando un ensayo de qPCR, se detectaron en el genoma del clon productor adhP2E5 entre 1 y 2 copias del transgen.

### **3.2.5. Construcción de bancos celulares**

Una vez seleccionado adhP2E5 como clon productor, el cultivo fue amplificado para poder contar con gran cantidad de células y construir un banco celular maestro (MCB, *master cell bank*). El MCB es el resguardo más importante de células, a partir del cual se confeccionó el banco celular de trabajo (WCB, *working cell bank*).

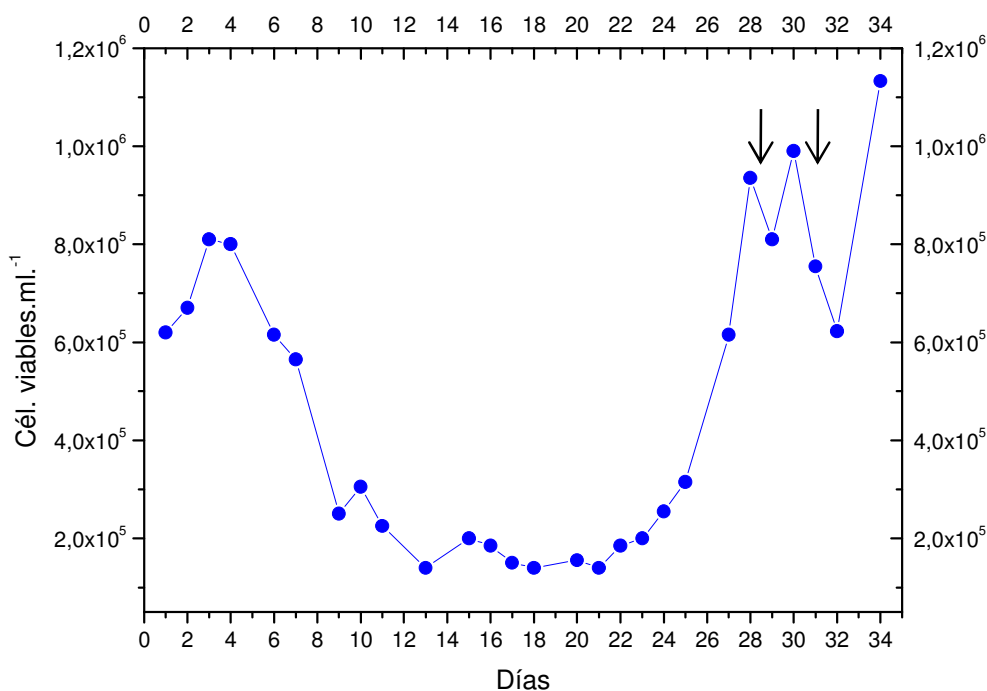
Es muy importante caracterizar los MCB y WCB una vez construidos. Existen descritos una larga lista de análisis a realizar sobre bancos celulares para ser utilizados en producción (Hess y col. 2012). En nuestro caso, los bancos celulares se analizaron para detectar posibles infecciones con micoplasma, virus y bacterias. Todos los análisis llevados a cabo con adhP2E5 resultaron negativos.

### **3.3. Adaptación a suspensión del clon productor adhP2E5**

Con dos objetivos principales se llevó a cabo el proceso de adaptación del clon adhP2E5 para su crecimiento en suspensión, en medio libre de suero (SFM, *serum free medium*). En primer lugar, la posibilidad de cultivar células animales sin la necesidad de anclaje da la posibilidad de llevar a cabo cultivos en gran escala, utilizando modos de producción continua durante tiempos prolongados, logrando así aumentar la productividad final del proceso. En segundo lugar, pero no menos importante, la utilización de SFM, y en algunos casos libres de componentes de origen animal (ADCF, *animal-derived component free*), posee diversas ventajas. Por un lado, el reemplazo del suero fetal bovino (SFB) en los medios de cultivo está altamente recomendado por las entidades regulatorias encargadas de la evaluación y aprobación de nuevos productos biofarmacéuticos, debido a que su utilización aumenta la posibilidad de contaminación con agentes adventicios como priones, virus y micoplasmas. Por otro lado, el SFB es el componente de mayor precio dentro de la formulación de los medios de cultivo para células animales, por lo cual la posibilidad de reemplazarlo es de gran interés en el desarrollo de un bioproceso. La utilización de SFM tanto para la producción de vacuna antirrábica en células BHK-21 y VERO, como en la utilización de células HEK293 para la producción de vectores virales para terapia génica, vacunas y otras aplicaciones ha sido ampliamente descrita en la bibliografía (Perrin y col., 1995; Kallel y col., 2002; Frazatti-Gallina y col., 2004; Liste-Calleja y col., 2013; Pichon y col., 2013; Cervera y col., 2013).

En el caso del clon adhP2E5 se llevó a cabo un protocolo para adaptar su crecimiento al medio comercial EX-CELL293 (SAFC Biosciences Inc.), específicamente desarrollado para el crecimiento de células HEK293 en suspensión y utilizado previamente en cultivos de células HEK293 productoras de VLPs (Mandell y col., 2010; Cervera y col., 2013).

Como puede observarse en la figura 52, una vez que el clon fue cultivado en 100% SFM (día 1), el mismo comenzó a disminuir su densidad celular hasta ingresar en una fase *lag*, manteniendo una concentración celular estable de aproximadamente  $2 \times 10^5$  cél.ml<sup>-1</sup>. Durante esta etapa, las células se observaban viables, sin la formación de agregados celulares considerables. Luego de aproximadamente 20 días de cultivo en estas condiciones, el cultivo comenzó a duplicarse nuevamente pudiendo observarse una clara fase de crecimiento exponencial, tras la cual las células recobraron su ritmo normal de crecimiento y una viabilidad por encima del 95%. El cultivo presentó células creciendo de forma individual sin presencia de agregados celulares, por lo cual se lo consideró adaptado a crecer en suspensión en SFM y fue re-nombrado como sP2E5.



**Figura 52. Adaptación a suspensión del clon adhP2E5.** Se utilizó el medio EX-CELL293 y un frasco Spinner con una agitación de 60 rpm. Las flechas indican momentos en donde la adición de medio de cultivo fresco generó un aumento del volumen final del cultivo con la consecuente disminución de la concentración celular.

Una vez adaptado, el clon sP2E5 fue trasvasado a un frasco *Schott* para ser cultivado con una mayor agitación, de 140 a 160 rpm, utilizando un incubador con agitador orbital (*CERTOMAT CT plus*, Sartorius). El objetivo fue adaptar al clon a crecer con una agitación mayor, más cercana a las utilizadas en cultivos en biorreactores, para poder llegar a altas densidades celulares (mayores a  $1 \times 10^7$  cél.ml<sup>-1</sup>). Luego de varios pasajes en estas condiciones, las

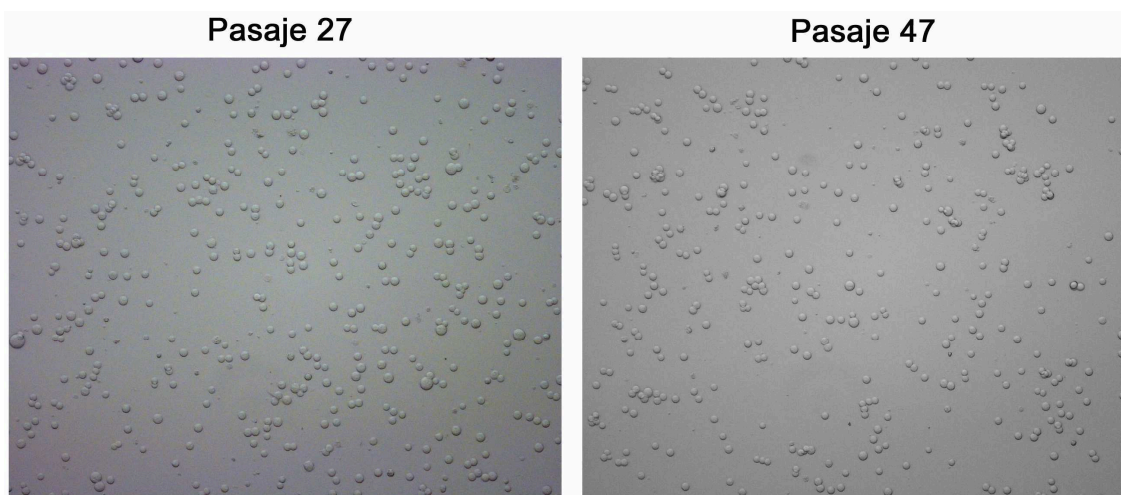
células del clon sP2E5 no presentaron problemas para crecer con esas velocidades de agitación, manteniendo estable su velocidad de crecimiento y viabilidad celular.

Posteriormente, el clon sP2E5 fue amplificado para construir un MCB, el cual fue conservado en nitrógeno líquido, y a partir del cual fue confeccionado el WCB.

### 3.3.1. Caracterización del clon sP2E5

Posteriormente, se estudió el comportamiento del clon celular sP2E5, obteniendo información sobre su cinética de crecimiento, producción de metabolitos y consumo de nutrientes, como así también se evaluó la expresión de la glicoproteína G del virus de la rabia en estas condiciones de cultivo.

En primer lugar, y con el objetivo de evaluar su estabilidad de crecimiento, sP2E5 se mantuvo en cultivo durante aproximadamente 2 meses, siendo subcultivado cada 48-72 h, en un frasco *Schott* con un volumen final de 30 ml, a una densidad celular de  $5 \times 10^5$  cél.ml<sup>-1</sup>, 160 rpm, 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Luego de 20 pasajes en cultivo el clon siguió creciendo de forma homogénea, manteniéndose su morfología celular y sin la formación de agregados o cúmulos celulares (Fig. 53).

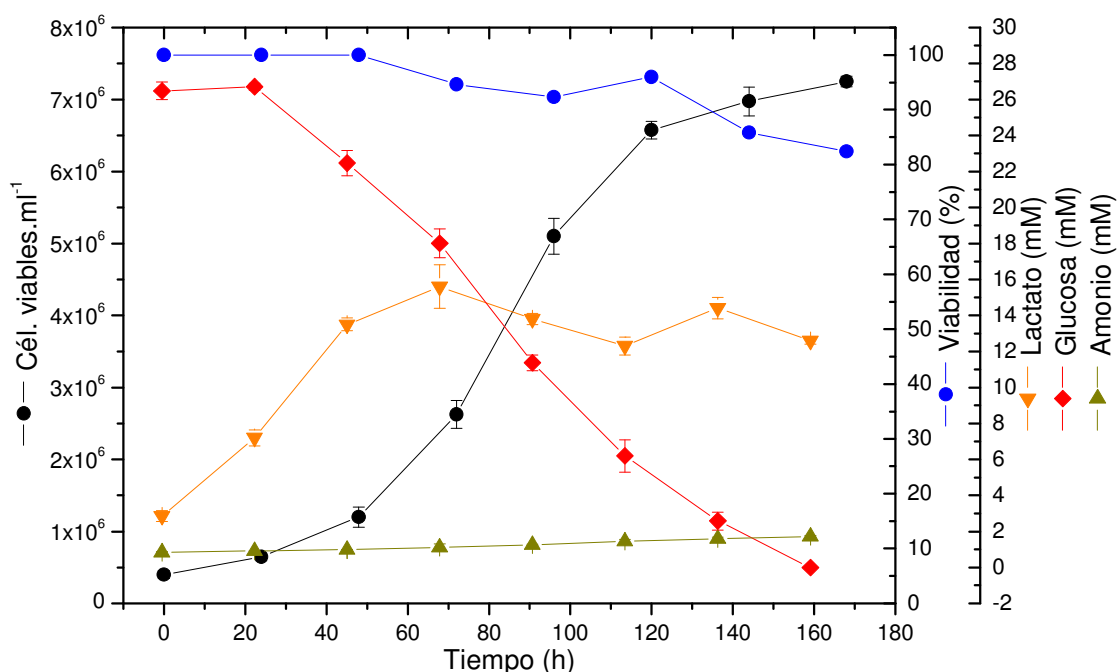


**Figura 53. Estabilidad morfológica del clon sP2E5.** Luego de 2 meses en cultivo (20 pasajes), las células mantuvieron su morfología y siguieron creciendo de forma homogénea y sin la formación de agregados celulares.

Los parámetros cinéticos de crecimiento del clon sP2E5 en medio EX-CELL293, como así también el consumo de nutrientes y producción de metabolitos fueron evaluados (Fig. 54). Luego de 8 días de cultivo, se pudo observar una densidad celular cercana a  $8 \times 10^6$  cél.ml<sup>-1</sup>, con una viabilidad

superior al 85%, demostrando que el clon sP2E5 es capaz de crecer en alta densidad en condiciones de cultivo *batch* y utilizando un SFM. En la tabla 4 se pueden observar los parámetros cinéticos calculados, para los cuales se obtuvieron valores similares a los publicados para células HEK293 cultivadas en modo *batch* (Petiot y col., 2011; Liste-Calleja y col., 2015).

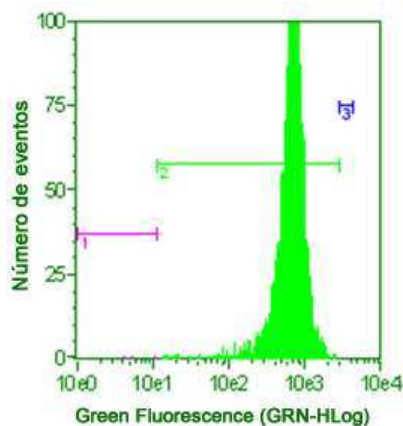
La expresión de la glicoproteína G en estas condiciones fue analizada por citometría de flujo, demostrando la homogeneidad de expresión por parte de sP2E5, ya que se pudo observar un pico angosto en el histograma obtenido en el ensayo (Fig. 55).



**Figura 54. Cinética de crecimiento del clon sP2E5 en condiciones de cultivo *batch* utilizando medio EX-CELL293.** Se analizó la concentración y viabilidad celular, el consumo de glucosa y producción de lactato y amonio.

**Tabla 4.** Parámetros cinéticos calculados para el clon sP2E5 en condiciones de cultivo *batch*.

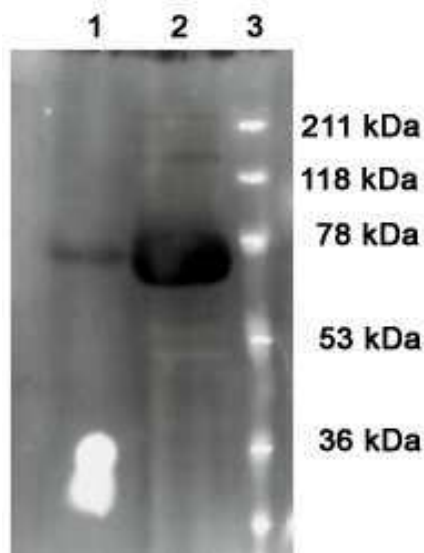
Parámetro	Valor
$\mu_{max}$	0,028 h <sup>-1</sup>
$q_{lactato}$	0,300 pmol.cél <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
$q_{glucosa}$	0,090 pmol.cél <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
$q_{amonio}$	0,001 pmol.cél <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>



**Figura 55. Análisis de la expresión de la glicoproteína G sobre la membrana del clon sP2E5, por citometría de flujo.** Las células fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-G (AB5) y posteriormente con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado al fluoróforo AlexaFluor 488. Marker 1: Células negativas. Marker 2: Células positivas.

### 3.3.2. Caracterización de las RV-VLPs producidas en SFM

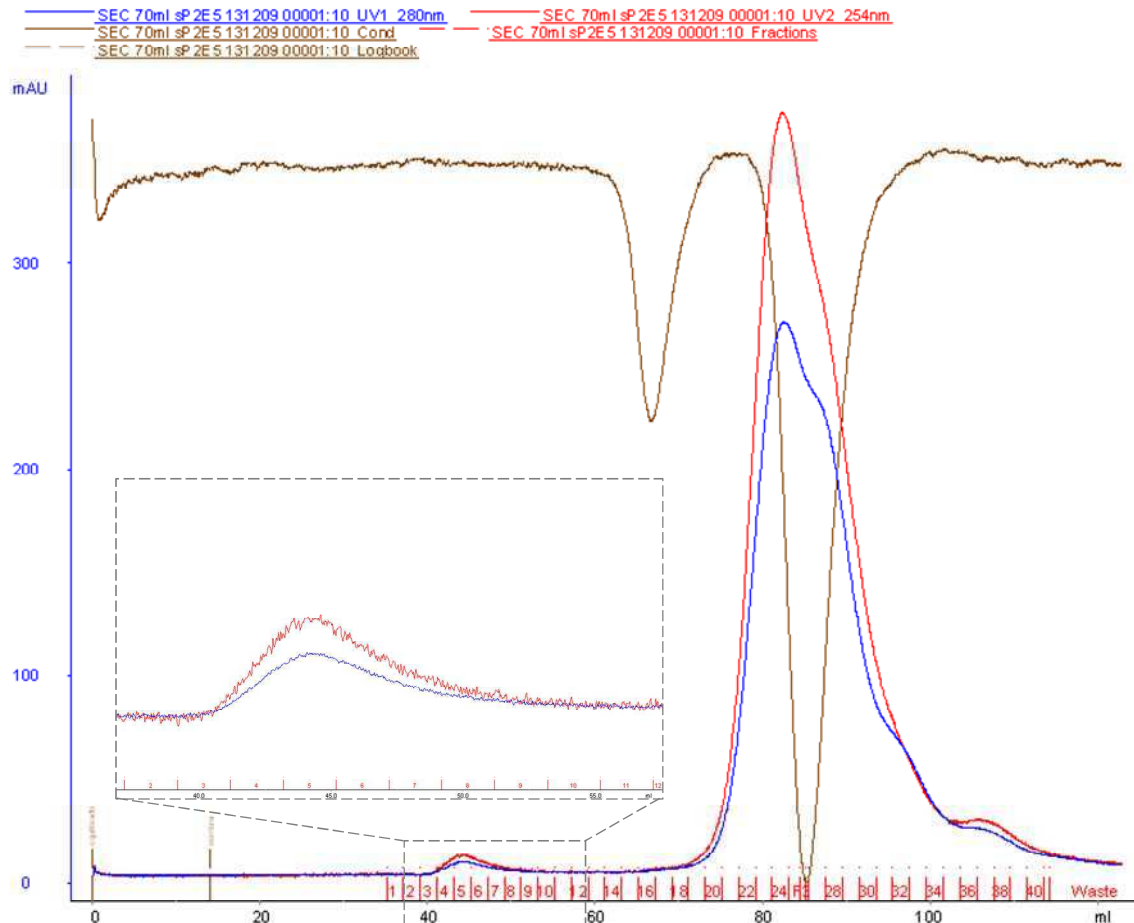
Posteriormente, se evaluó la producción de RV-VLPs en las nuevas condiciones de cultivo. A partir de sobrenadante del clon sP2E5, RV-VLPs fueron concentradas y purificadas por ultracentrifugación a través de un colchón de sacarosa al 30% y, luego, analizadas por *western blot*. En la figura 56 se puede observar que la glicoproteína G presentó el peso molecular esperado (62-67 kDa) y, además, mantuvo la capacidad de ser reconocida por los anticuerpos presentes en un suero policlonal anti-virus de la rabia.



**Figura 56. Análisis de la expresión de RV-VLPs por *western blot*.** Carril 1. Sobrenadante del clon sP2E5 sin purificar. Carril 2. RV-VLPs purificadas por ultracentrifugación a través de colchón de sacarosa. Carril 3. Marcador de peso molecular.

En los ensayos previos se demostró la expresión de la glicoproteína G por parte del clon sP2E5 en suspensión. Con el objetivo de analizar si la

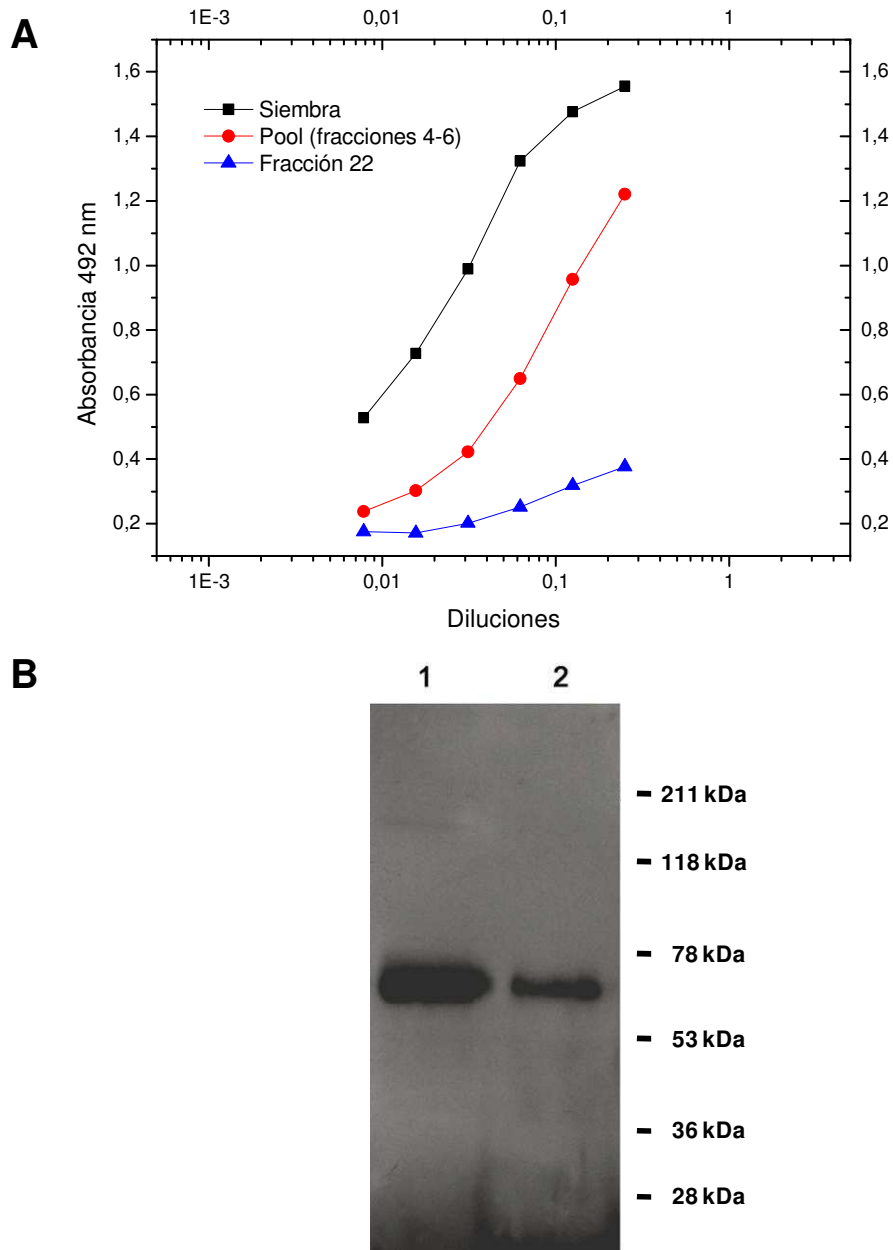
glicoproteína observada en los ensayos de citometría de flujo y *western blot* estaba formando parte de una partícula pseudoviral, y no estaba soluble en el sobrenadante de cultivo, se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular (SEC, *size exclusion chromatography*) utilizando una resina *Sephacryl S-500 HR* (GE Healthcare). Se esperaba que las RV-VLPs, debido a su gran tamaño, eluyeran en el volumen muerto de la columna y, si había presencia de glicoproteína G soluble, eluyera al final de la cromatografía.



**Figura 57. Purificación de las RV-VLPs por SEC.** Se utilizó una columna de 70 ml de volumen total y una resina *Sephacryl S-500*. En la siembra se utilizó una muestra de sobrenadante del clon sP2E5 y como buffer de elución una solución de Tris/HCl (20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 7). Durante la elución se tomaron fracciones de 2 ml.

Como puede observarse en el cromatograma (Fig. 57), durante la SEC se obtuvieron solo dos picos de absorbancia a 280 nm (color azul). Un primer pico, como se esperaba, apareció al comienzo de la cromatografía (fracciones de 4 a 6) y al ser analizado por ELISA sándwich y *western blot* (Fig. 58) se detectó la presencia de RV-VLPs en el mismo. Un segundo pico se presentó al final de la corrida, y al ser analizado por ELISA sándwich se detectó glicoproteína G en una cantidad menor al 10% de lo eluido en el pico anterior,

demostrando de esta forma que la mayor parte de la proteína que está siendo expresada está formando parte de las RV-VLPs.

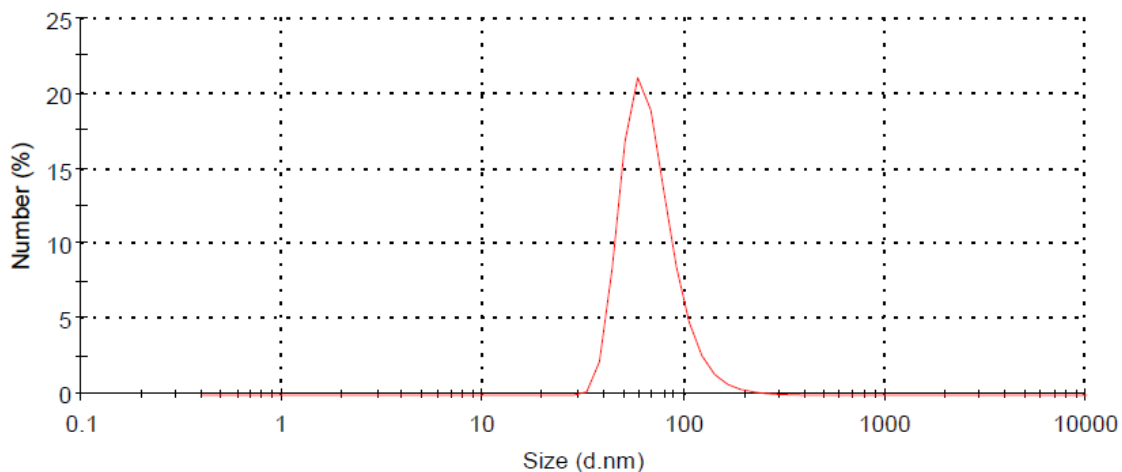


**Figura 58. Análisis de RV-VLPs purificadas por SEC. A.** ELISA sándwich. Las fracciones analizadas son las correspondientes a los picos obtenidos durante la SEC. **B.** *Western blot*. Carril 1: Siembra de la SEC (sobrenadante de sP2E5). Carril 2. Pool de elución (correspondiente a las fracciones 4-6).

Posteriormente, las RV-VLPs fueron analizadas por DLS con el objetivo de evaluar su tamaño promedio en solución y, de esa forma, poder analizar si hubo algún cambio con respecto a los valores previamente obtenidos para las VLPs producidas en cultivos en adherencia. El pool de elución obtenido en la SEC (fracciones 4-6) se evaluó por DLS y se obtuvo un valor promedio de



diámetro hidrodinámico de  $69 \pm 20$  nm (Fig. 59), demostrando que el tamaño de las RV-VLPs al ser producidas en estas condiciones de cultivo no se modifica.



**Figura 59. Análisis del diámetro de partícula por DLS, para RV-VLPs producidas en SFM.** Las muestras de RV-VLPs purificadas por SEC fueron analizadas con un equipo *ZetaSizer Nano ZS* (Malvern Instruments Ltd.). El software *Nanov510* fue utilizado para procesar los resultados y convertir la medida basada en intensidad a una distribución basada en el número de partículas (*Number %*).

### 3.4. Análisis de la inmunogenicidad de las RV-VLPs producidas en SFM

#### 3.4.1. Ensayos de protección: NIH *potency test*

Luego de haber confirmado la expresión de VLPs en cultivos en suspensión y utilizando SFM, se analizó si dichas partículas eran capaces de generar una respuesta inmune protectora en animales de experimentación como ya se había confirmado para las VLPs producidas en cultivos en adherencia. En este caso se estudió la diferencia en la potencia obtenida por VLPs purificadas por ultracentrifugación con y sin agregado de adyuvante. Se utilizó como adyuvante una solución de hidróxido de aluminio preparada en la solución de estabilización para vacuna antirrábica recomendada por la OMS (Reculard, 1996).

Los resultados del ensayo de potencia del NIH confirmaron que las RV-VLPs producidas por cultivos en suspensión utilizando SFM son inmunogénicas y capaces de proteger a animales vacunados de una infección con el virus de la rabia activo. En cuanto a la potencia, se obtuvieron valores de 1,3 y 1,5 UI.ml<sup>-1</sup> para las VLPs inyectadas sin y con hidróxido de aluminio como adyuvante, respectivamente (Fig. 86 y 87, en Anexo IV). Este resultado no solo confirmó la capacidad de protección de las RV-VLPs producidas en SFM, sino

que también demostró que estas VLPs son capaces de generar una respuesta inmune protectora sin el agregado de adyuvante. Esta propiedad de las VLPs está ampliamente descrita en la bibliografía y es una de las características que hace que sean muy buenos candidatos vacunales (Noad y Roy, 2003; Grgacic y Anderson, 2006; Ludwig y Wagner, 2007; Raghunandan, 2011).

Teniendo esto último en cuenta, se analizó la potencia como vacuna antirrábica de una muestra de RV-VLPs, pero sin concentrar ni purificar. Una muestra de sobrenadante de cultivo de sP2E5, conteniendo  $13,9 \text{ UI}\cdot\text{ml}^{-1}$  de contenido de glicoproteína cuantificado por ELISA sándwich, fue filtrada por  $0,45 \mu\text{m}$  y enviada a analizar. El resultado del ensayo de potencia de NIH entregado fue de  $1,6 \text{ UI}\cdot\text{ml}^{-1}$ , en cuanto a la potencia de vacuna antirrábica (Fig. 88, en Anexo IV). Cabe recordar que la potencia mínima requerida para una dosis de vacuna antirrábica veterinaria es de  $1 \text{ UI}\cdot\text{ml}^{-1}$ , por lo cual nuestro cultivo productor cumple satisfactoriamente este requerimiento.

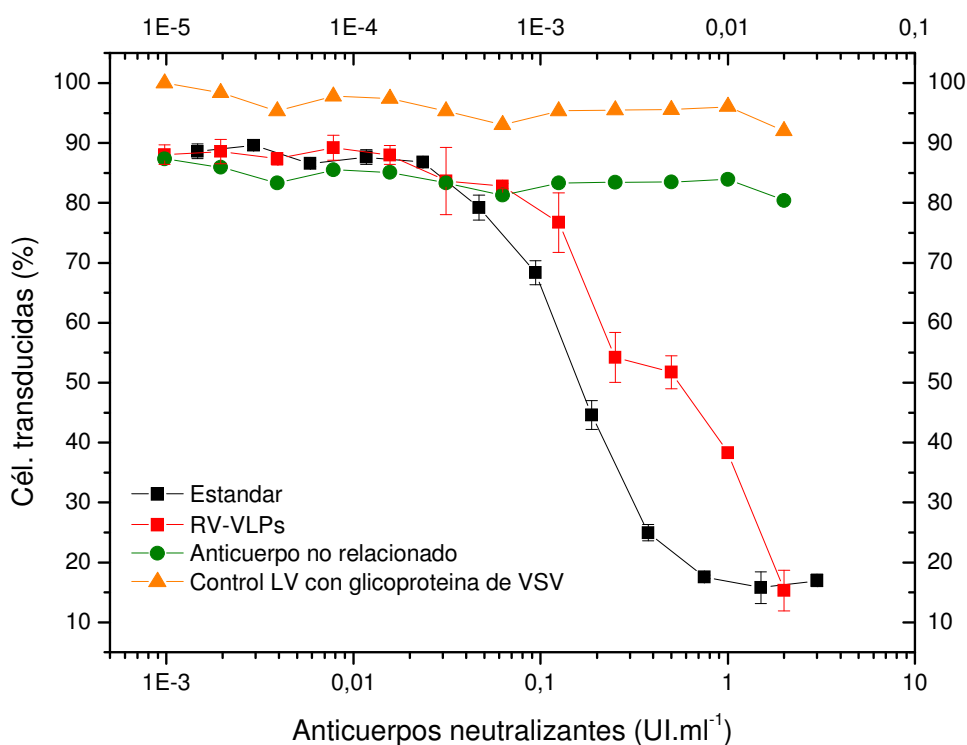
Este resultado es de gran relevancia ya que demostró que las VLPs pueden ser producidas y utilizadas como inmunógeno, sin pasos de concentración ni agregado de adyuvante, generando una respuesta inmune protectora. Estas características cobran particular importancia en la aplicación de las RV-VLPs como vacuna veterinaria, en la que los requerimientos de pureza y formulación del inmunógeno no son altos.

### **3.4.2. Anticuerpos neutralizantes**

Finalmente, se evaluó la inducción de anticuerpos neutralizantes por parte de las RV-VLPs producidas en estas condiciones. Como ya se discutió, durante una infección con el virus de la rabia la producción de anticuerpos neutralizantes es uno de los principales mecanismos utilizados por la respuesta inmune para impedir que el virus siga propagándose, vía nervios periféricos, hacia el sistema nervioso central, por lo cual el título de estos anticuerpos luego de una inmunización es el principal parámetro a medir para evaluar la efectividad de esta vacuna (Moore y Hanlon, 2010).

Teniendo esto en cuenta, se llevó a cabo el ensayo de detección de anticuerpos neutralizantes utilizando lentivirus recombinantes (Anexo III). Esta vez, con el objetivo de obtener un valor de concentración de anticuerpos, se utilizó un estándar internacional de referencia (*2nd International Standard for Anti-Rabies Immunoglobulin*, NIBSC).

Se evaluaron sueros obtenidos al inmunizar ratones Balb/c, por vía intraperitoneal, con RV-VLPs sin purificar. El esquema de inmunización fue exactamente el mismo que el que se realiza durante la prueba de potencia del NIH, solo que en el día del *challenge* en vez de realizar la inoculación intracerebral con el virus, se tomaron muestras de sueros y se evaluó la presencia de anticuerpos neutralizantes.



**Figura 60. Análisis de la capacidad neutralizante de los anticuerpos mediante citometría de flujo.** Una cantidad fija de lentivirus GFP son incubados con diluciones seriadas de los sueros a evaluar y, posteriormente, agregados a un cultivo de células HEK293. 72 h después, las células son analizadas por citometría de flujo para obtener el porcentaje de células transducidas. Un anticuerpo no relacionado fue utilizado como control y una muestra de estándar internacional como referencia. Muestras de sueros de animales vacunados fueron incubadas también con lentivirus pseudotipados con la glicoproteína VSV, para evaluar la especificidad del ensayo.

Como puede observarse en la figura 60, RV-VLPs no purificadas e inyectadas sin adyuvante fueron capaces de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes del virus de la rabia en animales de experimentación. Por otro lado, se calculó el título de anticuerpos neutralizantes para cada uno de los 4 ratones de cada grupo (Tabla 5) obteniéndose un valor promedio de 15,2 UI.ml<sup>-1</sup>. El valor del título de anticuerpos mínimo que representa una adecuada protección durante la vacunación antirrábica es de 0,5 UI.ml<sup>-1</sup>, establecido en la octavo reporte de expertos en rabia de la OMS (OMS, 2013).

**Tabla 5.** Título de anticuerpos neutralizantes obtenidos para cada ratón inmunizado con RV-VLPs producidas en SFM.

Ratón	Valor (UI.ml <sup>-1</sup> )
1	10,5
2	16,6
3	21,0
4	12,7
<b>Promedio</b>	<b>15,2</b>

### 3.5. Conclusiones parciales

A partir de los resultados obtenidos en esta etapa se puede concluir que sP2E5 es un clon celular que puede ser cultivado en SFM, sin la formación de agregados, con un crecimiento homogéneo y llegando a elevadas densidades en modo de cultivo *batch*. Las VLPs producidas en estas condiciones fueron analizadas y se demostró que sus características fisicoquímicas y bioquímicas no se vieron modificadas al cambiar el modo de cultivo de adherente a suspensión. El diámetro hidrodinámico de las partículas es de  $69 \pm 20$  nm y, analizando una muestra de cultivo por SEC, se demostró que el 90% de la glicoproteína presente está formando parte de las RV-VLPs y no de forma soluble. Por otro lado, se confirmó que sP2E5 produce VLPs inmunogénicas con capacidad de protección, aún sin el uso de adyuvantes. Además, se confirmó que estas RV-VLPs son capaces de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes.

Los resultados obtenidos confirmaron entonces que las RV-VLPs desarrolladas son un excelente candidato vacunal para rabia. Teniendo esto en cuenta y con el objetivo de optimizar la producción de RV-VLPs, el siguiente paso del trabajo fue el cambio de escala del proceso, llevando al clon a ser cultivado en modo continuo en biorreactor.

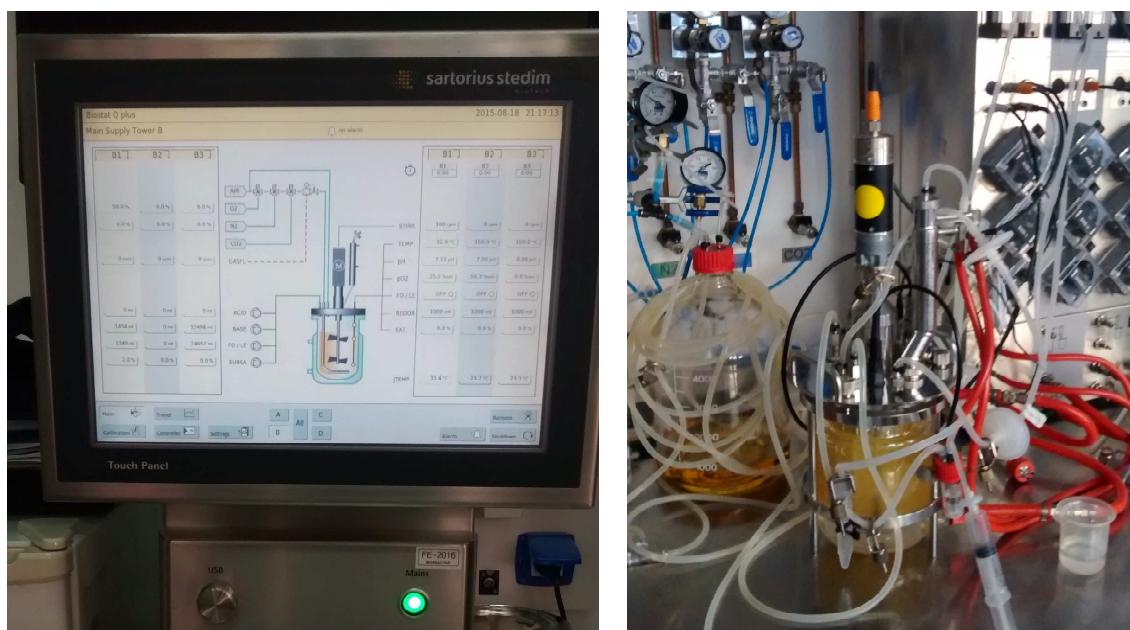
# **CAMBIO DE ESCALA DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE RV-VLPs**

#### 4. CAMBIO DE ESCALA DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE RV-VLPs

En las etapas previas del trabajo, se estudió y comprobó que las RV-VLPs desarrolladas son eficaces en la protección de individuos vacunados (animales de experimentación) a una infección con el virus de la rabia, demostrando que pueden ser utilizadas como antígeno vacunal. A su vez, se confirmó que la productividad del clon celular obtenido, sP2E5, cumple con los requisitos en cuanto a la potencia mínima exigida para una vacuna antirrábica veterinaria. En la presente etapa del trabajo, entonces, el objetivo fue llevar la producción de RV-VLPs a una mayor escala, estudiando el comportamiento del clon sP2E5 al crecer en un biorreactor para células animales. Ya que el sP2E5 produce de forma constitutiva las RV-VLPs, y al ser esta producción de VLPs no lítica ni perjudicial para la viabilidad del cultivo, se propuso un proceso continuo de producción, utilizando un sistema de perfusión.

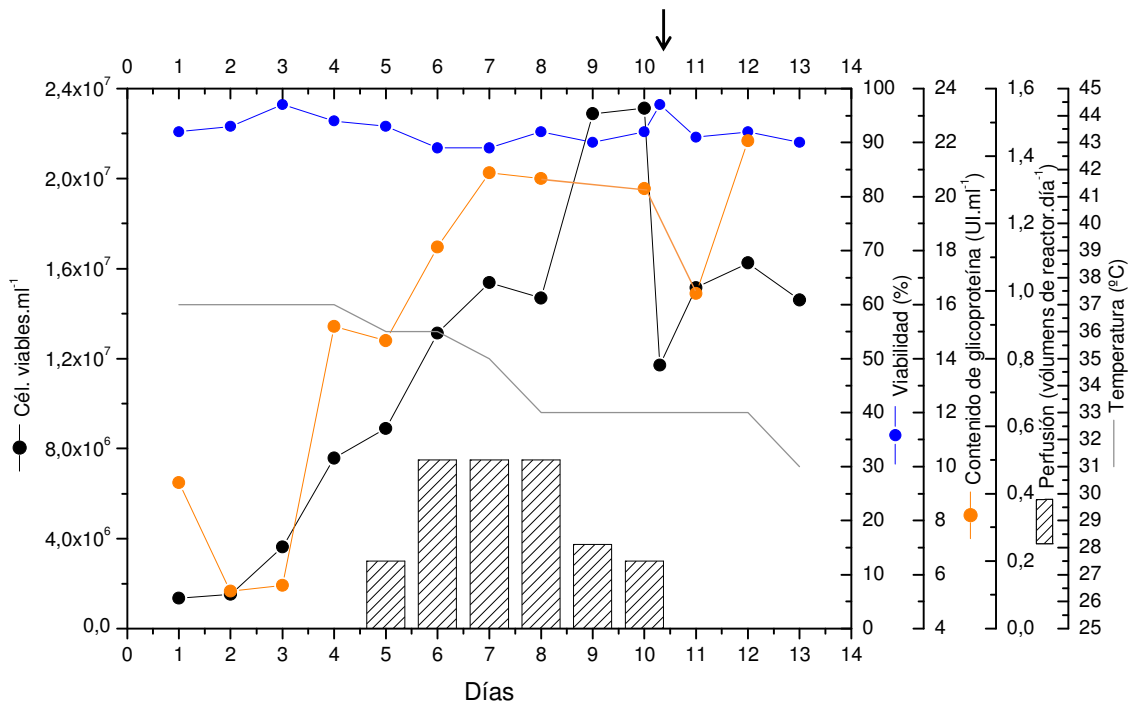
##### 4.1. Producción de RV-VLPs en biorreactor de 1 L operado en modo continuo

En primera instancia, se cultivó el clon sP2E5 en un biorreactor de 1 L de volumen de trabajo (*BIOSTAT QPlus*, Sartorius), operado de modo continuo y utilizando un filtro tipo *spin* como dispositivo de retención celular (Fig. 63).



**Figura 63. Producción de RV-VLPs en biorreactor de 1 L de volumen de trabajo.** El cultivo fue operado de modo continuo, utilizando un filtro de tipo *spin* para llevar a cabo la retención celular. El equipo posee toda la periferia necesaria para realizar un control *on-line* de todos los parámetros de cultivo, los cuales se fijaron en: una temperatura inicial de 37°C, 30% de pO<sub>2</sub>, un pH igual a 7,1 y una velocidad de agitación de 100 rpm.

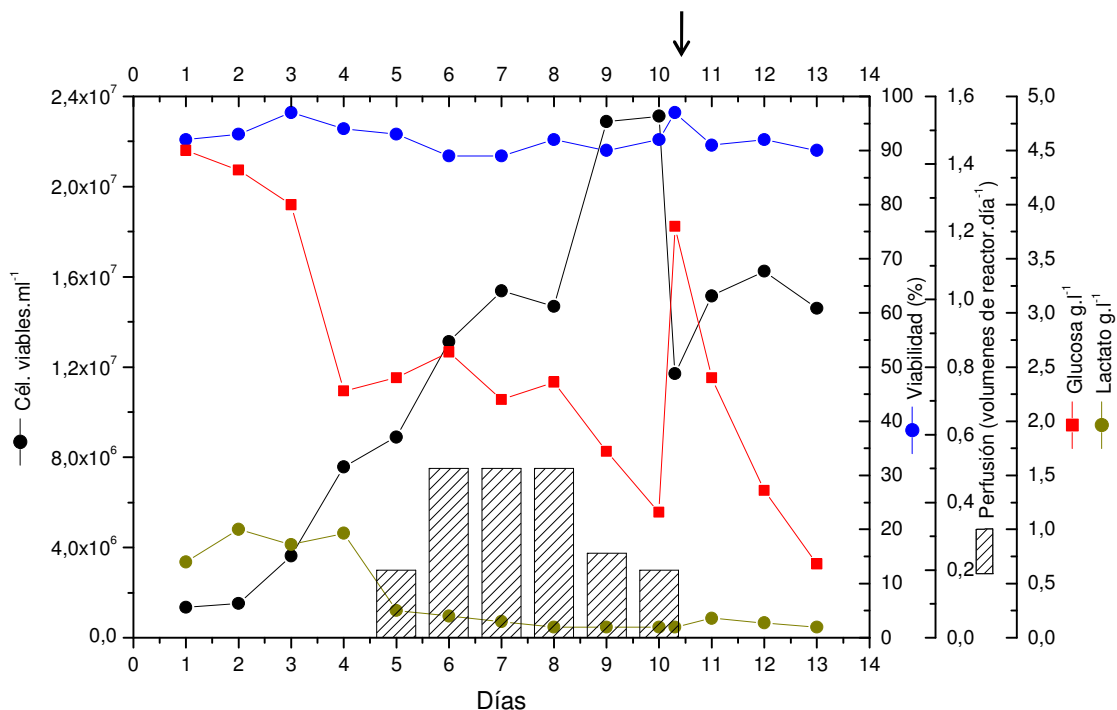
Los parámetros de cultivo fueron controlados de forma *on-line*, manteniendo una presión de oxígeno disuelto ( $pO_2$ , con respecto a la saturación con aire) de 30%, un pH de 7,1, agitación de 100 rpm y temperatura inicial de 37°C. Una muestra diaria fue analizada, calculando la concentración de células y viabilidad del cultivo, concentración de RV-VLPs producidas, como así también la concentración de glucosa y lactato en el medio. Estos valores fueron tenidos en cuenta para establecer, cuando fuera necesario, el caudal de perfusión aplicado en el biorreactor. La cosecha obtenida de la fermentación fue conservada a 4°C para su posterior análisis.



**Figura 64. Fermentación del clon sP2E5 en biorreactor de 1 L.** El clon sP2E5 se cultivó en modo continuo, durante 13 días, utilizando medio EX-CELL293. El día 10 se realizó un sangrado de medio volumen de reactor, manteniendo el volumen final del cultivo en 1 L, por lo cual se observa una brusca disminución de la densidad celular (↓). Se tomó muestra diaria, se calculó la concentración celular, viabilidad y se analizó por ELISA sándwich para cuantificar su contenido de glicoproteína.

El reactor fue inoculado con un cultivo de sP2E5 a una concentración inicial de  $1,3 \times 10^6$  células. $ml^{-1}$  en medio EX-CELL293. Como se observa en la figura 64, luego de un día de fase *lag*, el cultivo comenzó a crecer exponencialmente, llegando a una densidad celular máxima de  $2,3 \times 10^7$  células. $ml^{-1}$ . El biorreactor comenzó a perfundirse en el día 5 y el caudal varió entre 0,2 y 0,5 volúmenes de reactor por día, valores que son muy apropiados para las altas concentraciones celulares presentes en el reactor. La perfusión se

mantuvo en esos valores ya que la concentración de glucosa nunca fue limitante y la concentración de lactato no aumentó en ningún momento dentro del reactor (Fig. 65). Este último dato es importante ya que concentraciones de lactato superiores a 1,7-2 g.l<sup>-1</sup> (dependiendo de la línea celular utilizada) comienzan a ser inhibitorias del crecimiento celular y a afectar la viabilidad del cultivo y, por consiguiente, a la producción de la proteína recombinante.



**Figura 65. Fermentación del clon sP2E5 en biorreactor de 1 L.** El clon sP2E5 se cultivó en modo continuo, durante 13 días, utilizando medio EXCELL293. El día 10 se realizó un sangrado de medio volumen de reactor, manteniendo el volumen final del cultivo en 1 L, por lo cual se observa una brusca disminución de la densidad celular (↓). Se tomó muestra diaria y se calculó la concentración celular, viabilidad, como así también la concentración de glucosa y lactato.

Por otro lado, mientras la concentración celular aumentaba, se disminuyó la temperatura del cultivo (“suave hipotermia”), con el objetivo de disminuir la tasa de crecimiento e intentar, de esta forma, mantener la concentración entre 10 y 20x10<sup>6</sup> cél.ml<sup>-1</sup>. Además, está reportado que disminuyendo la temperatura de cultivo se logra un aumento de la productividad específica de proteínas recombinantes en diversas líneas celulares (Sunley y Butler, 2010), incluidas las HEK293 (Lin y col., 2015).

De esta forma, la temperatura se disminuyó de forma gradual hasta los 33 °C (Fig. 64), momento en el cual se observó una disminución del crecimiento celular (día 8 de cultivo), aunque inmediatamente las células lograron incrementar nuevamente su tasa de duplicación, aún a esta temperatura.



Debido a esto, y teniendo en cuenta que en el día 10 de cultivo la concentración celular se encontraba por encima de las  $2,3 \times 10^7$  cél.ml<sup>-1</sup>, se realizó un “sangrado” de medio volumen del biorreactor, manteniendo constante el volumen de trabajo en 1 L. En el sangrado se retira medio de cultivo conteniendo células, a diferencia de la perfusión, en la que la extracción de medio es libre de células, por lo cual la concentración celular en este caso fue disminuida *ex profeso*.

Finalmente, se puede ver que la producción de RV-VLPs se mantuvo durante toda la fermentación (Fig. 64). La fermentación fue concluida en el día 13 de cultivo y la cosecha obtenida, de aproximadamente 3,5 L, presentó un valor de concentración de 11,36 UI.ml<sup>-1</sup> en cuanto al contenido de glicoproteína G, evaluado por ELISA sándwich.

Estos resultados, que demostraron que el clon productor de RV-VLPs obtenido es capaz de ser cultivado en biorreactor, llegando a altas densidades celulares sin la formación de agregados, fueron el sustento para seguir aumentando la escala de producción y ensayar una fermentación en un biorreactor de 5 L.

#### **4.2. Producción de RV-VLPs en biorreactor de 5 L operado en modo continuo**

Se acondicionó un reactor de 5 L (BIOSTAT B, Sartorius), el cual se mantuvo en 4,5 L de volumen de trabajo (Fig. 66). La retención celular para lograr la perfusión fue llevada a cabo con un filtro tipo *spin*, y las condiciones de cultivo fueron las mismas de la fermentación anterior: 30% pO<sub>2</sub>, 37 °C, pH de 7,1 y agitación de 100 rpm.

En este caso, el inóculo inicial fue de  $3 \times 10^5$  cél.ml<sup>-1</sup>, generándose una fase *lag* de unos 5 días, luego de la cual el cultivo comenzó a crecer exponencialmente llegando a una concentración celular de  $1,7 \times 10^7$  cél.ml<sup>-1</sup> (Fig. 67). La perfusión se mantuvo entre 0,3 y 0,8 volúmenes de reactor por día y el comportamiento del cultivo en cuanto al consumo de glucosa y la producción de lactato fue similar al de la fermentación en biorreactor de 1 L.

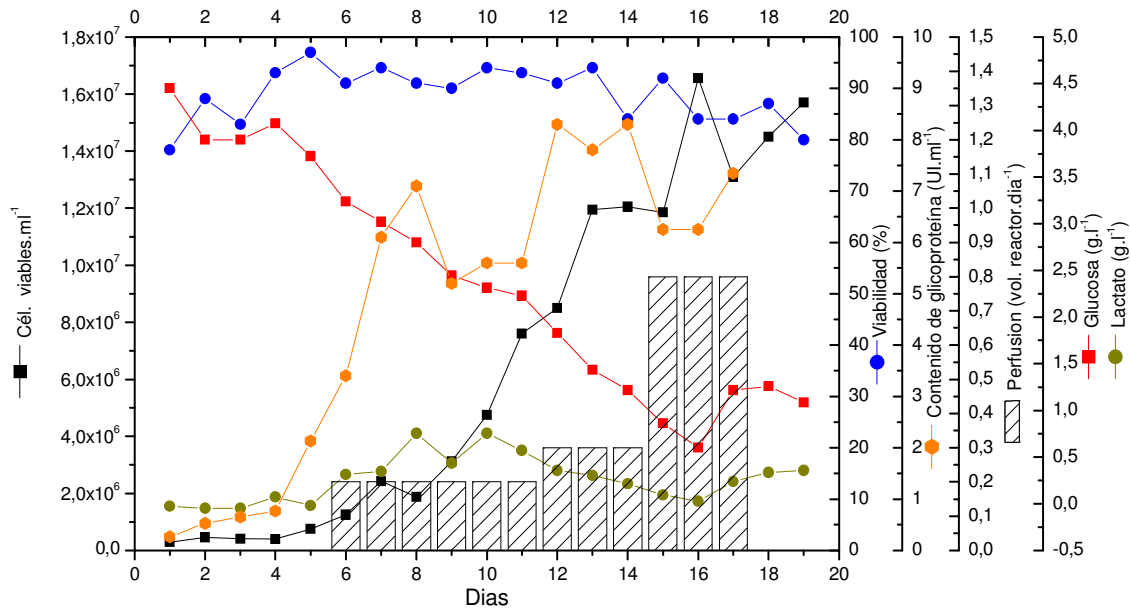


**Figura 66. Producción de RV-VLPs en biorreactor de 4,5 L de volumen de trabajo.** El cultivo fue operado de modo continuo, utilizando un filtro de tipo *spin* para llevar a cabo la retención celular. El equipo posee toda la periferia necesaria para realizar un control *on-line* de la temperatura,  $pO_2$ , pH y velocidad de agitación, como así también el caudal de perfusión.

Cabe destacar que, aún en densidades celulares en el orden de las  $1 \times 10^7$  cél.ml<sup>-1</sup>, el cultivo creció sin formación de agregados celulares (Fig. 68). Esto es importante ya que la presencia de agregados grandes en un cultivo en biorreactor puede ser muy perjudicial, aumentando las posibilidades de taponamiento de la malla de retención celular y, generalmente, disminuyendo la viabilidad del cultivo, ya que las células que quedan atrapadas en el interior de los agregados no poseen una buena transferencia de gases y nutrientes.

El cultivo se mantuvo durante 19 días, a lo largo de los cuales la producción de RV-VLPs fue continua. El análisis por ELISA sándwich de la

cosecha obtenida, de aproximadamente 20 L finales, presentó un valor de 9,1 UI.ml<sup>-1</sup>.



**Figura 67. Fermentación del clon sP2E5 en biorreactor de 5 L.** El clon sP2E5 se cultivó en modo continuo, durante 19 días, utilizando medio EXCELL293. Se tomó muestra diaria y se analizó en cuanto a la densidad celular, su viabilidad y concentración de glucosa y lactato, como así también se analizó por ELISA sándwich para cuantificar su contenido de glicoproteína.



**Figura 68. Clon sP2E5 cultivado en biorreactor, observado al microscopio óptico.** Una muestra del biorreactor, con una densidad celular de 1x10<sup>7</sup> cél.ml<sup>-1</sup> fue observada al microscopio óptico con el objetivo de analizar la formación de agregados celulares.

El resultado de la fermentación fue muy satisfactorio ya que, por un lado, la *performance* de crecimiento y producción de RV-VLPs en esta escala de cultivo fue muy buena y, por otro lado, se pudo ver que esta fermentación fue

comparable con la realizada en el biorreactor de 1 L. Esto último es importante ya que, en parte, la finalidad de llevar a cabo estos experimentos fue evaluar la reproducibilidad del proceso y la capacidad de escalamiento del mismo.

### **4.3. Potencia de vacuna antirrábica de las RV-VLPs producidas en biorreactor**

Finalmente, se buscó analizar la potencia de vacuna antirrábica de las RV-VLPs producidas en el biorreactor de 4,5 L de volumen de trabajo. Con ese fin, se llevó a cabo el ensayo de potencia del NIH con una muestra de la cosecha obtenida, sin concentrar ni purificar, solo clarificada por filtración con un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, y sin el agregado de adyuvante durante la inmunización de los animales. El resultado del ensayo presentó un valor de potencia de 1,3 UI.ml<sup>-1</sup> (Fig. 89, en Anexo IV), demostrando que las RV-VLPs producidas en estas condiciones son inmunogénicas y, además, poseen capacidad protectora. Por otro lado, teniendo en cuenta que la potencia mínima requerida para una dosis de vacuna antirrábica veterinaria es de 1 UI.ml<sup>-1</sup>, se puede decir que en esta fermentación se produjeron la cantidad de RV-VLPs suficientes para generar, aproximadamente y teniendo en cuenta el volumen de cosecha obtenida, unas 26.000 dosis veterinarias. Si se tiene en cuenta que generalmente, y como está recomendado por la OMS (Reculard, 1996), las vacunas antirrábicas para uso animal son formuladas con el agregado de adyuvante, esta misma fermentación podría rendir un mayor número de dosis. Teniendo esto en cuenta, podemos ver que el resultado obtenido fue muy satisfactorio, más aún teniendo presente que se logró en una sola fermentación, de menos de 20 días de duración.

### **4.4. Conclusiones parciales**

Los resultados obtenidos durante esta etapa final del trabajo fueron muy satisfactorio y, además, complementarios con los resultados presentados en las secciones anteriores ya que, utilizando el clon sP2E5 previamente obtenido, se logró producir RV-VLPs en biorreactores de 1 y 5 L. En ese sentido, se puede asegurar la escalabilidad del proceso de producción de VLPs.

Por otro lado, es importante destacar la capacidad del clon sP2E5 de ser cultivado de forma continua, pudiendo de esta manera prolongarse en el

tiempo la producción de RV-VLPs. Además, la expresión de RV-VLPs ocurre durante todas las fases de cultivo, efecto que no ocurre durante la producción de virus ya que se necesita una primera fase de crecimiento celular para luego pasar a la etapa de producción viral propiamente dicha. Por otro lado, la capacidad de las RV-VLPs de generar una respuesta inmune protectora con la producción de anticuerpos neutralizantes, siendo inyectadas sin ser previamente concentradas ni purificadas, es un resultado muy alentador. Podría proponerse esta tecnología, entonces, para el establecimiento de un proceso de producción de vacuna antirrábica veterinaria, ya que cumple con los requisitos en cuanto a potencia e inocuidad requeridos para tal fin. Las muestras de RV-VLPs producidas de esta manera recibieron un informe aprobado por parte de SENASA, entidad regulatoria nacional competente para tal fin.

# **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La rabia es una zoonosis viral que posee una mortalidad cercana al 100%. Esto es así ya que el virus de la rabia es neurotrópico, por lo cual una vez que el organismo es infectado, generalmente a través de la mordedura de un animal, ingresa al sistema nervioso vía nervios periféricos y avanza hacia el SNC (Fig. 19). Una vez allí, los síntomas clínicos aparecen y, hasta la actualidad, no existe terapia efectiva para contrarrestarlos. El único tratamiento disponible para la rabia es la vacunación post-exposición inmediatamente después del contacto con el virus y, cuando fuese necesario, la administración de inmunoglobulinas antirrábicas (OMS, 2007; Jackson, 2013; Hemachudha y col., 2013).

La fuente más común de contagio al ser humano es la saliva de animales infectados, por lo general perros que pudieron haber estado en contacto con murciélagos, los cuales son reservorio de rabia silvestre (Fig. 20). Debido a esto, la vacunación antirrábica de animales de compañía es una de las principales acciones para reducir la circulación del virus y disminuir, de esta forma, la probabilidad de contagio al ser humano (Davlin y VonVille, 2012). Además, a partir de la sanción de la Ley N° 22.953, que describe la tenencia responsable y sanidad de perros y gatos de compañía, la vacunación antirrábica es obligatoria en la República Argentina. Por otro lado, la rabia puede afectar también al ganado, sobre todo al bovino desarrollando lo que se conoce como rabia pareasante, generando grandes pérdidas de animales y, obviamente, reducción de ganancias (Shwiff y col., 2013).

Todo esto hace que la vacuna para rabia posea un rol fundamental en el control de la enfermedad, siendo necesaria una fuente continua y económica, tanto para uso humano como veterinario. Como se detalló en la introducción de esta tesis, las vacunas antirrábicas disponibles actualmente en el mercado utilizan tecnologías clásicas de producción y, en su gran mayoría, se basan en virus de la rabia inactivado (Ertl, 2009; Hicks y col., 2012; Yang y col., 2013).

En este contexto, se planteó la hipótesis del presente trabajo de tesis, cuyo objetivo general es el desarrollo de una plataforma de producción de una vacuna de nueva generación para rabia, sin la manipulación del virus activo en ninguna fase del proceso. Para tal fin, se ideó una estrategia para el desarrollo de una VLP para rabia, expresando en cultivo de células animales proteínas

estructurales del virus. Dentro de las 5 proteínas virales, la glicoproteína G es la de mayor importancia antigénica, siendo la única que posee capacidad de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes. A su vez, es capaz de generar la activación de LTC, induciendo una potente respuesta inmune celular (Macfarlan y col., 1986; Johnson y col., 2010). Además, es una proteína de membrana y cumple un rol estructural fundamental y dinámico en la formación de la partícula viral. En conjunto con la proteína M, inducen el brote de los viriones hacia el exterior de las células infectadas, como último paso del ciclo de replicación en el que la ribonucleoproteína viral adquiere su envoltura fosfolipídica (Fig. 25).

Por tal motivo, la estrategia se basó en evaluar la producción de RV-VLPs, expresando la glicoproteína G en células de mamífero. A su vez, se propuso analizar la co-expresión de la proteína M junto con la glicoproteína, evaluando las características de las RV-VLPs producidas, como así también los niveles de expresión obtenidos (Fig. 26). Con respecto a la plataforma celular a utilizar, se decidió evaluar tres líneas celulares: VERO y BHK-21, por ser las más utilizadas para la producción de vacunas antirrábicas para uso humano y veterinario, respectivamente, como así también evaluar la expresión de RV-VLPs en células HEK293, ya que es una línea celular ampliamente utilizada para la producción de vectores virales y, específicamente, VLPs (Le Ru y col. 2010; Roldão y col., 2010; Hess y col. 2012; Petiot y col., 2015).

De esta forma, se generaron líneas celulares recombinantes utilizando vectores lentivirales como sistema de transferencia de material genético. La expresión de glicoproteína G fue analizada por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia, confirmando la correcta localización de dicha proteína en la membrana plasmática de la célula. A su vez, la expresión de la proteína M fue analizada por RT-PCR, confirmando la presencia de ARN mensajero de dicha proteína, en las tres líneas celulares recombinantes que fueron generadas para tal fin. Posteriormente, se analizó la expresión de RV-VLPs en los sobrenadantes de las líneas celulares obtenidas. Utilizando un ensayo de ELISA sándwich, se pudo ver que las células HEK293 fueron las que presentaron mayor nivel de expresión (Fig. 31), mientras que las células BHK-21 y VERO demostraron una expresión menor o no detectable (Fig. 39 y 35, respectivamente). Este resultado fue sorprendente, teniendo en cuenta los



niveles de expresión de glicoproteína G evidenciados en los ensayos de microscopía de fluorescencia y citometría de flujo, en los que todas las líneas recombinantes presentaron un porcentaje de células fluorescentes cercanos al 100% (Fig. 28, 32 y 36). Esto planteó, entonces, la posibilidad de que el tipo celular estuviera influyendo directamente en el *budding* de RV-VLPs hacia el sobrenadante, independientemente de la cantidad de glicoproteína G en la membrana. Los ensayos de ensamblado de LVs recombinantes llevado a cabo utilizando cada una de estas líneas celulares como células empaquetadoras (Tabla 3) demostraron que, efectivamente, el tipo de línea celular tiene un rol protagónico en el proceso de *budding* viral. Los títulos de LVs obtenidos fueron entre 2 y 3 órdenes de magnitud menores para las células BHK-21 y VERO que los obtenidos para HEK293.

Teniendo en cuenta estos resultados se decidió proseguir el trabajo con las dos líneas recombinantes HEK293 y dejar de lado, momentáneamente, las líneas recombinantes BHK-21 y VERO. Esto no significa que no sea viable la utilización de dichas células para la producción de RV-VLPs, sino que habría que trabajar en la optimización de los niveles de expresión y, por ejemplo, en la adición de suplementos al medio de cultivo que promuevan la producción de partículas virales.

Con el objetivo de caracterizar las RV-VLPs obtenidas y evaluar la posibilidad de utilizarlas como vacuna, las siguientes etapas del presente trabajo de tesis se focalizaron en las líneas recombinantes LHEK-G y LHEK-G/M. A partir de sobrenadantes de cultivo de dichas líneas celulares se concentraron y purificaron RV-VLPs, que fueron evaluadas en cuanto a su densidad, tamaño y forma. Se pudo observar que las RV-VLPs expresadas por ambas líneas celulares poseen las mismas propiedades, no pudiendo confirmar si la proteína M expresada por la línea LHEK-G/M logra incorporarse a la estructura de las VLPs. Sin embargo, cabe recordar que la estrategia de co-expresar ambas proteínas en un mismo cultivo celular se planteó solo con el objetivo de evaluar si la presencia de M induce una mejora en el brote de partículas al sobrenadante, o sea, aumenta la expresión de RV-VLPs. Como se analizó por ELISA sándwich a partir de sobrenadantes (Fig. 31), ambas líneas presentaron el mismo nivel de expresión. Teniendo esto en cuenta y, además, considerando que no está descrito que la proteína M juegue un rol importante

en la inducción de respuesta inmune durante una infección, cosa que sí ocurre para la glicoproteína G se decidió seguir el desarrollo del proyecto con la línea celular LHEK-G.

El siguiente paso del trabajo consistió en evaluar si las RV-VLPs producidas por dicha línea celular eran capaces de generar una respuesta inmune en animales de experimentación. Con este objetivo se llevó a cabo un plan de inmunización, pudiendo confirmarse la producción de anticuerpos específicos y, además, se demostró que los títulos obtenidos fueron comparables con los inducidos por vacunas antirrábicas para uso humano y veterinario (Fig. 46). Además, se confirmó que los anticuerpos producidos tienen capacidad neutralizante (Fig. 48). Este último resultado es de gran importancia ya que durante una infección con el virus de la rabia estos anticuerpos juegan un rol fundamental en el control del avance del virus hacia el SNC. El estudio de la producción de anticuerpos neutralizantes en el análisis de un nuevo candidato vacunal para rabia es central y es el principal parámetro de protección a evaluar (Moore y Hanlon, 2010).

Con el fin de estudiar y caracterizar la respuesta inmune inducida por un antígeno vacunal, diversos son los estudios que pueden llevarse a cabo. Es muy importante analizar qué tipo de respuesta se induce, Th1 o Th2, y la relación entre ambas, evaluando entonces si la respuesta será mayoritariamente humoral o celular. Entre los experimentos a llevar a cabo, se pueden plantear la cuantificación de citoquinas específicas producidas durante una estimulación con el antígeno, como por ejemplo IL-4, IL-5, y/o IL13 que son características de una respuesta Th2, o citoquinas como la IL-2, INF- $\gamma$  y/o TNF- $\alpha$  que son características de una respuesta Th1. Se pueden llevar a cabo también estudios de marcadores celulares por citometría de flujo (CD4+, CD8+), evaluar la capacidad del antígeno de ser internalizado por las APC, especialmente las CDs, como así también estudiar la memoria inmunológica inducida (Moser, 2010). Sin embargo, la prueba de concepto para un candidato vacunal siempre debe demostrar que, más allá del tipo de respuesta inmune que se desarrolle, se genera protección frente a una infección con el patógeno. Es por esto que, durante esta etapa del proyecto, se decidió dedicar especial atención a los ensayos de protección. Además, al realizar estos experimentos

se obtuvo información acerca de la potencia de la muestra evaluada, datos interesantes para poder evaluar la productividad del proceso.

Por lo tanto, se llevó a cabo el test de potencia de vacuna antirrábica de referencia (NIH *potency test*) con una muestra de RV-VLPs producida por la línea celular LHEK-G. Estos experimentos, realizados en los laboratorios de SENASA, confirmaron que las RV-VLPs no solo inducen la producción de anticuerpos específicos y que estos anticuerpos poseen capacidad neutralizante, sino también que la respuesta inmune inducida es capaz de proteger a los individuos vacunados frente a una infección con el virus de la rabia activo (Fig. 85, en Anexo IV).

Los resultados discutidos hasta aquí demostraron, entonces, que expresando la glicoproteína G en células HEK293 se pueden obtener VLPs para el virus de la rabia, y que dichas RV-VLPs son un excelente candidato vacunal para la enfermedad.

A partir de estos resultados, se avanzó con el desarrollo del proceso de producción de vacuna antirrábica, basado en la expresión de las RV-VLPs hasta aquí descritas. A partir de la línea celular LHEK-G se obtuvo un clon celular productor, denominado adhP2E5. Se construyeron los respectivos MCB y WCB, los cuales fueron analizados en cuanto a la contaminación con micoplasmas, bacterias y hongos.

En esta etapa del trabajo, se evaluó qué modo de producción podría llevarse a cabo utilizando a adhP2E5 como clon productor. Utilizando este cultivo en adherencia se pueden utilizar plataformas de cultivo específicas para tal fin, como son los frascos *Roller* o *Cell Factory*, entre otros, utilizando medios de cultivo suplementados con SFB, como lo hacen muchas empresas para la producción de vacunas virales. Aunque muy simples, estos sistemas de producción no son fácilmente escalables, ya que requieren de una infraestructura edilicia grande, con habitaciones enteras dedicadas a la incubación de cientos de frascos de cultivo, y una gran cantidad de personal entrenado para la manipulación de los mismos. Es por esto que se planteó la opción de aprovechar toda la experiencia de nuestro laboratorio en la adaptación de cultivos a su crecimiento en suspensión, utilizando SFM, y llevar a cabo la adaptación de adhP2E5 a dichas condiciones.

Los resultados obtenidos fueron satisfactorios, obteniendo al cabo de aproximadamente 20 días de adaptación un cultivo de HEK293 en suspensión, sin la formación de agregados y con capacidad de llegar a altas densidades celulares (Fig. 52, 53 y 54). Además, las RV-VLPs producidas en estas condiciones de cultivo no difirieron en cuanto a sus características morfológicas y fisicoquímicas. Se estudiaron también las propiedades inmunogénicas de las RV-VLPs producidas en suspensión y utilizando SFM, demostrando que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes (Fig. 60) y que son capaces de proteger a los individuos vacunados, aún siendo inyectadas sin el uso de adyuvante (Fig. 86 y 87, en Anexo IV). De esta forma, se pudo concluir que el clon sP2E5 representa la base de una plataforma de producción de una vacuna biosegura para rabia.

Finalmente, se trabajó para incrementar la escala de producción de RV-VLPs a partir del clon celular desarrollado. Para tal fin, sP2E5 fue cultivado en biorreactores de 1 y 5 L, operados en modo continuo y utilizando SFM. Los resultados de las fermentaciones (Fig. 64 y 67) demostraron la escalabilidad del proceso, logrando obtener un perfil de crecimiento, perfusión y productividad similares en las dos escalas. Además, se pudo confirmar que el clon sP2E5 es capaz de producir RV-VLPs durante todo el cultivo, tanto en fase exponencial de crecimiento como en fase estacionaria. De esta forma, no son necesarias etapas diferenciales de cultivo para producir la vacuna, como ocurre durante la producción de virus, demostrando así la eficiencia del bioproceso desarrollado. Por último, al evaluar la potencia de vacuna antirrábica obtenida en el cultivo en biorreactor de 5 L, se obtuvo un valor de  $1,3 \text{ UI}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Fig. 89, en Anexo IV), lo que representa una cantidad aproximada de 26.000 dosis de vacuna veterinaria, producidas a razón de 1300 dosis por día de cultivo, en un proceso totalmente bioseguro que puede ser llevado a cabo en un laboratorio sin requerimientos de contención viral, como ocurre normalmente en los procesos de producción de vacunas convencionales.

Como se discutió en la introducción del presente manuscrito, la aplicación de este tipo de vacuna es doble. Por un lado, puede ser utilizada en el campo de la veterinaria, para lo cual el proceso cumple todos los requerimientos necesarios, tanto de potencia como de inocuidad, habiendo

recibido un informe aprobado por parte de SENASA, entidad regulatoria competente para tal fin. Por otro lado, la posibilidad de ser utilizada para la formulación de una vacuna para uso humano. Este último punto está dentro de las perspectivas de trabajo de este proyecto, para lo cual se está trabajando en un proceso de purificación de RV-VLPs y en el desarrollo de los métodos de análisis de calidad del producto.

En definitiva, todos los resultados obtenidos demuestran que el bioproceso desarrollado representa una excelente opción para la producción de una vacuna de nueva generación, totalmente biosegura y efectiva para el virus de la rabia.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### 1.1. Líneas celulares procariotas

- *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen). Se empleó para el aislamiento y la amplificación de diferentes plásmidos.

### 1.2. Medios de cultivo para células procariotas

La esterilización de los medios de cultivo para bacterias se realizó en autoclave durante 15 min a 1 atmósfera y 120 °C. A continuación se detallan los medios de cultivo empleados:

#### 1.2.1. Medio LB (Luria Bertani):

- Triptona 10 g.l<sup>-1</sup> (Sigma)
- extracto de levadura 5 g.l<sup>-1</sup> (BD)
- NaCl 10 g.l<sup>-1</sup> (Sigma)
- pH 7,2

#### 1.2.2. Medio LB-Antibiótico:

- Medio LB
- Antibiótico: ampicilina 100 µg.ml<sup>-1</sup> (Bagó) o kanamicina 100 µg.ml<sup>-1</sup> (Sigma), según corresponda

#### 1.2.3. Agar LB:

- Medio LB
- Agar al 2% (P/V) (Sigma)

#### 1.2.4. Agar LB-Antibiótico:

- Agar LB
- Antibiótico: ampicilina 100 µg.ml<sup>-1</sup> (Bagó) o kanamicina 100 µg.ml<sup>-1</sup> (Sigma), según corresponda

### 1.3. Purificación de ADN plasmídico

Los plásmidos fueron purificados a partir de cultivos de bacterias transformadas en medio líquido (Medio LB-Antibiótico). Todos los métodos de purificación se basan en el tamaño relativamente pequeño de los plásmidos y su naturaleza circular cerrada covalentemente.

#### 1.3.1. Minipreparación de ADN plasmídico

Se utilizó el kit comercial *Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system* (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante,

- Protocolo:

1. A partir de colonias individuales de cultivos en medio Agar-LB-Antibiótico inocular frascos conteniendo 10 ml de Medio LB-Antibiótico y cultivar durante 16-20 h con agitación a 180 rpm y a 37°C.
2. Centrifugar a 2.500 *g* durante 10 min 1,5 ml del cultivo en un tubo Eppendorf. Descartar el sobrenadante y repetir este procedimiento con otros 1,5 ml de cultivo.
3. Resuspender el *pellet* celular con 250 µl de Solución de Resuspensión y adicionar 250 µl de Solución de Lisis Celular. Invertir el tubo 4 veces.
4. Inmediatamente, adicionar 10 µl de solución de proteasa alcalina, invirtiendo el tubo 4 veces e incubando a temperatura ambiente 5 min.
5. Agregar 350 µl de Solución de Neutralización e invertir el tubo varias veces. Se centrifugó a 5.000 *g* por 10 min.
6. Tomar el sobrenadante (aproximadamente 850 µl) y transferir a una columna de purificación, colocada dentro de un tubo colector. Centrifugar a 5.000 *g* durante 1 min y descartar el *flowthrough*.
7. Agregar a la columna 750 µl de Solución de Lavado, centrifugar 1 min a 5.000 *g* y repetir el lavado con 250 µl, centrifugando 2 min.
8. Posteriormente, transferir la columna de purificación a un tubo Eppendorf nuevo y eluir el ADN plasmídico agregando sobre la resina de la columna 100 µl de agua Milli Q autoclavada. Dejar reposar un momento y centrifugar 1 min a 5.000 *g*.

Por último, evaluar la integridad de los plásmidos mediante electroforesis en gel de agarosa.

### 1.3.2. Maxipreparación de ADN plasmídico

Con la finalidad de obtener cantidades suficientes de los vectores de expresión y de los vectores empaquetadores, se llevaron adelante preparaciones de ADN plasmídico en gran escala, tal como se describe a continuación:

1. Inocular 10 ml de medio de cultivo LB-Antibiótico con una colonia proveniente de medio LB-Agar-Antibiótico e incubar a 37°C a 180 rpm durante 16 h.



2. Adicionar a este precultivo 90 ml de LB-Antibiótico y cultivar durante otras 8 h en las mismas condiciones.
3. Inocular con este precultivo 200 ml de LB-Antibiótico y cultivar durante 16-20 h adicionales en las mismas condiciones.
4. Centrifugar los cultivos a 2.500 *g* durante 10 min a 4°C.
5. Resuspender el *pellet* en 10 ml de TEG estéril (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM; glucosa 1% (P/V), pH 8,3), transferir la suspensión celular a un tubo cónico de 50 ml y mantener en hielo durante 5 min.
6. Agregar 20 ml de NaOH 0,2 M, SDS 1% (P/V), y homogeneizar adecuadamente para lograr la lisis celular en hielo durante 5 min.
7. Adicionar 15 ml de Acetato de potasio 5 M (pH 5,2) a 4°C (Solución de Neutralización), homogeneizar e incubar en hielo durante 10 min.
8. Centrifugar 10 min a 4°C a 2.500 *g*.
9. Filtrar el sobrenadante con papel de filtro, en tubos cónicos de 50 ml. Precipitar con 0,6 volúmenes de isopropanol (Baker), incubando 15 min a -70°C.
10. Centrifugar 20 min a 2.500 *g*, a 4°C y eliminar el sobrenadante.
11. Resuspender el *pellet* en 1 ml de etanol 80% (V/V) en TN (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0) transferir a un tubo Eppendorf. Centrifuga 1 min a 13.000 *g*.
12. Disolver el *pellet* obtenido en 1 ml de LiCl 2 M con el propósito de precipitar el ARN. Mantener en hielo por 60 min.
13. Centrifugar la solución obtenida por 2 min a 13.000 *g* y transferir el sobrenadante a dos tubos Eppendorf nuevos (mitad de sobrenadante a cada tubo).
14. Agregar 250  $\mu$ l de fenol y luego 250  $\mu$ l de cloroformo a cada tubo, agitar y centrifugar la mezcla 2 min a 13.000 *g*. Tomar la fase acuosa superior de ambos tubos y juntar en un único tubo.
15. Precipitar con 1 volumen de isopropanol, agitar y mantener 15 min a -70°C. Centrifugar 15 min a 4°C a 13.000 *g* y lavar el *pellet* con 50  $\mu$ l de etanol 80% (V/V) en TN, centrifugando 5 min.
16. Disolver el *pellet* en 500  $\mu$ l de TE (Tris-HCl 25 mM, NaCl 100 mM, pH 8,3) 0,5 X conteniendo 100  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> de RNAsa A (Promega) e incubar 60 min a 37°C, para eliminar restos de ARN.

17. Repetir paso 14.
18. Agregar a la fase acuosa 50 µl de acetato de sodio 3 M (pH 7.0) y 900 µl de isopropanol. Agitar e incubar 15 min a -70°C, de modo de precipitar el ADN plasmídico. Centrifugar 15 min a 13.000 *g* a 4°C y el *pellet* generado con 50 µl de etanol 80% (V/V) en TN.
19. Dejar secar a 37°C en baño seco termostatzado.
20. Disolver el *pellet* en 300 µl de agua estéril determinar la concentración y pureza del ADN plasmídico obtenido.

#### **1.4. Determinación de la concentración y pureza del ADN**

Medir la absorbancia de las muestras a  $\lambda = 260$  nm y  $\lambda = 280$  nm, en espectrofotómetro UV-visible (Ultrospec 2000 GE Healthcare) y calcular la concentración y pureza de los plásmidos, según las siguientes ecuaciones.

$$\text{Concentración de ADN} (\mu\text{g. ml}^{-1}) = DO(260 \text{ nm}) \times 50 \frac{\mu\text{g. ml}^{-1}\text{ADN}}{DO} \times \frac{1}{\text{Dilución}}$$

$$\text{Pureza de la muestra} = \frac{DO (260 \text{ nm})}{DO (280 \text{ nm})}$$

El valor de pureza debe estar comprendido en el rango entre 1,8 y 2,0. Por fuera del mismo, la solución no es considerada apta para su uso en transfección de células eucariotas, ya que posee una cantidad considerable de contaminantes (proteínas, reactivos utilizados en la extracción, entre otros) que podrían afectar la eficiencia de la misma.

#### **1.5. Digestiones enzimáticas**

Las digestiones con endonucleasas de restricción (Promega) se realizaron respetando los medios y condiciones recomendados el fabricante. En todos los casos, la reacción se llevó a cabo durante 2 h a 37°C, empleándose de 1 a 5 U de enzima por cada µg de ADN, en un volumen final de 20 µl. Luego de las digestiones enzimáticas, los fragmentos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa para su posterior análisis y/o purificación.

### **1.6. Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

Para la preparación del gel:

1. Pesar 1 g de agarosa (Sigma) y disolver en 100 ml de buffer TAE (Tris-acetato 40 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1mM, pH 8), calentando en horno microondas.
2. Dejar enfriar la solución hasta 60°C y adicionar 10 µL de SYBR*Safe DNA gel Stain* (Invitrogen).
3. Dejar solidificar el gel sobre el soporte, a resguardo de la luz, utilizando un peine de tamaño deseado.

Para llevar a cabo la electroforesis:

4. Preparar las muestras de ADN con buffer de siembra 6X (Ficoll 400 10% (P/V), azul de bromofenol 0,25% (P/V), Na<sub>2</sub>EDTA 50 mM, Tris 10 M pH 7,5) y sembrarlas en sus respectivas calles.
5. Incluir un marcador de peso molecular si es necesario estimar la longitud de los fragmentos de ADN separados (*Bench Top 1kpb DNA Ladder*, Promega).
6. Aplicar un voltaje de 80 V durante 30 min o hasta que el frente de corrida se desplace la distancia requerida.
7. Examinar el gel utilizando un transiluminador *Safe Imager* (Invitrogen) y fotografiar.

### **1.7. Precipitación de ADN**

1. Llevar la muestra a volumen final de 200 µl con agua autoclavada.
2. Adicionar un volumen de acetato de sodio 3 M equivalente al 10% del volumen y agitar.
3. Agregar entre 2 y 3 volúmenes de etanol absoluto e incubar a -70°C durante 20 min.
4. Centrifugar a 13.000 *g* durante 15 min a 4°C y lavar con 200 µl de etanol 70% (V/V) frío.
5. Volver a centrifugar a 13.000 *g* durante 2 min a 4°C y secar el *pellet* en baño seco termostatzado a 37°C durante 10 min.
6. Resuspender el *pellet* de ADN en 50 µl de agua Milli Q autoclavada.

### 1.8. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN separados por electroforesis en geles de agarosa fueron purificados utilizando el *kit* comercial *QIAquick Gel Extration Kit* (QIAGEN), siguiendo las recomendaciones del fabricante, como se describe a continuación:

1. Separar con bisturí la fracción de gel conteniendo la banda de interés y colocar dentro de un tubo Eppendorf. Agregar 3 volúmenes de solución QG por cada volumen de gel (100 mg de gel equivalen aproximadamente a 100  $\mu$ l).
2. Incubar durante 10 min en baño de agua a 50°C, mezclando por inversión cada 2-3 min.
3. Transferir la muestra a una columna de purificación (*QIAquick spin column*) dentro de su respectivo tubo colector y centrifugar durante 1 min a 13.000 *g*.
4. Descartar el sobrenadante y agregar 0,5 ml de solución QG a la columna, volviendo a centrifugar de la misma manera.
5. Para lavar, agregar 0,75 ml de solución PE centrifugando durante 1 min a 13.000 *g*. Descartar el sobrenadante y centrifugar de la misma manera, para descartar toda la solución PE residual.
6. Transferir la columna a otro tubo Eppendorf y eluir el ADN con 50  $\mu$ l de agua Milli Q autoclavada.
7. Analizar una alícuota mediante electroforesis en gel de agarosa y determinar la pureza y la concentración de los fragmentos mediante lectura espectrofotométrica.

### 1.9. Reacciones de ligación de ADN

Para las reacciones de ligación se utiliza una determinada relación inserto/plásmido en un volumen de reacción de 20  $\mu$ l, utilizando la enzima *T4 DNA Ligase* (Invitrogen), según el protocolo indicado por el proveedor. La mezcla de reacción se incuba durante toda la noche a 4°C. El control de plásmido religado se lleva a cabo reemplazando el volumen correspondiente al inserto por agua autoclavada.

Luego de la reacción de ligación, se utiliza la mezcla de reacción obtenida para transformar células *Escherichia coli* competentes.

**1.10. Preparación de células *Escherichia coli* TOP 10 competentes, por el método químico**

1. A partir de un banco celular de *Escherichia coli* TOP 10 conservado a  $-70^{\circ}\text{C}$ , realizar una estría sobre una placa de Agar-LB e incubar durante 16-20 h a  $37^{\circ}\text{C}$ .
2. Escoger una colonia e inocular con ella 5 ml de caldo LB (cultivo *starter*), incubando a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 18 h con agitación a 180 rpm.
3. Realizar un subcultivo tomando 500  $\mu\text{l}$  del cultivo *starter* a 50 ml de medio M (LB;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 mM, glucosa 0,2% (P/V)) y cultivar durante 150 min a  $37^{\circ}\text{C}$  y 180 rpm.
4. Incubar el cultivo en baño de hielo durante 10 min y luego recuperar por centrifugación a 2.500  $g$  por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .
5. Descartar el sobrenadante y resuspender el *pellet* celular en 500  $\mu\text{l}$  de medio M frío.
6. Agregar 2,5 ml de *storage solution* (medio LB conteniendo glicerol 36% (P/V), PEG 12% (P/V) (MW7500, Sigma),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  12 mM, esterilizado por filtración con membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ ) y mezclar completamente mediante agitación suave.
7. Finalmente, dispensar alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  en criotubos (Greiner Bio-One) fríos, y conservar inmediatamente a  $-70^{\circ}\text{C}$ .
8. Realizar un control de las células competentes preparadas, para asegurar la continuidad en la esterilidad del cultivo y estimar la eficiencia de transformación. Para esto, descongelar 2 criotubos y transformarlos con 100 ng de un vector plasmídico conocido (control positivo) y sin ADN (control negativo). Las células competentes serán utilizadas sólo cuando la placa del control negativo no muestre desarrollo de colonias y cuando se obtenga buena eficiencia de transformación en el control positivo.

**1.11. Transformación de células competentes**

1. Retirar un criovial de células competentes del freezer y mantener en hielo.
2. Agregar al tubo la muestra de ADN a ser transformada e incubar 30 min en baño de hielo.

3. Transferir a baño termostatzado a 42°C durante 2 min y colocar inmediatamente en baño de hielo.
4. Agregar 700 µl de medio LB e incubar 60 min a 37°C.
5. Luego, centrifugar a 2.500 g durante 5 min.
6. Descartar 600 µl de sobrenadante y resuspender el *pellet* en el volumen remanente de medio de cultivo.
7. Distribuir homogéneamente sobre una placa conteniendo Agar-LB-Antibiótico e incubar durante 16-20 h a 37°C.

### 1.12. Reacciones de PCR

Para las reacciones de PCR se utilizó la enzima ADN polimerasa *PlatinumPfx* (Invitrogen), preparando la mezcla de reacción de acuerdo con las instrucciones del fabricante:

Reactivo	Concentración final	Volumen (por tubo de reacción)
<b><i>Pfx Amplification Buffer 10X</i></b>	1 X	5,0 µl
<b>dNTPs 10 mM</b>	0,3 mM cada uno	1,5 µl
<b>Oligonucleótidos <i>Forward</i> 10 µM <i>Reverse</i> 10 µM</b>	0,3 µM 0,3 µM	1,5 µl 1,5 µl
<b>MgSO<sub>4</sub> 50 mM</b>	1 mM	1 µl
<b>Templado</b>	10 pg - 200 ng	X µl
<b><i>Platinum Pfx</i></b>	1 - 2,5 U	0,5 µl
<b>Agua</b>	-	csp 50 µl

Las reacciones se llevan a cabo en termociclador de acuerdo con el siguiente programa:

Paso 1: Desnaturalización inicial:	94°C	2 min
Paso 2: Desnaturalización:	94°C	1 min
Paso 3: <i>Annealing</i>	XX°C	0,5 min
Paso 4: Extensión	68°C	XX min
Volver al paso 2:	30 veces	
Paso 5: Extensión	68°C	10 min
Paso 6: Conservación	4°C	

La temperatura de *annealing* y el tiempo de extensión variaron según el fragmento de ADN a amplificar. Para las secuencias de la glicoproteína G y la proteína M del virus de la rabia se utilizaron los siguientes:

Reacción de amplificación	Forward primer	Reverse primer	Temperatura de <i>annealing</i>	Tiempo de extensión
Glicoproteína G	RV651fw	RV2254rev	60°C	1,5 min
Proteína M	M2fw	M2rev	50°C	1 min

Siendo las secuencias de cada oligonucleótido, las siguientes:

Oligonucleótido	Secuencia (sentido 5´-3´)
RV651fw	TGGGTACCGCTAGCGCCACCATGCC
RV2254rev	ATGAGCGGCCGCTCATCACAGTCCG
M2fw	GGGGCTAGCCATGAACTTTCTACGTAAGATA
M2rev	GCCGCGGCCGCGGTACCGTCGACTTATTCTAGAAGCAGA

### 1.13. Reacciones de RT-PCR

Para la detección de ARN mensajero en las células HEK293 se llevó adelante un protocolo de extracción de ARN total, para luego realizar una reacción de retrotranscripción, obteniendo así el ADN copia que se utilizó luego como templado para una reacción de PCR específica.

#### 1.13.1. Extracción de ARN total

Se utilizó el kit comercial *RNeasy mini* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante, como sigue a continuación.

1. Cosechar entre  $4$  y  $5 \times 10^6$  células totales y centrifugar 5 min a  $300 g$  a TA.
2. Remover el sobrenadante cuidadosamente con pipeta. Asegurarse de que quede la menor cantidad posible de medio de cultivo.
3. Lisar las células mediante el agregado de buffer RLT. Agregar  $600 \mu\text{l}$  del reactivo por cada  $5-10 \times 10^6$  células totales. Pipetear generosamente para realizar una buena mezcla.
4. Homogeneizar el lisado pasándolo al menos cinco veces por una aguja de  $0,9$  mm colocada en una jeringa estéril.

5. Añadir un volumen de etanol 70% (V/V) y homogeneizar con pipeta.
6. Transferir 700  $\mu$ l a la columna colocada en un tubo de recolección de 2 ml.
7. Centrifugar 15 seg. a 10.000 rpm y descartar el *flowthrough*.
8. Añadir 700  $\mu$ l del buffer RW1 a la columna y centrifugar 15 segundos a 10.000 rpm para lavar la membrana de la columna. Descartar el *flowthrough*.
9. Remover cuidadosamente la columna del tubo de recolección para evitar que entre en contacto con el *flowthrough*, y colocar en un tubo nuevo.
10. Añadir 500  $\mu$ l del buffer RPE a la columna. Centrifugar 15 segundos a 10.000 rpm para lavar la membrana de la columna. Descartar el *flowthrough* y conservar el tubo de recolección.
11. Repetir el paso 10, centrifugando 2 min a 10.000 rpm.
12. Remover cuidadosamente la columna y colocarla en un tubo de recolección de 1,5 ml nuevo.
13. Añadir 30-50  $\mu$ l de agua libre de RNAsa a la columna y centrifugar 1 min a 10000 rpm para eluir el ARN.
14. Determinar la concentración y pureza del ARN obtenido.
15. Conservar a -70 °C.

### 1.13.2. Reacción de retrotranscripción (RT)

Para obtener el ADN copia a partir del ARN purificado se utilizó la enzima M-MLV *Reverse Transcriptase* (Promega) y un oligonucleótido específico para la cola de poli-A presentes en los ARN mensajeros.

1. Agregar entre 1 y 4  $\mu$ g de ARN purificado en un volumen final de 15  $\mu$ l de agua autoclavada.
2. Desnaturalizar la muestra, calentando 5 min a 65 °C y llevando rápidamente a baño de hielo.
3. Preparar la muestra de reacción agregando los siguientes componentes:



<b>Componente</b>	<b>Volumen por reacción</b>
<b>5X M-MLV Buffer</b>	6 $\mu$ l
<b>5 mM dNTP mix</b>	2 $\mu$ l
<b>Oligo dT (10 <math>\mu</math>M)</b>	0,5 $\mu$ l
<b>Templado ARN</b>	15 $\mu$ l (del paso 2)
<b><i>M-MLV Reverse Transcriptase</i></b>	0,2 $\mu$ l
<b>Agua</b>	csp 30 $\mu$ l

4. Programa de ciclado:

Paso 1:	22 °C	15 min
Paso 2:	30 °C	15 min
Paso 3:	37 °C	15 min
Paso 4:	42 °C	90 min
Paso 5:	80 °C	5 min
Paso 6:	94 °C	30 seg

5. Conservar a -20 °C hasta su utilización.

**1.13.3. Reacción de PCR a partir del ADNc**

Se lleva adelante una reacción de PCR como se describe en el apartado 1.12 de esta sección, utilizando como templado 1  $\mu$ l de la reacción de RT previamente descrita.

**1.14. Criopreservación de cepas bacterianas**

1. Cultivar durante 18 h a 37 °C en medio LB o medio LB-Antibiótico.
2. Posteriormente, tomar 800  $\mu$ l del cultivo fresco y trasvasar a un criovial (Greiner Bio One).
3. Adicionar 200  $\mu$ l de glicerol 50% (V/V) estéril (Cicarelli), homogeneizando para asegurar la distribución del glicerol.
4. Conservar a -70 °C.

**1.15. Revitalización de cepas bacterianas**

1. Tomar una pequeña porción de material criopreservado e inocularlo en medio LB, en caso de bacterias no transformadas, o en medio LB-antibiótico, para bacterias recombinantes.
2. Incubar a 37°C durante 16 h.
3. Utilizar el cultivo para el fin necesario.

## **2. TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR**

### **2.1. Líneas celulares**

#### **2.1.1. HEK293T/17 (ATCC, CRL-11268)**

Es un clon que deriva de la línea celular HEK293, establecida a partir de riñón de embrión humano por Graham en 1977 (Graham y col., 1977). El clon 293T/17 fue modificado para generar la expresión del antígeno T del virus SV40. Durante su cultivo en adherencia se utilizó medio DMEM suplementado con 10% (V/V) de SFB. Para su adaptación y posterior cultivo en suspensión de un clon celular HEK293 fue utilizado el medio de cultivo EX-CELL293 (SAFC).

#### **2.1.2. VERO (ATCC, CCL-81)**

Esta línea celular fue establecida a partir de riñón normal de mono verde africano adulto, en 1962 por Yasumura y Kawakita en la Universidad de Chiba, Japón. Para su cultivo se utilizó medio MEM suplementado con 10% (V/V) de SFB.

#### **2.1.3. BHK-21 (ATCC, CCL-10)**

La línea parental de este cultivo BHK-21 fue establecida a partir de riñón de hámster bebé, en 1961 por Macpherson y Stoker. Para su cultivo se utilizó medio MEM suplementado con 10% (V/V) de SFB.

### **2.2. Medios de cultivo y suplementos para células animales**

Todos los medios de cultivos utilizados para el cultivo de células animales fueron preparados utilizando agua Milli Q y esterilizados por filtración, utilizando dispositivos tipo Steritop (Merck Millipore) con membranas de 0,22 µm de tamaño de poro. Cada medio preparado queda en cuarentena durante 48 h mientras se llevan a cabo los controles microbiológicos y se conservan a 4°C al resguardo de la luz. A continuación se detallan los medios de cultivo empleados:

#### **2.2.1. DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)**

- DMEM (Gibco)                    13,37 g.l<sup>-1</sup>
- NaHCO<sub>3</sub>                            1,50 g.l<sup>-1</sup>
- Piruvato de sodio                0,11 g.l<sup>-1</sup>
- Gentamicina                        0,05 g.l<sup>-1</sup>

### **2.2.2. MEM (*Minimum Essential Medium*)**

- MEM (Gibco) 9,60 g.l<sup>-1</sup>
- NaHCO<sub>3</sub> 2,20 g.l<sup>-1</sup>
- Gentamicina 0,05 g.l<sup>-1</sup>

### **2.2.3. EXCELL293**

- EXCELL293 (SAFC) 21,58 g.l<sup>-1</sup>
- NaHCO<sub>3</sub> 1,80 g.l<sup>-1</sup>
- Gentamicina 0,05 g.l<sup>-1</sup>

### **2.2.4. Suero fetal bovino (SFB)**

Para suplementar los medios de cultivo utilizados en cultivos en adherencia se adicionó a cada medio basal la concentración de SFB deseada. Los SFB utilizados (PAA Laboratories) son de calidad certificada y previo a su uso son descomplementados por incubación en baño de agua termostatzado a 56 °C durante 30 min.

### **2.2.5. Tripsina**

- Tripsina (Gibco) 0,05% (P/V).
- Na<sub>2</sub>EDTA (Merck) 0,02% (P/V).
- Preparado en buffer PBS.

Se respetó una relación de 20 µl de solución de tripsina-EDTA por cada cm<sup>2</sup> de superficie.

## **2.3. Sistemas de cultivos de células**

Todas las líneas celulares eucariotas se cultivaron en una incubadora a 37 °C, con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% saturada de humedad. Según la etapa de trabajo, se utilizaron cultivos en adherencia o suspensión.

### **2.3.1. Cultivos en adherencia**

Se emplearon los siguientes sistemas de cultivo:

- Placas multipozos de poliestireno (Greiner Bio-One) de 24, 12 y 6 pozos con una superficie de 2, 5 y 9,6 cm<sup>2</sup> por pozo, respectivamente
- Frascos T (Greiner Bio-One) de 25, 75 y 175 cm<sup>2</sup> de superficie

En todos los casos se mantuvo una relación constante de 0,4 ml de medio de cultivo por cada cm<sup>2</sup> de superficie.

### 2.3.2. Cultivos en suspensión en pequeña escala

Utilizando una incubadora orbital (*Certomat CTplus*, Sartorius) con control de humedad y atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, se emplearon los siguientes sistemas de cultivo:

- Frascos Schott de 100, 250 y 500 ml
- Frascos Erlenmeyer para cultivo celular (Corning) de 125 y 500 ml

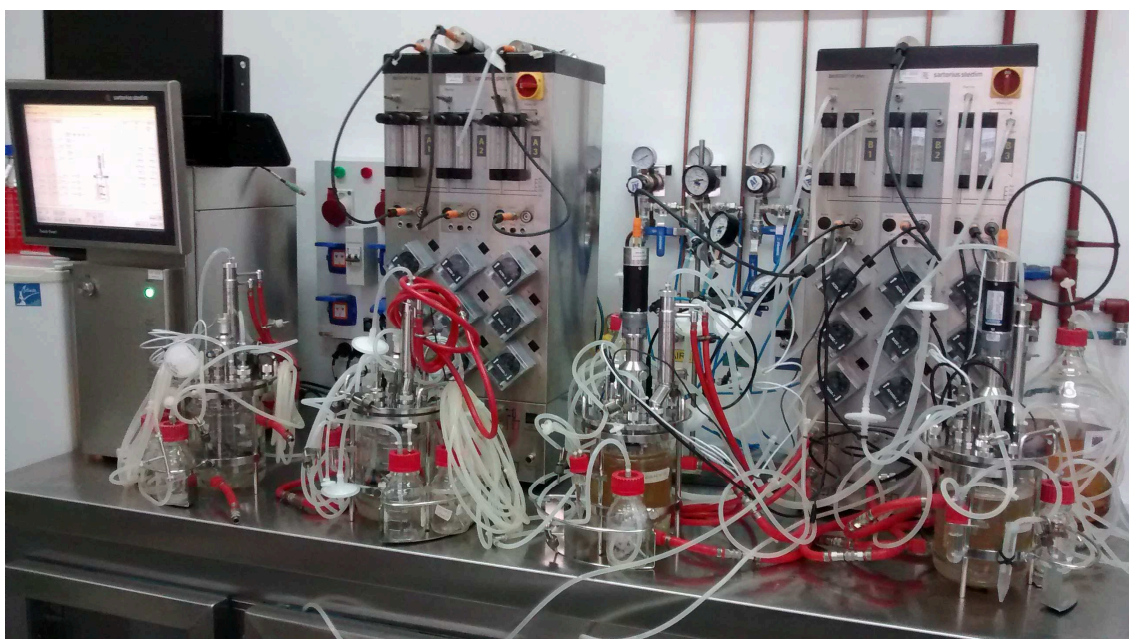
Por otro lado, utilizando una incubadora a 37°C, con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, saturada de humedad y agitadores magnéticos, se empleó el siguiente sistema de cultivo:

- Frascos Spinner (Bellco) de 100, 250, 500 y 3000 ml

### 2.3.3. Cultivos en biorreactor

- **Biorreactor tanque agitado de 1 L (*BIOSTAT Qplus*, Sartorius)**

Este es un sistema de multivasos de 1 L de volumen de trabajo, compuesto de 6 biorreactores en forma paralela. En nuestro caso se llevaron a cabo cultivos continuos en perfusión, utilizando un filtro tipo *spin* con una malla metálica con un tamaño de poro aproximado de 7 a 8 µm (*Twilled Dutch Weave*, BOPP), como dispositivo de retención celular. El biorreactor cuenta con toda la periferia necesaria para su funcionamiento (electrodo de oxígeno, electrodo redox, electrodo de pH, sensor de temperatura, agitador tipo *impeller*, sistema de aireación con burbujeador y/o membrana de aireación, botellas de alimentación, siembra y cosecha).



### - Biorreactor tanque agitado de 5 L (*BIOSTAT B*, Sartorius)

Este biorreactor posee un vaso de vidrio con un volumen de trabajo de 4,5 L, en el cual se llevaron a cabo cultivos continuos en perfusión, utilizando un filtro tipo *spin* con una malla metálica con un tamaño de poro aproximado de 7 a 8  $\mu\text{m}$  (*Twilled Dutch Weave*, BOPP), como dispositivo de retención celular. El biorreactor cuenta con toda la periferia necesaria para su funcionamiento (electrodo de oxígeno, electrodo redox, electrodo de pH, sensor de temperatura, sistema de aireación con burbujeador y/o membrana de aireación, botellas de alimentación, botellas de alimentación, siembra y cosecha).



## 2.4. Determinaciones analíticas en cultivos celulares

### 2.4.1. Determinación de la concentración y viabilidad de células

El recuento celular se realizó en cámara de Neubauer, estimando la proporción de células muertas por el método de exclusión con azul de tripán. La viabilidad del cultivo se determinó calculando el porcentaje de células

viables con respecto a las totales, teniendo en cuenta que la concentración de células totales es la suma de la concentración de células viables y no viables.

**2.4.2. Monitoreo del consumo de glucosa y de la producción de lactato y amonio en sobrenadantes de cultivo**

**- Glucosa**

La determinación de glucosa se llevó a cabo por el método enzimático de la glucosa oxidasa/peroxidasa (GOD/POD), utilizando el kit comercial “Glucosa Enzimática” (*Sociedad de Bioquímicos*, SB). El mismo se basa en la oxidación específica de D-glucosa por parte de la enzima GOD, con formación en forma estequiométrica de peróxido de hidrógeno. Este último, en presencia de 4-aminofenazona y fenol, forma una quinoneimina roja mediante una reacción catalizada por la enzima POD. De esta manera, el dosaje espectrofotométrico del producto coloreado permite la cuantificación indirecta de glucosa en la muestra. El protocolo utilizado es el siguiente:

1. Preparar el reactivo de trabajo de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
2. Encender baño termostático (37 °C).
3. En tubos tipo eppendorf, preparar un blanco de reactivos (B<sub>R</sub>), un blanco de muestra (B<sub>M</sub>), un testigo (T) y las muestras (M) de la siguiente manera:

	<b>B<sub>R</sub></b>	<b>B<sub>M</sub></b>	<b>T</b>	<b>M</b>
<b>Reactivo de trabajo</b>	1 ml	-	1 ml	1 ml
<b>Solución testigo de glucosa 1 g.l<sup>-1</sup></b>	-	-	10 µl	-
<b>Muestra</b>	-	10 µl	-	10 µl
<b>Agua destilada</b>	10 µl	1 ml	-	-

4. Mezclar por inversión e incubar los tubos a 37° C durante 10 min.
5. Leer en espectrofotómetro a λ= 505 nm. El color es estable 1 h a RT.
6. Calcular la concentración de glucosa en la muestra de acuerdo a la expresión:

$$C_{glucosa} (g/L) = [Abs_M - (Abs_{B_M} + Abs_{B_R})] * f * (D^{-1})$$

Donde

$$f = 1 \text{ g.l}^{-1} / (AbsT - AbsB_R)$$

La reacción de color sigue la Ley de Lambert-Beer hasta 4,5 g.l<sup>-1</sup> y las diluciones de las muestras deben efectuarse en buffer PBS.

**- Lactato**

La determinación de lactato se llevó a cabo por el método enzimático, utilizando el kit comercial “*Lactate*” (Wiener Lab). El mismo se basa en la oxidación específica del lactato por parte de la enzima lactato-oxidasa (LOD), con formación en forma estequiométrica de peróxido de hidrógeno. Este último, en presencia de TOOS y 4-aminoantipirina, forma un cromógeno mediante una reacción catalizada por la enzima POD. De esta manera, el dosaje espectrofotométrico del producto coloreado ( $\lambda = 540\text{nm}$ ) permite la cuantificación indirecta de lactato en la muestra. El protocolo llevado a cabo es el siguiente:

1. Preparar en placas de 96 pozos el estándar de lactato (por duplicado) y las muestras.
2. Realizar las diluciones de las muestras en buffer PBS, teniendo en cuenta que la reacción de color sigue la Ley de Beer hasta 1,3 g.l<sup>-1</sup>. Se recomienda trabajar en un rango de concentraciones de 0,1 a 0,2 g.l<sup>-1</sup>.
3. Sembrar 2  $\mu\text{l}$  por pozo de estándar y de las diluciones de las muestras. Procesar también un blanco de reactivos ( $B_R$ ), sembrando 2  $\mu\text{l}$  de diluyente. Agregar 175  $\mu\text{l}$  por pozo de Reactivo A e incubar en estufa a 37°C durante 2 min.
4. Leer a  $\lambda = 540 \text{ nm}$ . La lectura corresponde a los blancos de muestra ( $B_M$ ).
5. Agregar 35  $\mu\text{l}$  por pozo de Reactivo B e incubar en estufa a 37°C durante 5 min (en este paso, es muy importante respetar el tiempo).
6. Leer inmediatamente a  $\lambda = 540\text{nm}$  (lectura final).

La concentración de las muestras se calcula como:

$$C_{lactato} \text{ (g/L)} = (Abs_M - AbsB_M - AbsB_R) * f * (D^{-1})$$

Donde

$$f = \text{Concentración Std (g.l}^{-1}) / (AbsT - AbsB_M - AbsB_R)$$



**- Amonio**

La cuantificación de amonio se llevó a cabo utilizando una adaptación de la técnica desarrollada para la cuantificación de urea, con el kit “Urea” (*Sociedad de Bioquímicos, SB*), donde los iones amonio presentes en la muestra se determinan mediante la reacción de Berthelot. La reacción se desarrolla en varias etapas, que tienen lugar en medio alcalino. El indofenol en medio alcalino se disocia dando azul de indofenol, compuesto fuertemente coloreado de azul. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de amonio presente en la muestra. Para acelerar la reacción entre amonio e hipoclorito, disminuyendo el tiempo de incubación, se agrega nitroferriicianuro, también llamado nitroprusiato de sodio  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ , como catalizador. El protocolo es el siguiente:

1. Se prepara una curva de calibración empleando como estándar diluciones de una solución de 100 mM de  $\text{NH}_4^+$ , generalmente  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , de acuerdo con la siguiente tabla:

<b>Tubo</b>	<b>Estándar (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Agua destilada (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Concentración final de <math>\text{NH}_4^+</math> (mM)</b>
<b>1</b>	0	1000	0
<b>2</b>	10	990	1
<b>3</b>	20	980	2
<b>4</b>	40	960	4
<b>5</b>	60	940	6
<b>6</b>	80	920	8
<b>7</b>	100	900	10
<b>8</b>	150	850	15
<b>9</b>	200	800	20
<b>10</b>	300	700	30

2. Sembrar la curva, al menos por duplicado, las muestras y un blanco de reactivos ( $B_R$ ) en plaza de 96 pozos, de la siguiente manera:

	B <sub>R</sub> (μl)	Estándar (μl)	Muestra (μl)
<b>Muestra</b>	-	-	10
<b>Estándar</b>	-	10	-
<b>Reactivo 1<sup>(1)</sup></b>	100	100	100
<b>Reactivo 2<sup>(2)</sup></b>	100	100	100

<sup>(1)</sup>Solución acuosa de fenol 487,6 mM y nitroprusiato de sodio 1 mM.

<sup>(2)</sup>Solución acuosa de hipoclorito de sodio 33,3 mM e hidróxido de sodio 562,5 mM.

3. Incubar a 37°C durante 10 min
4. Leer la absorbancia a  $\lambda = 540$  nm en lector de placas multipozo dentro de la hora de finalizada la incubación.

Los valores de concentración de amonio se obtienen interpolando el valor de la absorbancia medido en la recta de regresión lineal obtenida con el duplicado de la curva de calibración. La linealidad se mantiene hasta una concentración 15 mM de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, valor que está dado por la saturación de la capacidad del lector. Para medir concentraciones mayores a 15 mM de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, se siembran 5 μl de estándares y muestras.

#### **2.4.3. Estimación de parámetros cinéticos de cultivo. Determinación de la integral de células viables (ICV), velocidad específica de crecimiento celular y de las velocidades específicas de consumo y producción de metabolitos**

Para estimar los parámetros cinéticos de cultivo, se procedió en primer lugar a calcular la integral de células viables (ICV). Si se considera que una especie P en un cultivo depende de la cantidad de células viables a cada tiempo X<sub>v</sub>(t), entonces, la variación de P en el tiempo se puede expresar matemáticamente como:

$$\frac{dP}{dt} = X_v(t) \cdot q_p$$

q<sub>p</sub> es una constante asociada con la productividad de una línea celular definida, en un determinado conjunto de condiciones de cultivo. En el caso de los metabolitos estudiados, el valor q<sub>p</sub> representa directamente las velocidades específicas de consumo o producción. En el caso de la variación de la concentración celular, la constante de proporcionalidad es igual a la velocidad específica de crecimiento. Integrando la ecuación anterior se tiene que:

$$P(t) = \int dP = q_p \int X_v(t) dt$$

Esta expresión indica que la concentración de la variable en estudio en cualquier tiempo  $t$  es proporcional a la integral en el tiempo de la curva de células viables, o ICV, en el mismo tiempo  $t$  (Renard y col., 1988). De esto se desprende que la curva de producción o consumo de la especie y la curva integral deben mostrar perfiles análogos y la regresión de una sobre la otra debe ser lineal. La ICV resulta así una medida de la cantidad de células metabólicamente activas presentes en un cultivo durante un período discreto de tiempo que determinan la concentración de una especie  $P$  a cada tiempo  $t$  y con una productividad específica  $q_p$ . Tiene unidades de  $\text{cél.h.ml}^{-1}$ .

Una vez estimados los valores ICV, las velocidades específicas de crecimiento celular, consumo de glucosa y producción de lactato y amonio se calcularon graficando en cada caso la producción o consumo acumulado a cada tiempo de cultivo en función de la ICV. A partir de cada gráfica, se realizaron los ajustes lineales correspondientes y se obtuvieron los valores de los parámetros cinéticos  $q_p$  a partir de las pendientes de las rectas de ajuste. El criterio adoptado para aplicar la regresión lineal fue seleccionar aquellos puntos experimentales que permitieran obtener coeficientes de correlación iguales o superiores a 0,95. En todos los casos los cálculos se realizaron utilizando el software *Origin 7.0* (OriginLab).

## **2.5. Criopreservación de líneas celulares de mamífero**

La conservación de las líneas y clones celulares se realizó en nitrógeno líquido, ya que a temperaturas de  $-196^\circ\text{C}$  se observan deterioros celulares mínimos. Se empleó una técnica de enfriamiento gradual desde temperatura ambiente hasta  $-196^\circ\text{C}$ .

Para ello, una vez realizado el recuento, suspensiones celulares en fase de crecimiento exponencial se centrifugaron a  $200\ g$  durante  $5\ \text{min}$  a TA en una centrífuga Eppendorf 5403, rotor 16A4-44 (Alemania). Se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en una solución de SFB y dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) en una relación 90:10 (V/V), de manera de obtener una concentración de  $1-2 \times 10^6\ \text{cél.ml}^{-1}$ . La suspensión celular se distribuyó a razón de  $1\ \text{ml}$  por criotubo (Greiner Bio-One), los que luego fueron guardados en un contenedor apropiado, *MrFrosty* (Nalgene), y llevados a

*freezer* de -70°C por 24 h. Este dispositivo contiene alcohol isopropílico, permitiendo que en el interior del mismo la temperatura disminuya a razón de 1°C por minuto, de manera de lograr un enfriamiento gradual de las células, que luego permita una correcta revitalización de las mismas. Finalmente, los criotubos se almacenaron en termos de N<sub>2</sub> líquido a -196°C.

### 2.6. Revitalización de líneas celulares de mamífero

La descongelación rápida de la suspensión celular es esencial para su óptima recuperación. Para la revitalización de las líneas celulares criopreservadas se retiró el criotubo del termo de N<sub>2</sub> líquido y se lo sumergió rápidamente en un baño de agua a 37°C. La suspensión celular descongelada se transfirió a un tubo cónico que contenía 40 ml de medio de cultivo y se centrifugó a 200 *g* durante 5 min a TA. Esta etapa se realizó con el objeto de diluir rápidamente el DMSO y luego eliminarlo, ya que es un reactivo tóxico para las células en cultivo. Se descartó el sobrenadante y el sedimento de células se resuspendió en un volumen de medio de cultivo adecuado. Finalmente, se realizó el recuento celular con el objeto de evaluar la recuperación y la viabilidad celular.

### 2.7. Desarrollo de líneas celulares recombinantes

#### 2.7.1. Ensamblado de vectores lentivirales (LVs)

Para el ensamblado de LVs se llevó a cabo una transfección transiente de células empaquetadoras, cosechando luego de 48 h los LVs a partir del sobrenadante de cultivo.

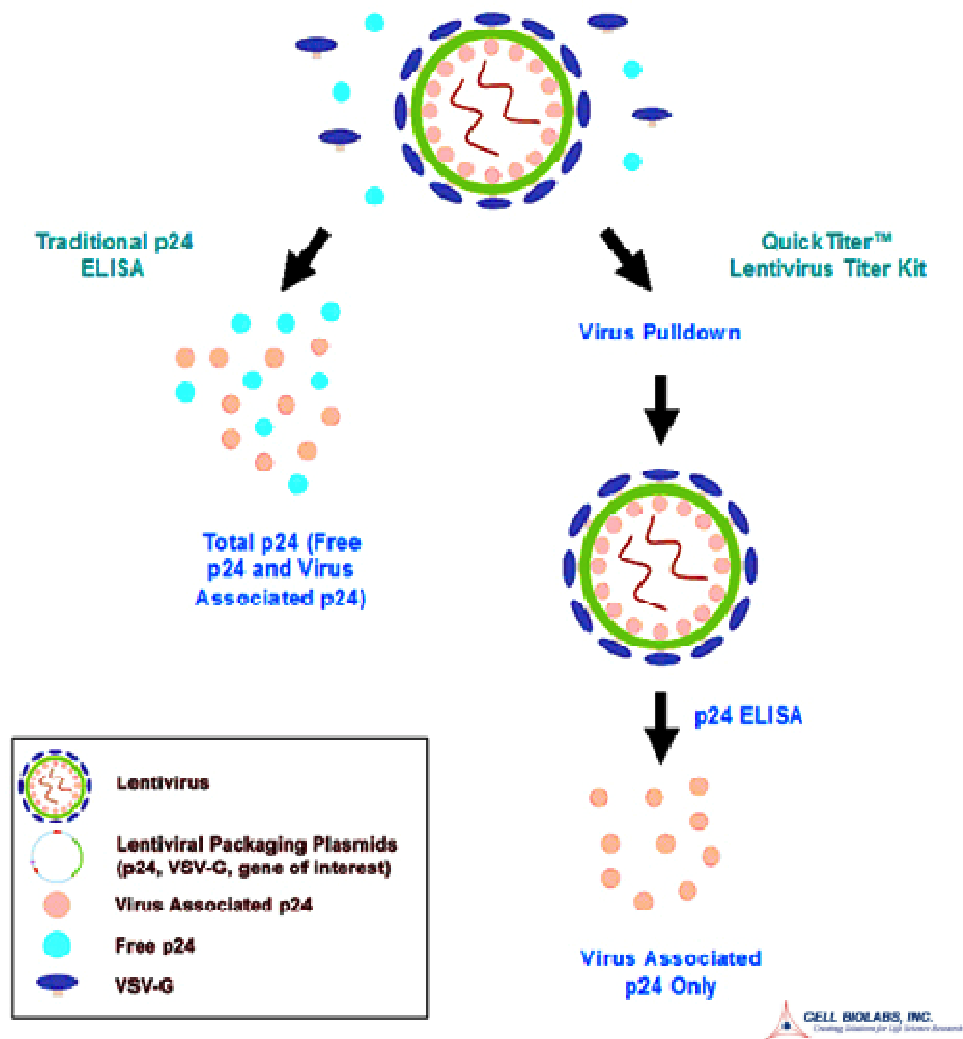
- Células empaquetadoras: HEK293T/17
- Vectores lentivirales de tercera generación: pMDLg/pRRE, pMD.G, pRSV-REV (Addgene; número de plásmido #12251, #12259, #12253 respectivamente) y el vector de transferencia correspondiente (pLV-CMV-GlycoG o pLV-CMV-M)
- Reactivo de transfección: *Lipofectamine2000 Transfection Reagent* (Invitrogen)
- Medio de transfección: DMEM (Gibco)

- Protocolo:
  1. Cultivar células HEK293T/17 a razón de  $4 \times 10^5$  cél.ml<sup>-1</sup>, en una placa de Petri para cultivo celular de 10 cm de diámetro, ON a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>
  2. El día de la transfección tomar un tubo Falcon con 2,5 ml de medio DMEM y adicionar 50 µl de *Lipofectamine2000*. Homogeneizar vigorosamente e incubar a TA por 5 min.
  3. En otro tubo Falcon con 2,5 ml de medio DMEM adicionar los volúmenes de solución de cada vector que contengan las siguientes cantidades: 2,5 µg pRSV-REV, 3,6 µg pMD.G, 6,5 µg pMDLg/pRRE y 10 µg del vector de transferencia.
  4. Mezclar el contenido de ambos tubos e incubar a TA durante 20 min.
  5. Retirar el sobrenadante de cultivo de las células HEK293T/17.
  6. Una vez transcurridos los 20 min, adicionar los 5 ml de solución conteniendo los complejos lípidos/ADN sobre la monocapa celular. Incubar 4 h a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>.
  7. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, descartar el sobrenadante de cultivo y adicionar 10 ml de medio DMEM conteniendo 10% de SFB. Incubar por 48 h a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>.
  8. Cosechar el sobrenadante de cultivo conteniendo los LVs, trasvasando a un tubo Falcon. Centrifugar a 200 *g* durante 10 min para retirar células que pudieran haberse despegado de la monocapa.
  9. Filtrar el sobrenadante utilizando un filtro para jeringa con membrana de 0,45 µm de tamaño de poro.
  10. Dispensar en alícuotas de 1 ml y conservar a -70 °C.

### 2.7.2. Determinación del título de LVs

Para analizar el título de los LVs producidos se empleó el *kit* de titulación *QuickTiter Lentivirus Titer Kit (Lentivirus-Associated HIV p24, Cell Biolabs)*. Este kit fue diseñado para detectar únicamente la proteína p24 del virus del HIV que se encuentra asociada a partículas, y no aquella libre.

El *kit* constituye un inmunoensayo en el que sólo la proteína p24 asociada al *core* viral forma complejos con el reactivo ViraBind, pudiendo separarse así de la proteína libre por centrifugación a alta velocidad (Fig. 69). El *kit* tiene una sensibilidad de 0,33 ng.ml<sup>-1</sup> de proteína p24.



**Figura 69. Análisis de la producción de RCL.** Esquema representativo del fundamento del kit *QuickTiter Lentivirus Titer Kit* (Cell Biolabs Inc.) utilizado, en este caso, para el análisis de RCL.

Para la titulación se empleó el protocolo que se indica a continuación, de acuerdo con lo establecido por el fabricante:

1. Tomar 1 ml del *stock* lentiviral y 1 ml de medio de cultivo DMEM con SFB 10% (control negativo) y agregar 10  $\mu$ l de *ViraBind* reactivo A, mezclando por inversión y adición inmediata de 10  $\mu$ l de *ViraBind* reactivo B, mezclando nuevamente por inversión. Incubar durante 30 min a 37 °C.
2. Centrifugar 5 min a 13.000 *g* a TA.
3. Eliminar el sobrenadante y disolver el *pellet* en 250  $\mu$ l de Diluyente de Muestra. Mezclar e incubar por 30 min más a 37 °C.

4. Paralelamente, preparar la curva de estándar de proteína p24, como se indica a continuación:

Tubo	Estándar (µL)	Diluyente de muestra (µl)	Proteína p24 (ng.ml <sup>-1</sup> )
1	10	990	100
2	500 del tubo #1	500	50
3	500 del tubo #2	500	25
4	500 del tubo #3	500	12,5
5	500 del tubo #4	500	6,25
6	500 del tubo #5	500	3,12
7	500 del tubo #6	500	1,56
8	0	500	0

5. Incubar los tubos con las diferentes concentraciones del estándar a 37°C durante 30 min.
6. Tomar 100 µl de las muestras tratadas, el estándar de proteína p24, el blanco y el control negativo fueron adicionadas a la placa previamente sensibilizada con anticuerpo anti-p24 provista por el *kit*.
7. Proteger de la luz e incubar a 4°C durante 16 h.
8. Retirar el contenido y lavar los pozos 3 veces con 250 µl de Solución de Lavado.
9. Adicionar 100 µl por pozo de anticuerpo monoclonal anti-p24 conjugado a FITC diluido 1/1.000.
10. Proteger de la luz e incubar durante 1 h a TA en agitador orbital.
11. Repetir el lavado del paso 8.
12. Adicionar 100 µl de anticuerpo monoclonal anti-FITC conjugado a HRP diluido 1/1.000.
13. Proteger de la luz e incubar durante 1 h a TA en agitador orbital.
14. Repetir el lavado del paso 8.
15. Adicionar 100 µl de solución de sustrato en cada pozo. Incubar a TA en agitador orbital durante 2 a 30 min, de acuerdo con la velocidad de desarrollo de color, evitando la saturación.
16. Detener la reacción enzimática con el agregado de 100 µl de Solución de Detención (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 N) en cada pozo.

17. Leer inmediatamente la absorbancia en lector de placas *Multiskan* (Thermo Scientific) a  $\lambda = 450$  nm.

Para la determinación del título lentiviral en las muestras se calculó la concentración de proteína p24 a partir de la absorbancia y de la fórmula de regresión lineal correspondiente a la curva de absorbancia del estándar de proteína p24. Luego se emplearon las siguientes fórmulas:

$$\text{Concentración p24 (ng.ml}^{-1}\text{)} = \text{p24(ng.ml}^{-1}\text{)} \times \text{factor de dilución} \times \frac{0,25 \text{ ml}}{1,0 \text{ ml}}$$

Dado que hay aproximadamente 2000 moléculas de proteína p24 por partícula lentiviral (PL), entonces 1 PL contiene:

$$\frac{2000 \times 24 \times 10^3}{6 \times 10^{23}} \text{ g de p24} = 8 \times 10^{-5} \text{ pg de p24}$$

$$\text{o } 1 \text{ ng de p24} = 1,25 \times 10^7 \text{ PLs}$$

Para vectores lentivirales adecuadamente empaquetados, 1 unidad de transducción (UT) equivale de 100 a 1.000 LP, por lo que:

$$10^6 \text{ UT.ml}^{-1} \cong 10^{8-9} \text{ PL.ml}^{-1} \cong 8 \text{ a } 80 \text{ ng.ml}^{-1} \text{ p24}$$

### **2.7.3. Transducción de células de mamífero con LVs**

Para obtener líneas celulares recombinantes estables se llevaron a cabo transducciones de cultivos en adherencia, utilizaron los LVs producidos previamente, utilizando el siguiente protocolo:

1. Cultivar la línea celular a transducir a razón de  $3 \times 10^4$  cél.ml<sup>-1</sup> en placa de 6 pozos e incubar ON a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
2. Al momento de la transducción, descongelar la cantidad de LVs necesarios y dejar atemperar a TA.
3. Retirar el sobrenadante de cultivo y adicionar la cantidad de LVs necesario para obtener la MDI deseada en un volumen final de 1 ml.
4. Incubar las células en contacto con los LVs aproximadamente 16 h, a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
5. Retirar el sobrenadante conteniendo las partículas virales y adicionar 3 ml de medio DMEM 10% SFB e incubar otras 72 h.
6. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, comenzar la presión selectiva de las células recombinantes o analizar expresión, según la finalidad deseada.



Si se desea llevar a cabo la transducción en placas de otro volumen, cultivar las células en la misma densidad celular pero cambiar los volúmenes de LVs y de cultivo con respecto al área del pozo de la placa utilizada.

### 2.7.4. Selección de células recombinantes

Para seleccionar las células recombinantes se llevaron a cabo dos protocolos de selección distintos, según el caso.

- Selección puntual

Luego de la transducción, las células son incubadas con el medio de cultivo utilizado comúnmente para su cultivo, conteniendo  $5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de puromicina (Sigma). Se utiliza como control un cultivo de la misma línea celular sin ser transducida. Una vez que dicho control muestre un 0% en su viabilidad, el antibiótico es retirado del medio de cultivo de la línea celular recombinante.

- Selección con aumento gradual del antibiótico

En este protocolo desarrollado en nuestro laboratorio (Prieto y col., 2011), las células transducidas son incubadas, gradualmente, con cantidades crecientes del agente de selección. En el presente trabajo de tesis, se comenzó adicionando al medio de cultivo una concentración  $5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de puromicina. Una vez que se observa que en el cultivo se seleccionan las células resistentes a esa concentración, se realiza un subcultivo aumentando la cantidad de antibiótico presente en el medio. Este paso se repite las veces que se crea necesario ( $20, 50, 100, 150 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de puromicina) hasta obtener el nivel de expresión deseado (analizado por la metodología correspondiente) o hasta que el cultivo no soporte otro aumento, culminando con el cultivo resistente a la concentración anterior del agente de selección.

### 2.8. Obtención de clones celulares

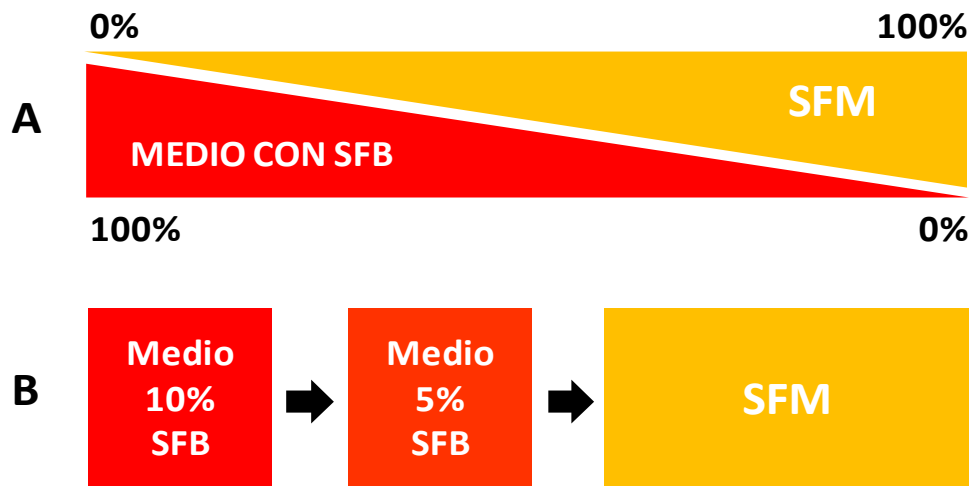
El momento en el que se realiza el clonado es de vital importancia. Como regla general, es recomendable realizar el clonado en el menor tiempo posible transcurrido desde la generación de la línea celular, dado que los múltiples clones presentan distintas velocidades de crecimiento, pudiendo perderse clones con altos niveles de expresión. La preferencia de trabajar con clones celulares en lugar de líneas se basa en que los clones son homogéneos en cuanto a sus propiedades de crecimiento, niveles de expresión y calidad de producto.

El clonado celular de las líneas obtenidas se realizó por el método de dilución límite (Freshney, 2000). La suspensión celular se sembró por triplicado en placas de 96 pozos a razón de 200  $\mu$ l por pozo, en medio conteniendo 20% SFB. El clonado se considera efectivo cuando se observa crecimiento a lo sumo en el 30% de los pozos sembrados con una sola célula. Los pozos que presentaron un único clon se seleccionaron y amplificaron. Para ello, se utilizaron sucesivamente placas de 24 y 6 pozos y frascos T de 25 cm<sup>2</sup>, hasta llegar a obtener una cantidad suficiente de células de cada clon para su criopreservación y análisis.

### **2.9. Adaptación de células a su crecimiento en suspensión con medios de cultivo libres de SFB**

Diversas metodologías pueden llevarse a cabo para adaptar un cultivo, que crece en condiciones de adherencia y utilizando una elevada concentración de SFB en su medio (entre 5 y 10%), a crecer en suspensión utilizando SFM. El proceso puede realizarse de forma gradual, realizando progresivos subcultivos utilizando medio de cultivo con concentraciones de SFB cada vez menores. Esta reducción gradual del SFB se realiza a la par de un aumento gradual de la proporción de medio SFM, hasta llegar a un 100% de SFM con 0% de SFB (Fig. 70-A). En algún punto de esta transición las células se despegarán del sustrato en el que crecen adheridas y pasarán a suspensión (a veces formando agregados o cúmulos celulares) donde generalmente son cultivadas en agitación, como una nueva variable de cultivo. La agitación puede ser aplicada de forma magnética con la utilización de frascos tipo *Spinner* o utilizando frascos de cultivo tipo *Schott* o *Erlenmeyer* para uso en cultivo de células animales, utilizando agitadores orbitales.

Algunas células animales poseen la capacidad de adaptar su crecimiento a SFM en suspensión más fácilmente que otras, pudiendo realizar una adaptación directa, desde un medio con 5-10% SFB a un medio totalmente libre del mismo (Fig. 70-B). Este fue el caso del clon HEK293 adhP2E5, con el cual se llevó a cabo un protocolo de adaptación a un SFM comercial (EXCELL293, SAFC Biosciences Inc.).



**Figura 70. Proceso de adaptación a suspensión.** Esquemas de dos posibles metodologías para llevar a cabo la adaptación de cultivo a medios libres de suero fetal bovino. **A.** Proceso de adaptación con sustitución gradual del medio conteniendo SFB por el SFM. **B.** Proceso de adaptación directo, llevado a cabo con el clon adhP2E5. A partir de un cultivo en medio conteniendo 10 % se realizaron 3 subcultivos sucesivos en medio con 5% SFB y, luego, directamente en 100% SFM.

Con ese objetivo, a un cultivo de adhP2E5 se le realizaron 3 subcultivos sucesivos en medio DMEM 5% SFB y, posteriormente, fue subcultivado directamente en 100% de medio EX-CELL293, a una concentración celular de  $6 \times 10^5$  cél.ml<sup>-1</sup>, en un frasco *Spinner* con una agitación de 60 rpm, a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Durante los días posteriores, la concentración y viabilidad celular fue evaluada, y un tercio del volumen total de medio de cultivo fue renovado cada 72 h (manteniendo el volumen final constante). Luego de aproximadamente 20 días de cultivo en estas condiciones, el cultivo comenzó a duplicarse nuevamente pudiendo observarse una clara fase exponencial de crecimiento, tras la cual las células recobraron su ritmo normal de crecimiento y una viabilidad por encima del 95%. En este momento el cultivo se consideró adaptado a la nueva condición de cultivo.

### 3. METODOLOGÍAS PARA EL ANÁLISIS DE LINEAS Y CLONES CELULARES

Para analizar la expresión de glicoproteína G por parte de las líneas y clones celulares, estos se analizaron por citometría de flujo y/o microscopía de fluorescencia.

#### 3.1. Citometría de flujo

1. A partir de un cultivo en fase exponencial, tomar una suspensión celular conteniendo  $1 \times 10^5$  células totales en un volumen final de 100  $\mu$ l de medio de cultivo basal.
2. Incubar con una dilución 1/1.000 del anticuerpo monoclonal AB5, específico para la glicoproteína G en su conformación nativa (Ramirez, 2008), durante 30 min a TA.
3. Lavar las células adicionando 1 ml de medio basal y centrifugando durante 8 min a 100 g.
4. Resuspender el pellet celular en 100  $\mu$ l de una solución conteniendo una dilución 1/1.000 del anticuerpo *AlexaFluor 488 goat anti-mouse* (Invitrogen) e incubar durante 30 min a TA.
5. Repetir el paso 3.
6. Resuspender el pellet en 200  $\mu$ l de medio basal y analizar por citometría de flujo.

Se utilizó un citómetro de flujo *Guava EasyCyte* (Guava), el cual tiene la posibilidad de adquirir muestras presentes en una placa de 96 pozos, y los datos fueron analizados con el software *GUAVA ExpressPlus*.

#### 3.2. Microscopía de fluorescencia

1. Cultivar las células a analizar a razón de  $1 \times 10^5$  cél.ml<sup>-1</sup> utilizando portaobjetos de vidrio tratado para cultivo celular (*Nunc Lab-Tek II Chamber Slide System*, Thermo Scientific), durante 24 a 48 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
2. Retirar sobrenadante de cultivo y lavar la monocapa celular suavemente con buffer PBS.
3. Fijar células con una solución de paraformaldehído 4%, durante 30 min a TA.
4. Realizar 2 lavados con buffer PBS.

5. Incubar con una dilución 1/100 del anticuerpo monoclonal AB5, específico para la glicoproteína G en su conformación nativa (Ramirez, 2008), durante 30 min a TA.
6. Repetir paso 4.
7. Incubar con una dilución 1/1.000 del anticuerpo *AlexaFluor488 goat anti-mouse* (Invitrogen) e incubar durante 30 min a TA.
8. Repetir el paso 4.
9. Incubar la monocapa celular durante 5 min con una dilución de DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) en una concentración final de 1  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  en PBS, para tinción diferencial de núcleos.
10. Repetir paso 4.
11. Analizar la localización subcelular de la glicoproteína G en microscopio de fluorescencia invertido (*Eclipse Ti-S*, Nikon Instruments Inc).

### 3.3. Análisis de bancos celulares

Una vez contruidos los bancos celulares es muy importante llevar a cabo diversos tests con el objetivo de caracterizarlos, analizando, entre otros aspectos, la presencia de agentes adventicios. La cantidad de tests que pueden llevarse a cabo para tal fin es muy grande y, muchas veces, muy compleja (Hess y col. 2012). En esta etapa de nuestro trabajo nos propusimos analizar los MCB y WCB en cuanto a la contaminación con bacterias, hongos y micoplasmas.

Para tal fin, un criovial del banco celular fue descongelado y cultivado en medio de cultivo sin el agregado de antibiótico durante tres pasajes sucesivos. El sobrenadante de este cultivo fue la muestra a ser analizada.

#### 3.3.1. Contaminación con bacterias

Una muestra de sobrenadante fue inoculada en placas de Petri conteniendo medio Agar Triptona de Soja e incubada a 37°C durante 48 h. Luego del tiempo de incubación, las placas fueron inspeccionadas en busca de colonias bacterianas.

#### 3.3.2. Contaminación con hongos

Una muestra de sobrenadante fue cultivado en placas de Petri conteniendo medio Agar Glucosa 4% según Sabouraud a 28°C durante 48 h.

Luego del tiempo de incubación, las placas fueron inspeccionadas en busca de colonias de hongos.

### 3.3.3. Detección de micoplasmas en cultivos celulares

Para la detección de micoplasma se utilizó un kit comercial denominado *LookOut Mycoplasma Detection Kit* (Sigma-Aldrich), basado en una reacción de PCR específica para la amplificación de una región conservada del ARN ribosomal 16S de los micoplasmas. Este método permite la detección de todas las especies que usualmente son encontradas como contaminación en cultivos celulares.

Ya que el kit provee tubos con todos los reactivos necesarios para la amplificación y un control positivo, solo se requiere de un paso de adición de la enzima polimerasa y de las respectivas muestras antes de comenzar con el ciclo de termociclado. La evaluación del resultado de la PCR se realiza teniendo en cuenta la siguiente figura 71.

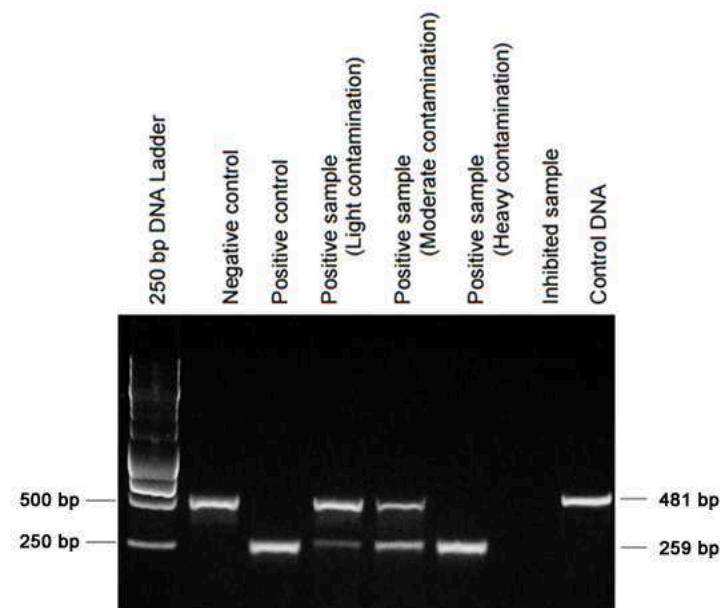


Figura 71. Análisis de micoplasma utilizando el kit *LookOut Mycoplasma Detection Kit*. Tamaños de los amplicones que determinan una reacción positiva o negativa observados en un gel de agarosa.

### 3.3.4. Determinación de RCL.

Existen diversas metodologías para la detección de RCL. Por un lado, se puede analizar la presencia de RCL en preparados de LVs utilizando células C8166, las cuales son permisivas a la infección y replicación del virus HIV-1. Por otro lado, se pueden llevar a cabo ensayos para analizar la

presencia/ausencia de proteínas de LVs en sobrenadantes de cultivos, o de posibles recombinaciones ocurridas entre secuencias codificantes de proteínas lentivirales (FDA, 2006; Cornetta y col., 2009).

En este caso, el clon adhP2E5 fue analizado, por un lado, utilizando un ensayo de ELISA sándwich para cuantificar la proteína p24 en muestras de sobrenadante de cultivo y, por otro, mediante PCR cuantitativa, para cuantificar en el genoma de la célula productora número de copias de genes codificantes de proteínas estructurales del LVs.

- **Análisis de la presencia/ausencia de proteína p24 en sobrenadante**

Se llevó a cabo un ELISA para la detección de la proteína p24 del virus HIV-1, componente de la cápside del vector lentiviral (proteína Gag), utilizando el kit *QuickTiter Lentivirus Titer Kit*, Cell Biolabs Inc. Como se detalló en el inciso 2.7.2 de esta sección, este kit también es utilizado para la titulación de lentivirus y posee la característica de cuantificar la proteína p24 asociada a partículas virales con envoltura, ya que posee un paso metodológico que separa la proteína p24 soluble de la asociada a partícula viral (Fig. 69). En este caso, ya que el objetivo es detectar toda la proteína p24 (asociada a partícula o no), las muestras de cultivos analizadas fueron evaluadas con y sin el paso de *virus pulldown*.

- **Análisis de la presencia/ausencia de secuencias codificantes de proteínas lentivirales en el genoma de la célula productora**

Con el objetivo de detectar posibles inserciones de las secuencias correspondientes a las proteínas estructurales del LVs en el genoma del clon adhP2E5, se llevó a cabo una reacción de PCR cuantitativa (qPCR), utilizando *primers* específicos para la amplificación de las mismas. Se confeccionó una curva de calibrado, utilizando los plásmidos lentivirales pMDLg/pRRE y pMD.G (Addgene; número de plásmido #12251, #12259, respectivamente) que portan las secuencias de la proteínas Gag y Pol, y VSV-G, respectivamente. Los puntos de la curva contienen la cantidad de ADN correspondiente a 100, 10 y 1 copia de vector, para lo cual es necesario calcular la masa de cada uno de los vectores, utilizando la siguiente ecuación:

$$m = n \times 1.096 \times 10^{-21} \frac{g}{bp}$$

Dónde:

m: masa del vector en gramos

n: tamaño del vector en bp.

Como templado de reacción se utiliza una muestra que posea 1000 copias del genoma de interés, para lo cual es necesario calcular la masa del mismo, utilizando la ecuación anterior y teniendo en cuenta el tamaño del genoma en pares de bases (*Database of Genome Sizes* – [www.cbs.dtu.dk/databases/DOGS/index.html](http://www.cbs.dtu.dk/databases/DOGS/index.html)).

Los oligonucleótidos utilizados como *primers* son los siguientes:

Secuencia a amplificar	Oligonucleótido	Secuencia (sentido 5'-3')
Proteína de cápside (Gag)	Fw Gag 1	GAGCCACCCCACAAGATTTA
	Rev Gag 1	TATCCCATTCTGCAGCTTCC
Polimerasa (Pol)	Fw Pol 1	TTGACTCAGATTGGCTGCAC
	Rev Pol 1	TTTAACTTTTGGGCCATCCA
Glicoproteína (VSV-G)	Fw pVSV-G 1	AATGCCCAAGAGTCACAAGG
	Rev pVSV-G 1	CATACCAGCGGAAATCACAA

Para las reacciones de PCR se utilizó la *master mix 5X HOT FIRE Pol EvaGreen qPCR Mix Plus (Rox)*(Solis BioDyne), preparando la mezcla de reacción de acuerdo con las instrucciones del fabricante:

Reactivo	Concentración final	Volumen (por tubo de reacción) <sup>o</sup>
<i>5X HOT FIRE Pol EvaGreen qPCR Mix Plus</i>	1 X	4,0 µl
Oligonucleótidos <i>Forward 10 µM</i> <i>Reverse 10 µM</i>	0,25 µM 0,25 µM	0,5 µl 0,5 µl
Templado	X	10 µl
Agua	-	csp 20 µl



Las reacciones se llevan a cabo de acuerdo con el siguiente programa de ciclado:

Paso 1: Desnaturalización inicial:	94 °C	15 min
Paso 2: Desnaturalización:	94 °C	15 s
Paso 3: <i>Annealing</i>	65°C	20 s
Paso 4: Extensión	72°C	20 s
Volver al paso 2:	40 veces	

De esta forma, si en una muestra que posee 1000 copias de genoma no es posible detectar la presencia de la secuencia *target* (no se observa amplificación), se concluye que misma estaría ausente ya que la reacción de qPCR tiene la capacidad de detectar hasta 1 copia.

**3.3.5. Análisis del número de copias del transgen en el genoma**

Con el objetivo de analizar cuantas copias de transgen fueron insertadas en el genoma del clon adhP2E5, se llevó a cabo una qPCR utilizando un set de *primers* específicos para una región contenida dentro de la secuencia WPRE, la cual forma parte del vector pLV-CMV-GlycoG (Fig. 27-A).

En este ensayo, se construyó una curva de calibrado utilizando el vector pLV-CMV-GlycoG, en la cual los puntos de la misma contenían la cantidad de ADN correspondiente a 1.000, 10.000, 100.000, 1.000.000 y 10.000.000 de copias del vector. Como templado de reacción se utiliza una muestra que posea 1.000.000 de copias del genoma de interés. Para realizar dichos cálculos se tuvo en cuenta la masa del vector y del genoma, utilizando la ecuación descrita en el apartado anterior (3.3.4.).

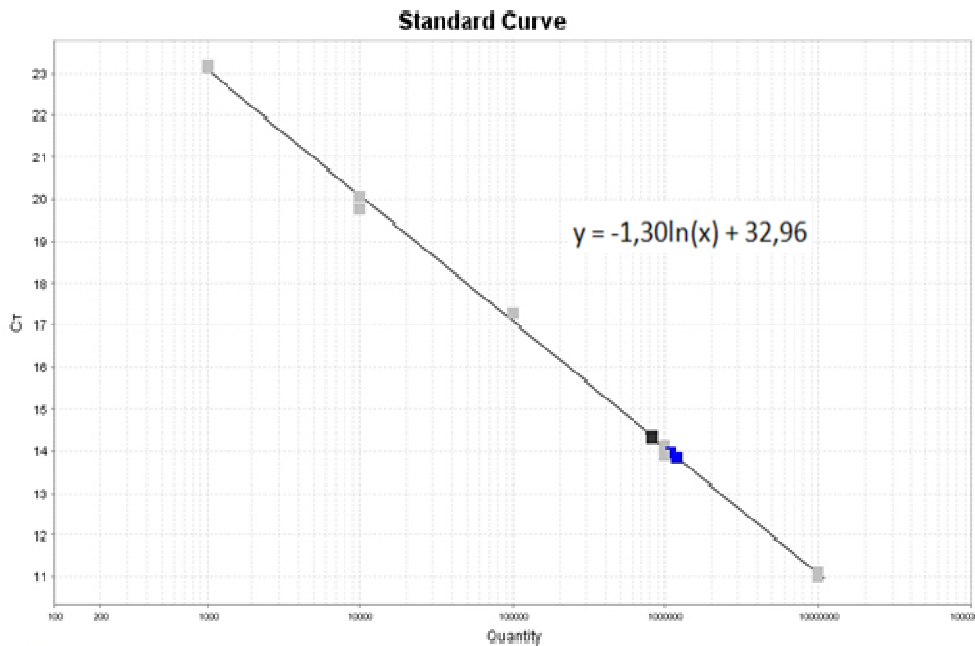
Los oligonucleótidos utilizados como *primers* son los siguientes:

Secuencia a amplificar	Oligonucleótido	Secuencia (sentido 5´-3´)
WPRE	Fw wpre	CGCTGCTTTAATGCCTTTGT
	Rev wpre	GGGCCACAACCTCATAAA

Para las reacciones de PCR se utilizó la *master mix 5X HOT FIRE Pol EvaGreen qPCR Mix Plus (Rox)*(Solis BioDyne), preparando la mezcla de

reacción de acuerdo con las instrucciones del fabricante (descrito en el apartado anterior (3.3.4.)).

A partir del resultado de la reacción, se confecciona una gráfica con los valores de  $C_T$  (ciclo en el cual la curva de amplificación supera la línea de base o *threshold*) para cada punto de la curva de calibrado, expresado en número de copias. El eje abscisas se coloca en escala logarítmica y se realiza un ajuste lineal, obteniendo del mismo la ecuación de la curva (Fig. 72).



**Figura 72. Análisis del número de copias de transgen, por qPCR.** Una muestra de genoma del clon adhP2E5 fue analizada, utilizando un set de *primers* específicos para la secuencia WPRE. Se confeccionó una curva de calibrado utilizando el plásmido pLV-CMV-GlycoG.

Con el dato de  $C_T$  de la muestra incógnita se calcula el número de copias presente en la misma. Finalmente, teniendo en cuenta que en la reacción se utilizó como templado una muestra con 1.000.000 de copias de genoma, se obtiene el número de copias de transgen para cada genoma.

## 4. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE RV-VLPs

### 4.1. Purificación de RV-VLPs por ultracentrifugación

El protocolo llevado a cabo para la concentración y purificación RV-VLPs por ultracentrifugación consta de dos etapas. Durante la primera, denominada recuperación, las VLPs son concentradas a partir del sobrenadante de cultivo, reduciendo así el volumen de muestra que será luego utilizado en la segunda etapa en la que se llevará a cabo la purificación propiamente dicha.

Para la purificación de RV-VLPs a partir de sobrenadante de cultivo se utilizaron las siguientes soluciones, reactivos y equipamiento:

- Buffer C: Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, EDTA 1,0 mM, pH 7,4
- Solución de sacarosa 30% (P/V) en buffer C
- Iodixanol (*OptiPrep Density Gradient Medium*, Axis-Shield)
- Ultracentrífuga: Avanti J30i (Beckman Coulter)
- Rotores: JA-10, JA-30.50 y JS-24.15 (Beckman Coulter)

#### 4.1.1. Recuperación

1. Realizar una primera centrifugación del sobrenadante conteniendo las VLPs a 100 g durante 10 min y trasvasar a otro tubo.
2. Centrifugar a 2.000 g durante 10 min a 4 °C. Trasvasar el sobrenadante a un tubo nuevo.

*En este paso se eliminan tanto las células viables como células muertas presentes en el sobrenadante.*

3. Filtrar el sobrenadante a través de membranas de 0,45 µm de poro.

*En este paso se elimina debris celular y trozos de membrana celular remanente en el medio.*

4. Transferir el medio a un tubo de ultracentrífuga Beckman de 45 ml.
5. Centrifugar a 65.000 g, utilizando rotor JA-30.50, durante 2h 30 min a 4 °C.

*Durante este tiempo de centrifugación se concentran las partículas virales, acompañadas de proteínas adsorbidas en su superficie y pueden llegar a ser precipitados agregados de proteínas de alto peso molecular.*

6. Descartar todo el sobrenadante y secar el tubo colocándolo boca abajo sobre un papel absorbente.
7. Agregar sobre el *pellet* 1 ml de buffer, agitar el tubo e incubar ON a 4 °C.

### 4.1.2. Purificación

8. Juntar los volúmenes de los diferentes tubos provenientes del paso 6. en un tubo de ultracentrífuga nuevo.
9. Llevar a 35 ml finales de buffer.
10. Preparar una solución de sacarosa al 30% (P/V) en buffer C.
11. Preparar un colchón con esta solución, adicionando 10 ml en el fondo de un tubo para rotor JA-30.50.
12. Cargar los 35 ml de partículas virales suavemente sobre el colchón de sacarosa.
13. Centrifugar a 65.000 *g* o más, durante 2h 30 min a 4 °C.  
*Durante este paso las partículas virales atraviesan el colchón de sacarosa por su densidad y los agregados proteicos y demás contaminantes no.*
14. Descartar todo el sobrenadante y secar el tubo colocándolo boca abajo sobre un papel absorbente.
15. Resuspender el *pellet* en 1 ml de buffer.
16. Preparar un gradiente discontinuo de iodixanol (50, 40, 30, 20 y 10%) en tubos *Ultra-Clear open top* de 15 ml (16x96 mm, Beckman Coulter). Dejar reposar 1 h.
17. Cargar lentamente todo el volumen de VLPs provenientes del paso 15 sobre el gradiente.
18. Centrifugar a 65.000 *g*, utilizando rotor JS-24.15, durante 6 h a 4 °C.
19. Observar el tubo a contraluz, utilizando una linterna en un cuarto oscuro, analizando las bandas de partículas obtenidas.
20. Alicuotar cuidadosamente cada una de ellas por separado.
21. Realizar un cambio de buffer para retirar el iodixanol de las muestra, llevando a cabo una ultrafiltración con dispositivos *AmiconUltra* de 100 kDa MWCO, utilizando buffer C.
22. Trasvasar a un tubo tipo eppendorf y conservar a 4 °C.

### 4.2. Purificación de RV-VLPs por cromatografía de exclusión molecular

- Resina: 70 ml de *Sephacryl S-500 High Resolution* (GH Healthcare)
- Columna: XK 16/40; dimensiones: 1,6 x 40 cm (GH Healthcare)
- Equipo: *AKTA P-900* (GH Healthcare)
- Buffer: Tris 20 mM, 150 mM NaCl, pH 7

- Protocolo:
  1. Equilibrar la columna con 2 volúmenes de columna (VC) de buffer a un flujo de 1 ml/min.
  2. Sembrar 4 ml de muestra (aproximadamente 5% del volumen de columna) a un flujo de 1 ml.min<sup>-1</sup>.
  3. Recolectar fracciones de 2 ml, durante la elución con 1,5 VC de buffer. Conservar las fracciones a 4 °C para su posterior análisis.
  4. Sanitizar la resina con 2 VC de agua y 1,5 VC de una solución 0,1 M de NaOH (CIP, *cleaning in place*).
  5. Conservar en etanol 20% (V/V).

### 4.3. **Dynamic light scattering (DLS)**

Para las determinaciones de tamaño de partícula se empleó un equipo de dispersión dinámica de luz *Zetasizer nano-ZS* (Malvern Instrument Ltd.) equipado con un láser de 633 nm de longitud de onda. Las mediciones se llevaron a cabo a 25 °C y un tiempo de equilibrio de cinco minutos. La posición de lectura de la celda y nivel de atenuación (0-100%) a usar fueron ajustadas automáticamente por el software de control del equipo (*Zetasizer software 6.01*). Las mediciones se hicieron en una celda de cuarzo con un paso óptico de 3 mm (Malvern Instruments Ltd.).

### 4.4. **Microscopía electrónica de transmisión (MET)**

1. Filtrar las muestras de VLPs, al igual que los buffers y el agua a ser utilizada en el ensayo, utilizando un filtro tipo jeringa con 0,45 µm de tamaño de poro.
2. Adsorber 10 µl de una muestra de VLPs purificadas sobre una rejilla de cobre (*300-mesh*) cubierta de formvar y carbón, durante 2 min a TA.
3. Remover el exceso de muestra cuidadosamente con un papel de filtro y lavar dos veces la rejilla flotando la misma sobre una gota de solución de albúmina sérica bovina (BSA) 2% (P/V).
4. Flotar la rejilla sobre una gota de acetato de uranilo 2% (P/V) para tinción negativa de la muestra.
5. Observar al microscopio electrónico (*JSM-100 CX II*, Jeol).

#### 4.5. Inmunomarcación con partículas de oro en MET

1. Filtrar las muestras de VLPs, al igual que los buffers y el agua a ser utilizada en el ensayo, utilizando un filtro tipo jeringa con 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.
2. Adsorber 10  $\mu\text{l}$  de una muestra de VLPs purificadas sobre una rejilla de cobre (*300-mesh*) cubierta de formvar y carbón, durante 2 min a TA.
3. Remover el exceso de muestra cuidadosamente con un papel de filtro y lavar dos veces la rejilla flotando la misma sobre una gota de solución de albúmina sérica bovina (BSA) 2% (P/V).
4. Bloquear incubando la rejilla con una solución de gelatina 2% (P/V) en buffer TBS, durante 30 min a TA.
5. Incubar 1 h a TA con un anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína G (AB5; Ramírez, 2008), flotando la rejilla sobre una gota de una solución 1/100 del mismo, preparada en buffer TBS/BSA 2%.
6. Repetir paso 3.
7. Realizar una incubación, de la misma manera, con una solución 1/20 de un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a partículas de oro coloidal de 6 nm de diámetro (*Colloidal Gold-AffiniPure goat anti-mouse IgG*, Jackson ImmunoResearch).
8. Repetir paso 3.
9. Flotar la rejilla sobre una gota de acetato de uranilo 2% (P/V) para tinción negativa de la muestra.
10. Observar al microscopio electrónico (*JSM-100 CX II*, Jeol).

#### 4.6. SDS-PAGE - western blot

- Gel: se utilizó un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% (P/V) en condiciones reductoras
- Buffer de siembra: Tris 50 mM, SDS 2% (P/V), glicerol 10% (V/V),  $\beta$ -mercaptoetanol 5%(V/V), azul de bromofenol 0,05% (P/V), pH 6,8
- Solución de bloqueo: leche descremada 5% (P/V) en buffer TBS (Tris 0,05 M; NaCl 0,015 M, pH 7,5)
- Solución de lavado: Tween-20 0,05% (V/V) en buffer TBS
- Solución diluyente: leche descremada 0,5% (P/V) en buffer TBS

- Anticuerpo primario: suero de conejo anti-virus de la rabia, generado en nuestro laboratorio utilizando como inmunógeno una vacuna antirrábica (Ramirez, 2008)
- Anticuerpo secundario: inmunoglobulinas de cabra anti-IgG de conejo conjugadas a la enzima HRP (*P0448*, Dako)
- Revelado: kit de quimioluminiscencia *ECL Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare)
- Protocolo:
  1. Preparar las muestras en buffer de siembra con una proporción 1:3 e incubar a 100 °C durante 3 min.
  2. Sembrar en gel de poliacrilamida y colocar en cuba electroforética.
  3. Aplicar un voltaje de 200 V hasta que el frente de corrida llegue al límite del gel de separación.
  4. Transferir las proteínas a una membrana de PVDF (Bio-Rad).
  5. Bloquear los sitios de unión inespecífica de la membrana sumergiéndola en solución de bloqueo durante 1 h, a TA con agitación.
  6. Lavar la membrana durante 5 min en solución de lavado con agitación. Repetir 3 veces.
  7. Incubar con una dilución 1/2.000 de anticuerpo primario, durante 1 h a TA con agitación.
  8. Repetir paso 6.
  9. Incubar con una solución de anticuerpo secundario, en una dilución 1/2.000 durante 1 h a TA con agitación.
  10. Repetir paso 6.
  11. Incubar durante 1 min con solución de revelado y escurrir exceso.
  12. Colocar en un soporte de nylon y exponer la membrana a una película fotográfica (*Kodak Biomax XAR Film*, Kodak) en cuarto oscuro. Evaluar diferentes tiempos de exposición para lograr la máxima resolución con buen contraste entre la señal quimioluminiscente y el fondo.
  13. Revelar por método convencional utilizando soluciones de revelado (Kodak) y fijación (Fijador gráfico LITH, AGFA).

#### 4.7. ELISA sándwich

- Solución de sensibilización:  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  50 mM, pH 9,6
- Solución de bloqueo: BSA 1% (P/V) en PBS
- Solución diluyente: BSA 0,1% (P/V), Tween-20 0,05% (P/V) en PBS
- Solución de revelado:  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,015 vol., OPD 0,5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , en solución de citrato/fosfato de sodio 50 mM, pH 5,3
- Anticuerpo de captura: suero de conejo anti-virus de la rabia, generado en nuestro laboratorio utilizando como inmunógeno una vacuna antirrábica (Ramirez, 2008)
- Anticuerpo de detección: inmunoglobulinas de conejo anti-virus de la rabia purificadas y conjugadas a biotina
- Protocolo:
  1. Sensibilizar placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano con un volumen de 100  $\mu\text{l}$  por pozo de solución de anticuerpo de captura, durante 1 h a 37°C y luego 16 h a 4°C.
  2. Realizar seis lavados con solución de Tween-20 0,05% (V/V) en PBS.
  3. Bloquear sitios de interacción inespecífica con 200  $\mu\text{l}$  por pozo de solución de bloqueo, incubando durante 1 h a 37°C.
  4. Repetir paso 2.
  5. Agregar 100  $\mu\text{l}$  por pozo de diluciones seriadas de las muestras a analizar, en solución diluyente. Incubar durante 1 h a 37°C.
  6. Repetir paso 2.
  7. Adicionar 100  $\mu\text{l}$  por pozo de solución de anticuerpo de detección en una dilución 1/2.000. Incubar 1h a 37°C.
  8. Repetir paso 2.
  9. Colocar 100  $\mu\text{l}$  por pozo de una solución de Streptavidina-HRP (*Amdex*, GE Healthcare) en una dilución 1/10.000 preparada en solución diluyente.
  10. Repetir paso 2.
  11. Agregar 100  $\mu\text{l}$  por pozo de solución de revelado y, luego de 15 min de incubación en oscuridad a TA, detener la reacción mediante el agregado de 50  $\mu\text{l}$  por pozo de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N.
  12. Leer absorbancia a  $\lambda = 492$  nm en lector de placas *Multiskan* (Thermo Scientific).



## 5. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES INMUNOGÉNICAS DE LAS RV-VLPs

### 5.1. Inmunización de animales de experimentación con RV-VLPs. Comparación con vacunas antirrábicas comerciales

- Animales: ratones Balb/c hembras de 4 a 5 semanas de edad
- Grupo I (n=5): se inyectaron RV-VLPs, purificadas por ultracentrifugación, conteniendo una cantidad de glicoproteína G (medido por ELISA sándwich) igual a una dilución 1/20 de una vacuna antirrábica humana y equivalente a 0,3 µg proteína total
- Grupo II (n=5): se inyectaron RV-VLPs, purificadas por ultracentrifugación, conteniendo una cantidad de glicoproteína G (medido por ELISA sándwich) igual a una dilución 1/2 de una vacuna antirrábica humana y equivalente a 3 µg proteína total
- Grupo III (n=4): se inyectó una vacuna antirrábica veterinaria (*Bagovac Rabia*, Biogénesis Bagó) conteniendo una cantidad de glicoproteína G (medido por ELISA sándwich) igual a una dilución 1/20 de una vacuna antirrábica humana
- Grupo IV (n=4): se inyectó una vacuna antirrábica de uso humano (*Verorab*, Sanofi-Pasteur) en una dilución 1/20
- Adyuvante: Freund incompleto (Sigma-Aldrich)
- Dosis y vía de administración: se aplicaron dos dosis, en los días 0 y 7, inyectando por vía intramuscular 100 µl de cada preparado con el agregado de adyuvante (Wunderli y col. 2006)
- Sangrado: en el día 19 se recolectaron los sueros de los animales inmunizados y el título de anticuerpos se evaluó por ELISA específico indirecto y citometría de flujo

#### 5.1.1. ELISA específico indirecto

- Solución de sensibilización: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 50 mM, pH 9,6
- Solución de bloqueo: BSA 1% (P/V) en PBS
- Solución diluyente: BSA 0,1%(P/V) , Tween-20 0,05% (V/V) en PBS
- Solución de revelado: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,015 vol., OPD 0,5 mg.ml<sup>-1</sup>, en solución de citrato/fosfato de sodio 50 mM, pH 5,3

- Anticuerpo de detección: inmunoglobulinas de conejo anti-ratón conjugadas a la enzima HRP (*P0260*, Dako)
- Protocolo:
  1. Sensibilizar placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano con un volumen de 100  $\mu$ l por pozo de una solución de RV-VLPs purificadas, durante 1 h a 37°C y luego 16 h a 4°C.
  2. Realizar seis lavados con solución de Tween-20 0,05% (V/V) en PBS.
  3. Bloquear sitios de interacción inespecífica con 200  $\mu$ l por pozo de solución de bloqueo, incubando durante 1 h a 37°C.
  4. Repetir paso 2.
  5. Agregar 100  $\mu$ l por pozo de diluciones seriadas de las muestras de suero a analizar, en solución diluyente. Incubar durante 1 h a 37°C.
  6. Repetir paso 2.
  7. Adicionar 100  $\mu$ l por pozo de solución de anticuerpo de detección en una dilución 1/2.000. Incubar 1h a 37°C.
  8. Repetir paso 2.
  9. Agregar 100  $\mu$ l por pozo de solución de revelado y, luego de 15 min de incubación en oscuridad a TA, detener la reacción mediante el agregado de 50  $\mu$ l/pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N.
  10. Leer absorbancia a  $\lambda = 492$  nm en lector de placas *Multiskan* (Thermo Scientific).

Se utiliza como control negativo un suero basal de ratón. Con el mismo se calcula el valor de *cut off* como el promedio del valor de absorbancia de este control más dos desviaciones estándar. Para obtener el valor del título de inmunoglobulinas específicas en las muestras analizadas se toma la dilución que posea un valor de absorbancia mayor al *cut off*.

### 5.1.2. Citometría de flujo sobre células VERO-G

El presente protocolo de detección de anticuerpos específicos antirrábicos utilizando un clon celular VERO-G fue desarrollado durante el trabajo de la presente tesis y el fundamento del método se encuentra detallado en el Anexo II.

- Protocolo:
  1. Preparar diluciones seriadas al medio de los sueros a evaluar en un volumen final de 50  $\mu$ l de medio MEM basal.
  2. A partir de un cultivo en fase exponencial del clon P1B6, adicionar a cada dilución 50  $\mu$ l de una suspensión celular conteniendo  $1 \times 10^5$  cél. totales en medio de cultivo MEM basal.
  7. Incubar durante 30 min a TA.
  8. Lavar las células adicionando 1 ml de medio basal y centrifugando durante 8 min a 100 *g*.
  9. Resuspender el pellet celular en 100  $\mu$ l de una solución conteniendo una dilución 1/1.000 del anticuerpo *AlexaFluor 488 goat anti-mouse* (Invitrogen) e incubar durante 30 min a TA.
  10. Repetir el paso 3.
  11. Resuspender el pellet en 200  $\mu$ l de medio basal y analizar por citometría de flujo.
  12. Graficar el porcentaje de células fluorescentes con respecto a las diluciones de sueros.

Se utilizó un citómetro de flujo *Guava EasyCyte* (Guava), el cual tiene la posibilidad de adquirir muestras presentes en una placa de 96 pozos, y los datos fueron analizados con el software *GUAVA ExpressPlus*.

### **5.2. Ensayo de potencia de vacuna antirrábica (NIH *potency test*)**

La medición de la potencia de vacuna antirrábica se lleva a cabo con el test del NIH. En este ensayo, se inmunizan animales con la vacuna a evaluar y con una vacuna de referencia y, posteriormente, estos animales son desafiados por vía intracerebral con el virus de la rabia activo, con el objetivo de evaluar si la respuesta inmune desarrollada fue protectora y de calcular su potencia. Ya que es necesaria la manipulación del virus, este ensayo no pudo llevarse a cabo en las instalaciones de nuestro laboratorio, por la falta de la contención viral requerida para dicho patógeno. Durante el desarrollo de la presente tesis el ensayo de potencia del NIH fue llevado a cabo en colaboración con dos instituciones estatales:

- Laboratorio Animal DILAB-SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). Este laboratorio es el encargado de la evaluación y

liberación de lotes de vacuna antirrábica veterinaria comercializados en el país. Los ensayos NIH se llevaron a cabo en colaboración con la Lic. Susana Russo, jefa del Departamento de Rabia y Pequeños Animales de dicha institución.

- Instituto Biológico “Dr. Tomás Perón” de la Provincia de Buenos Aires. En dicha institución se producen, entre otros productos biológicos, vacunas y sueros para enfermedades infecciosas, entre las cuales se encuentran vacunas antirrábicas de uso humano y de uso veterinario, del tipo CRL. En este contexto, se trabajó en colaboración con el Departamento de Calidad de Productos Biológicos de la mencionada institución.

El ensayo de potencia del NIH es el recomendado por la OMS para la valoración de las vacunas antirrábicas (Wilbur y Aubert, 1996).

- Animales: ratones CF-1
- Vacuna de referencia (VR): estándar internacional *6th International Standard for Rabies vaccine (WHO International Standard, NIBSC code: 07/162)* o una vacuna de referencia interna valorada con dicho estándar
- Virus desafío: *Challenge Virus Standard (CVS)* (Wilbur y Aubert, 1996)
- Protocolo:
  1. Preparar 4 diluciones (1/5, 1/25, 1/125 y 1/625) de la vacuna a evaluar y de la vacuna de referencia en buffer PBS.
  2. Preparar grupos de 16 ratones para cada dilución e inyectar 0,5 ml por vía intraperitoneal en los días 0 y 7.
  3. En el día 14, desafiar cada ratón inyectando intracerebralmente 0,03 ml de una dilución de CVS conteniendo entre 12 y 50 LD<sub>50%</sub> (dosis letal 50%)
  4. Observar los animales diariamente durante 14 días, anotando el número de ratones muertos.
  5. Calcular la dosis efectiva 50% (ED<sub>50%</sub>, dilución que sea capaz de proteger al 50% de los animales evaluados) de cada muestra. La potencia relativa final de la vacuna evaluada se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$PR = \frac{ED_{50\%} \text{ de } V}{ED_{50\%} \text{ de } VR} \times \frac{\text{dosis de } V}{\text{dosis de } VR}$$

Siendo:

PR: potencia relativa

V: vacuna a evaluar

VR: vacuna de referencia

Dosis: volumen de una dosis vacunal

### **5.3. Detección de anticuerpos neutralizantes**

El título de anticuerpos neutralizantes en sueros de animales inmunizados con RV-VLPs fue calculado llevando a cabo un protocolo desarrollado durante la presente tesis, cuyo fundamento se encuentra detallado en el Anexo III.

- Protocolo:

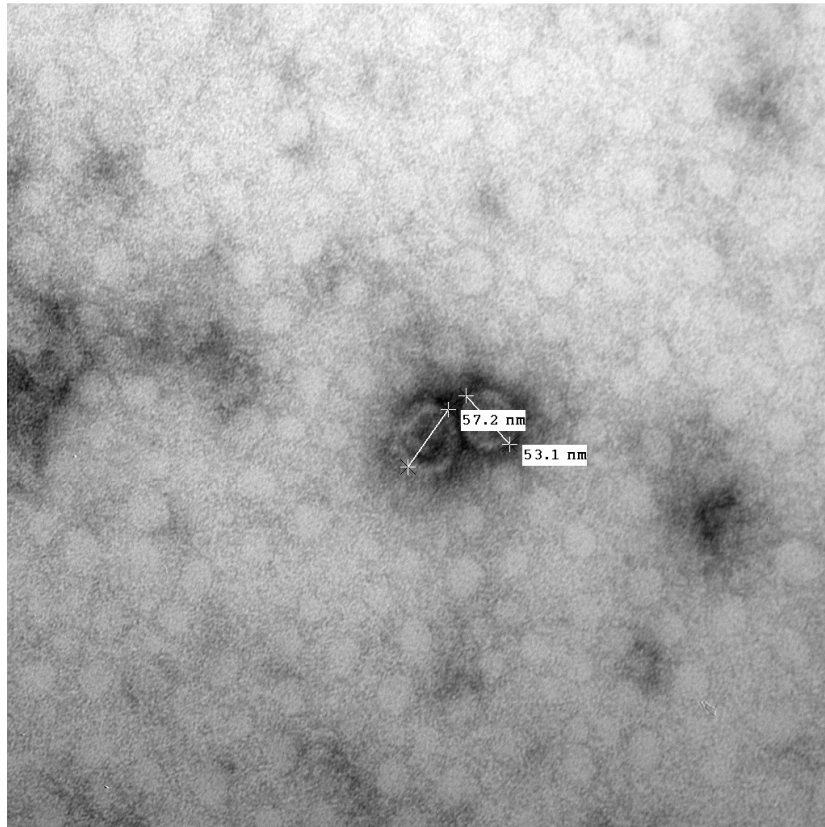
1. Utilizando una placa de cultivo de 96 pozos, preparar diluciones seriadas al medio de los sueros a evaluar, en un volumen final de 50  $\mu$ l, utilizando medio DMEM basal. Para cuantificar, utilizar un estándar de inmunoglobulinas antirrábicas (*2nd International Standard for Anti-Rabies Immunoglobulin, NIBSC code: RA1*)
2. Agregar a cada pozo 50  $\mu$ l de un stock de LV-GFP(GlycoG) con un título de  $1 \times 10^6$  UT. $\text{ml}^{-1}$  e incubar 1 h at 37°C.
3. Luego de la incubación, agregar a cada pozo  $5 \times 10^3$  células HEK293 totales en un volumen final de 50  $\mu$ l e incubar durante 72 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.
4. Finalmente, retirar el sobrenadante de cultivo, despegar la monocapa celular utilizando tripsina y evaluar las células por citometría de flujo.
5. Graficar el porcentaje de células fluorescentes (GFP positivas) en función de las diluciones o de la concentración de anticuerpos neutralizantes para el estándar.

# **ANEXOS**

# **ANEXO I**

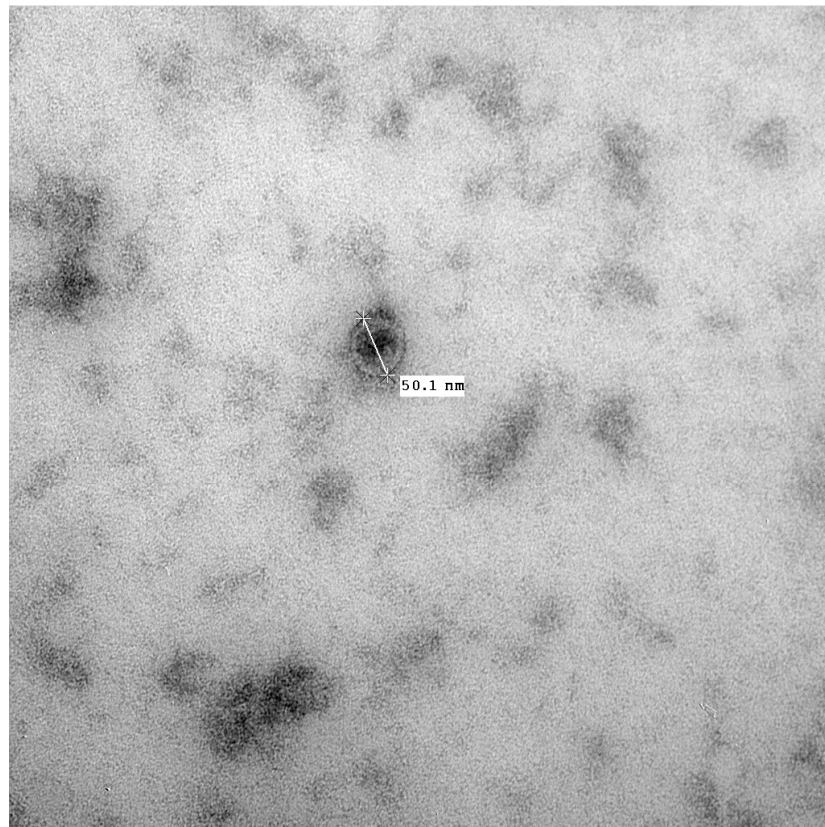
## **Micrografías electrónicas de las RV-VLPs**

MET de VLPs producidas por la línea **LHEK-G**



200.01M.tif  
Print Mag: 75600x @ 51 mm  
12:13 09/25/12

100 nm  
HV=80kV  
Direct Mag: 200000x  
AMT Camera System

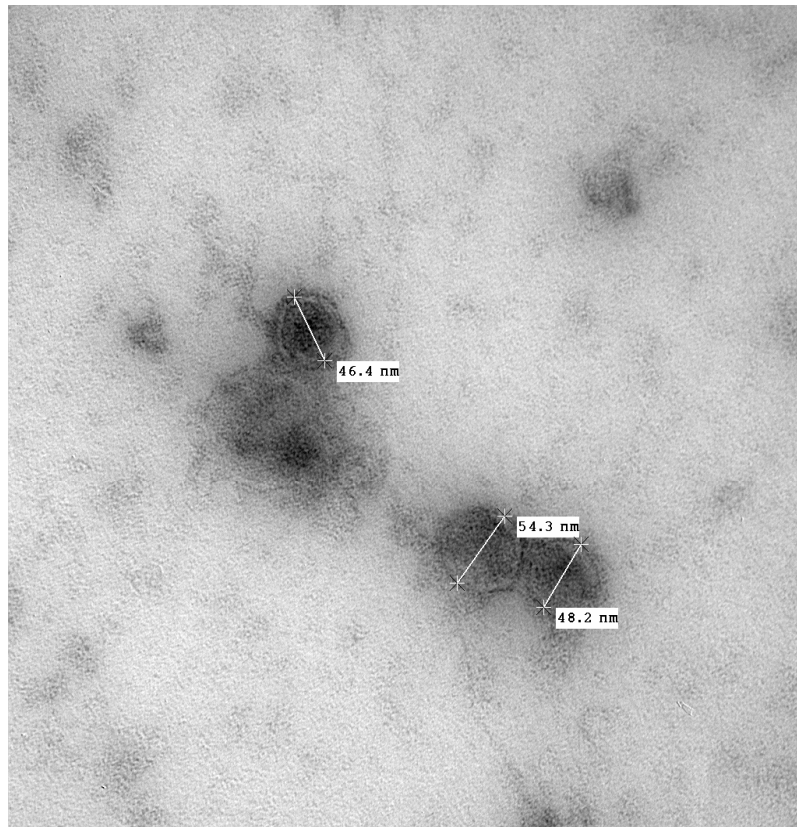


200.04M.tif  
Print Mag: 75600x @ 51 mm  
12:24 09/25/12

100 nm  
HV=80kV  
Direct Mag: 200000x  
AMT Camera System

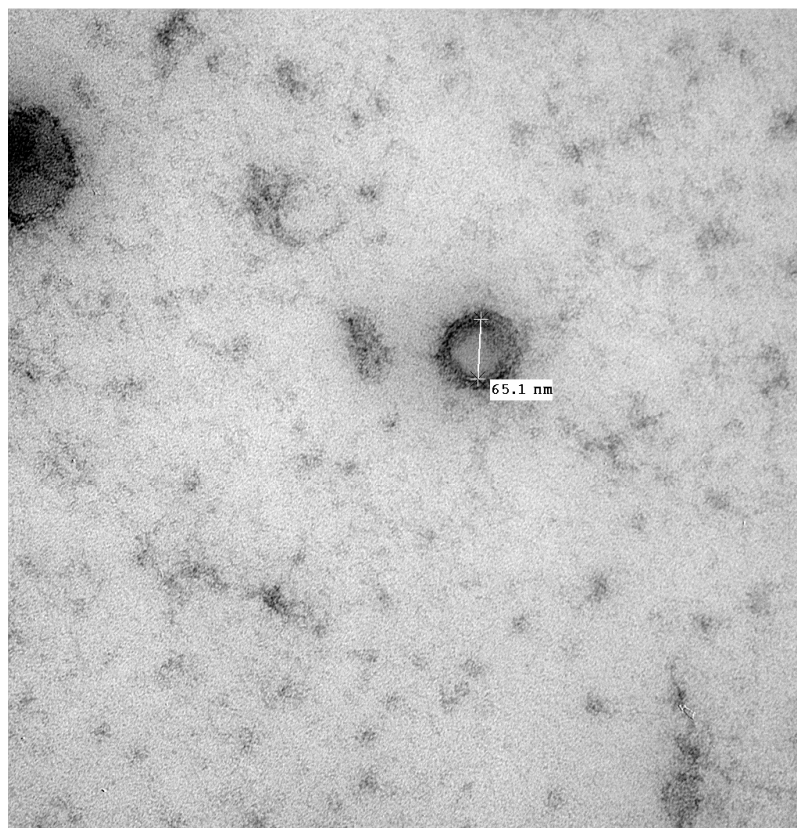


MET de VLPs producidas por la línea **LHEK-G**



250 01M.tif  
Print Mag: 94500x @ 51 mm  
12:42 09/25/12

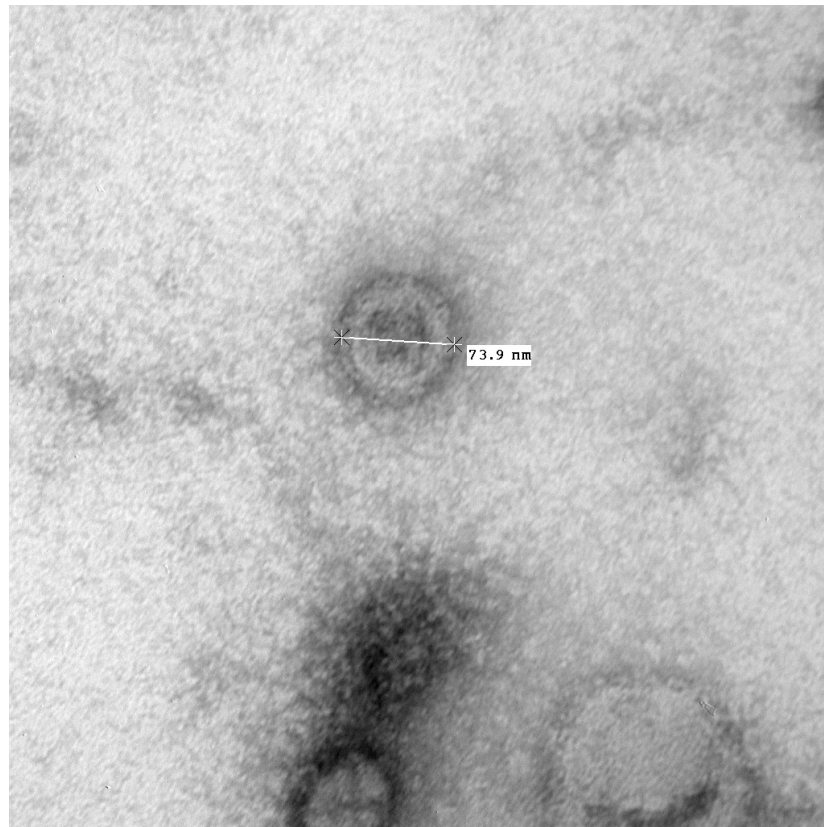
100 nm  
HV=80kV  
Direct Mag: 250000x  
AMT Camera System



A1-4 150k01b.tif  
Print Mag: 56700x @ 51 mm  
12:17 09/14/12

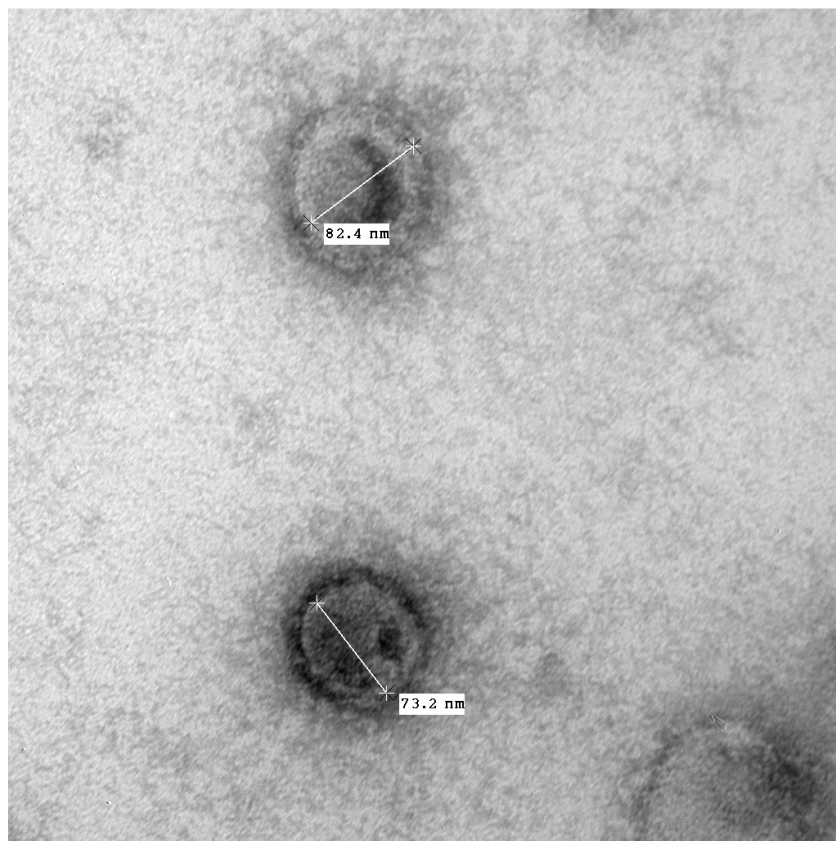
100 nm  
HV=80kV  
Direct Mag: 150000x  
AMT Camera System

MET de VLPs producidas por la línea **LHEK-G**



A1-4 250k04b.tif  
Print Mag: 94500x @ 51 mm  
12:26 09/14/12

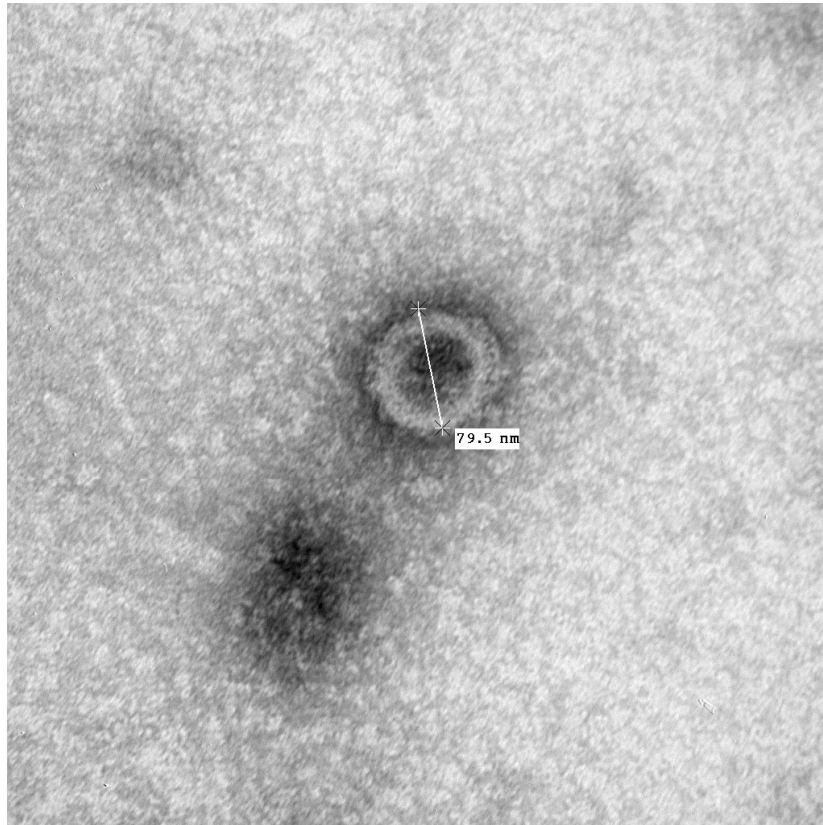
100 nm  
HV=80kV  
Direct Mag: 250000x  
AMT Camera System



A1-4 250k05b.tif  
Print Mag: 94500x @ 51 mm  
12:27 09/14/12

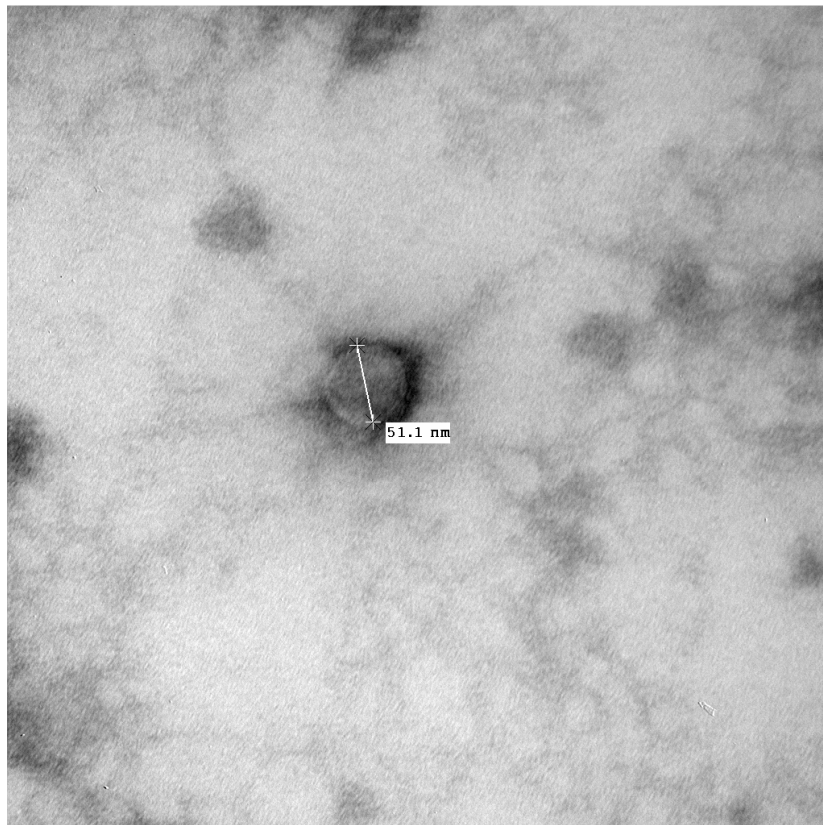
100 nm  
HV=80kV  
Direct Mag: 250000x  
AMT Camera System

MET de VLPs producidas por la línea **LHEK-G**



A1-4 250k11b.tif  
Print Mag: 94500x @ 51 mm  
12:39 09/14/12

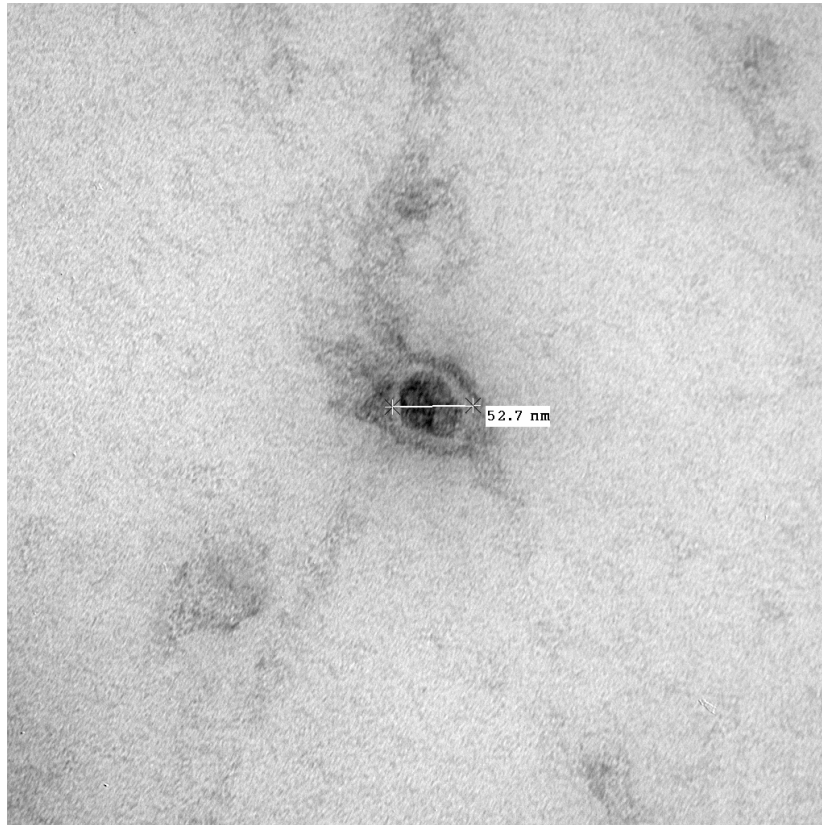
100 nm  
HV=80kV  
Direct Mag: 250000x  
AMT Camera System



A1-4 250k06b.tif  
Print Mag: 94500x @ 51 mm  
11:57 09/14/12

100 nm  
HV=80kV  
Direct Mag: 250000x  
AMT Camera System

MET de VLPs producidas por la línea **LHEK-G/M**



35-5 250k04b.tif

Print Mag: 94500x @ 51 mm

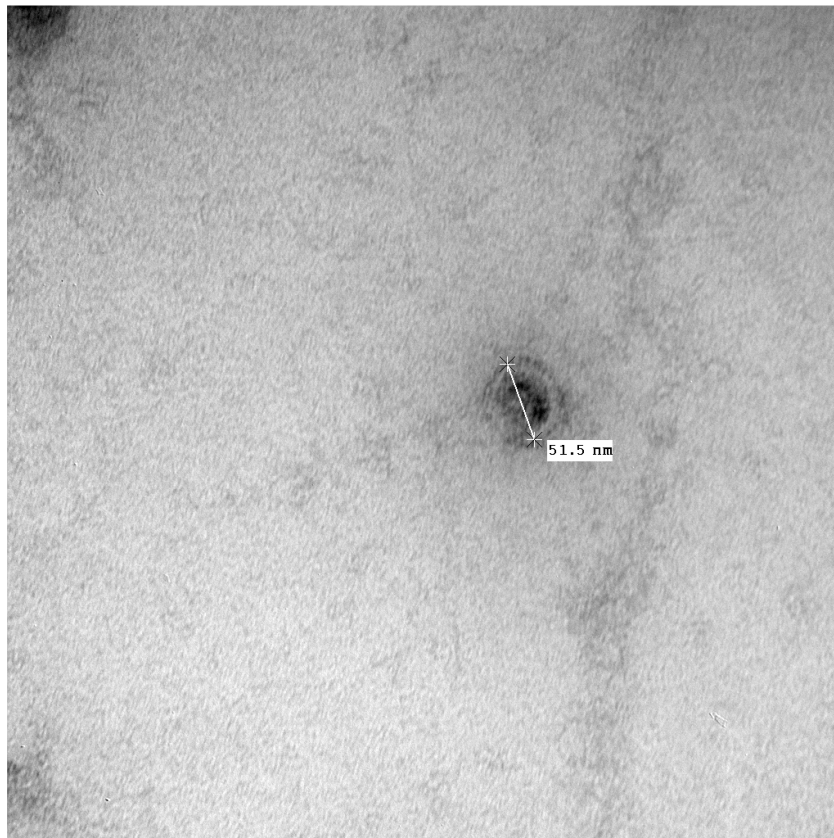
13:23 09/14/12

100 nm

HV=80kV

Direct Mag: 250000x

AMT Camera System



35-5 250k07b.tif

Print Mag: 94500x @ 51 mm

13:30 09/14/12

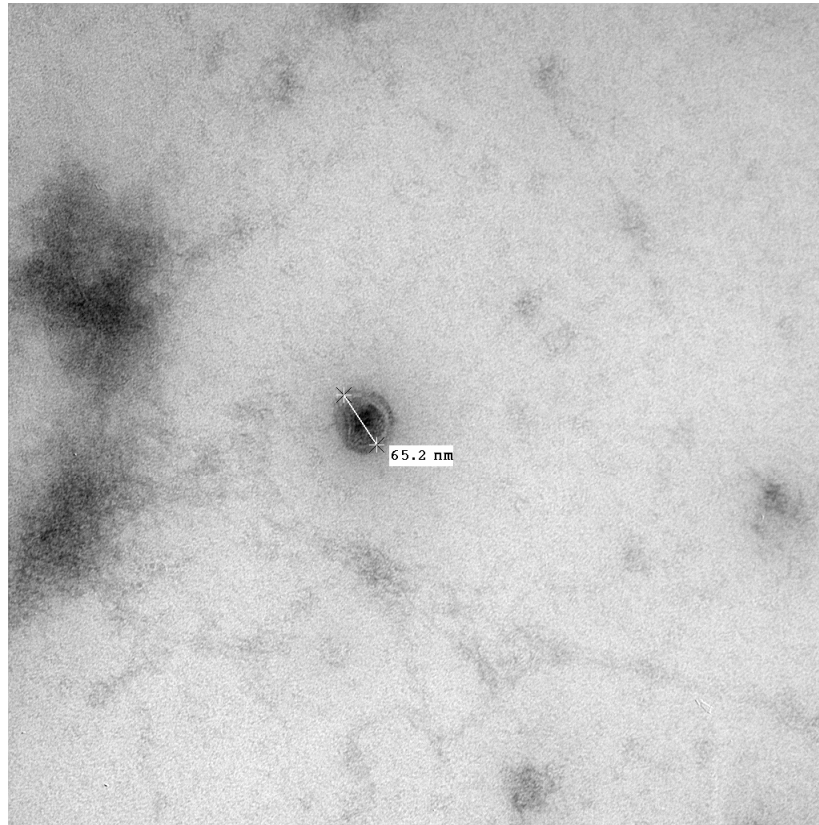
100 nm

HV=80kV

Direct Mag: 250000x

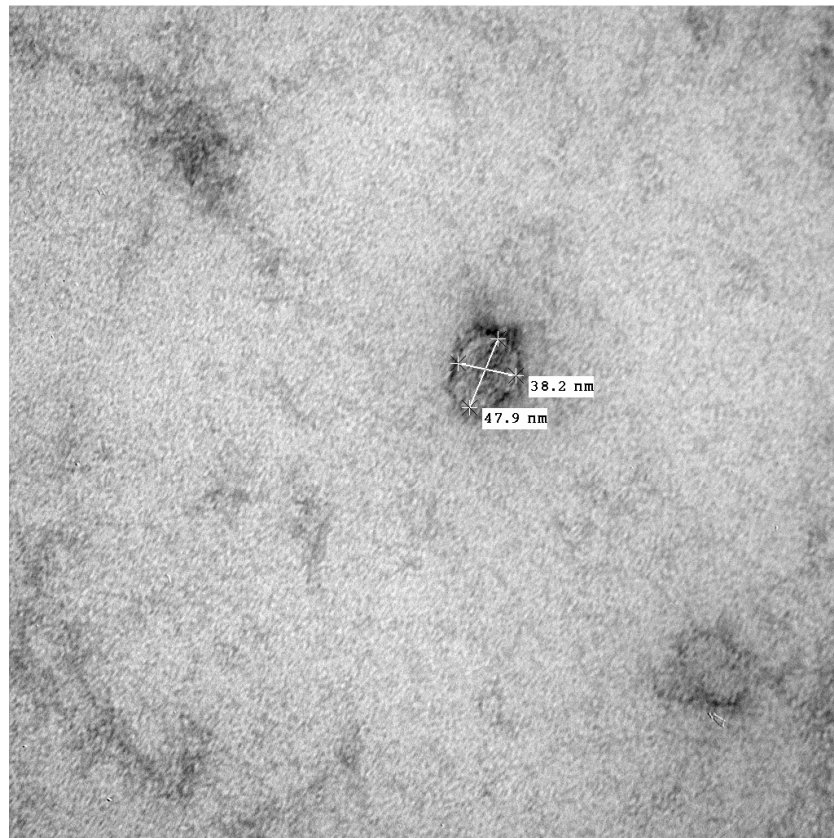
AMT Camera System

MET de VLPs producidas por la línea **LHEK-G/M**



35-5 150k01b.tif  
Print Mag: 56700x @ 51 mm  
13:13 09/14/12

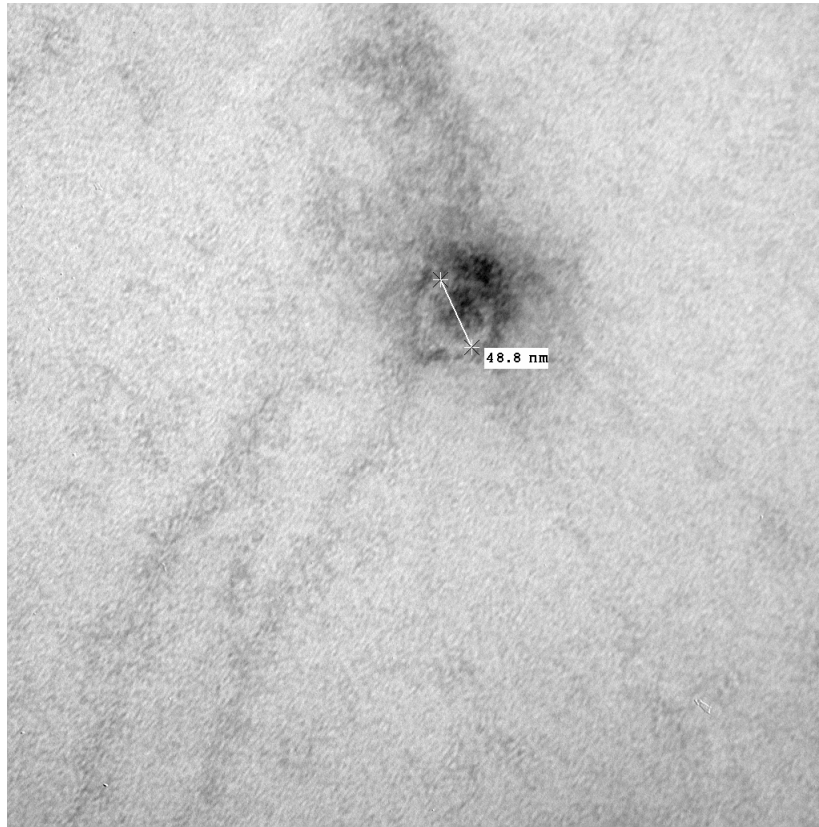
100 nm  
HV=80kV  
Direct Mag: 150000x  
AMT Camera System



35-5 250k02b.tif  
Print Mag: 94500x @ 51 mm  
13:18 09/14/12

100 nm  
HV=80kV  
Direct Mag: 250000x  
AMT Camera System

MET de VLPs producidas por la línea **LHEK-G/M**



35-5 250k03b.tif

Print Mag: 94500x @ 51 mm

13:20 09/14/12

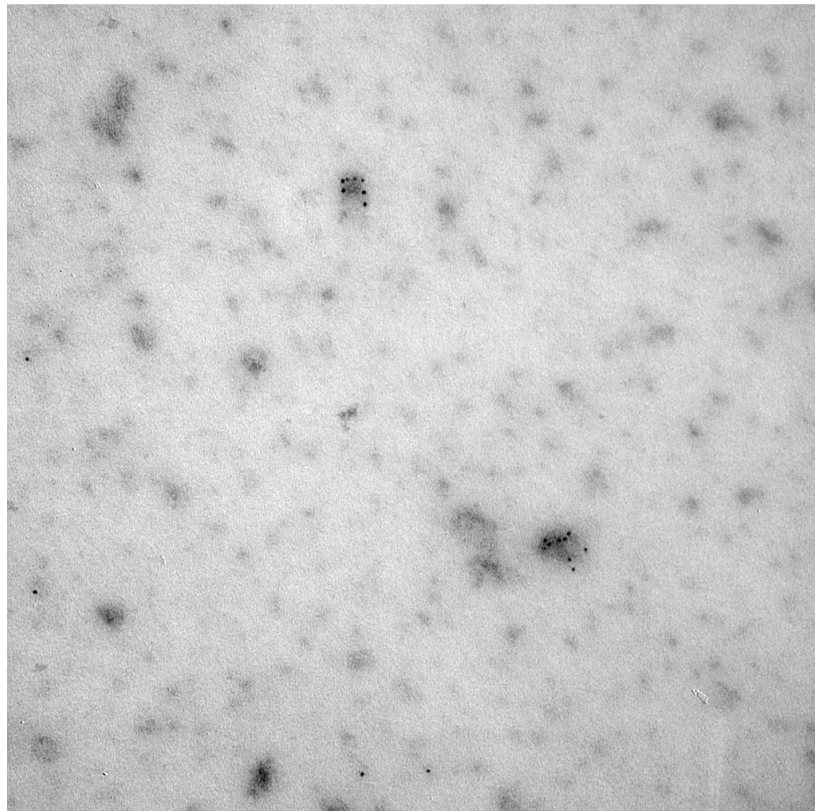
100 nm

HV=80kV

Direct Mag: 250000x

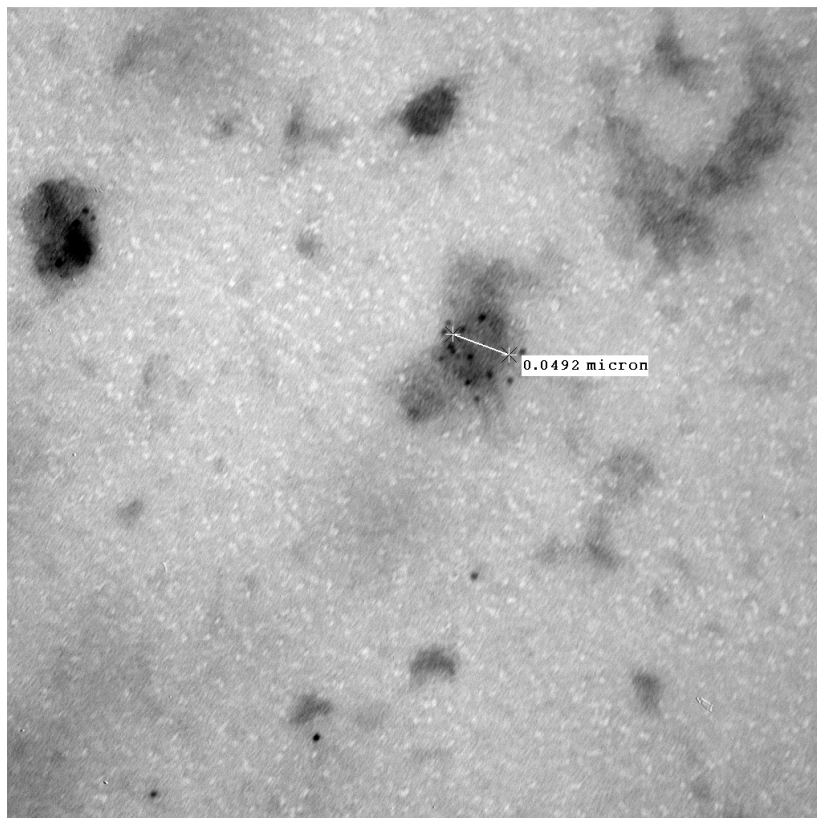
AMT Camera System

MET de VLPs **inmunomarcadas con oro coloidal**



120.23.tif  
Print Mag: 45300x @ 51 mm  
11:23 10/02/12

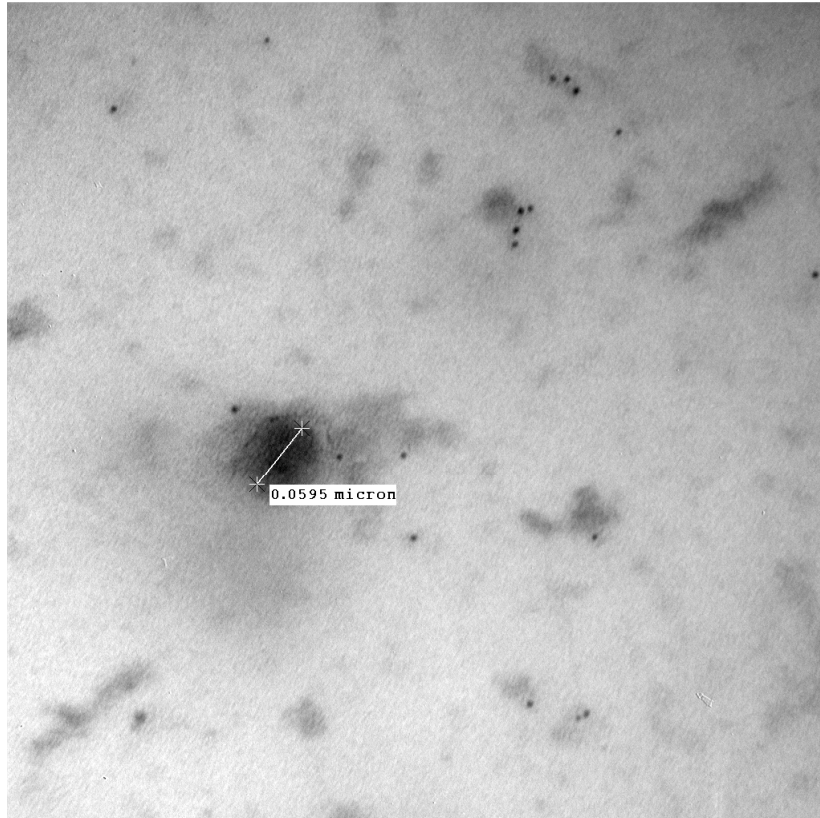
100 nm  
HV=80kV  
Direct Mag: 120000x  
AMT Camera System



200.06M.tif  
Print Mag: 75600x @ 51 mm  
10:34 10/02/12

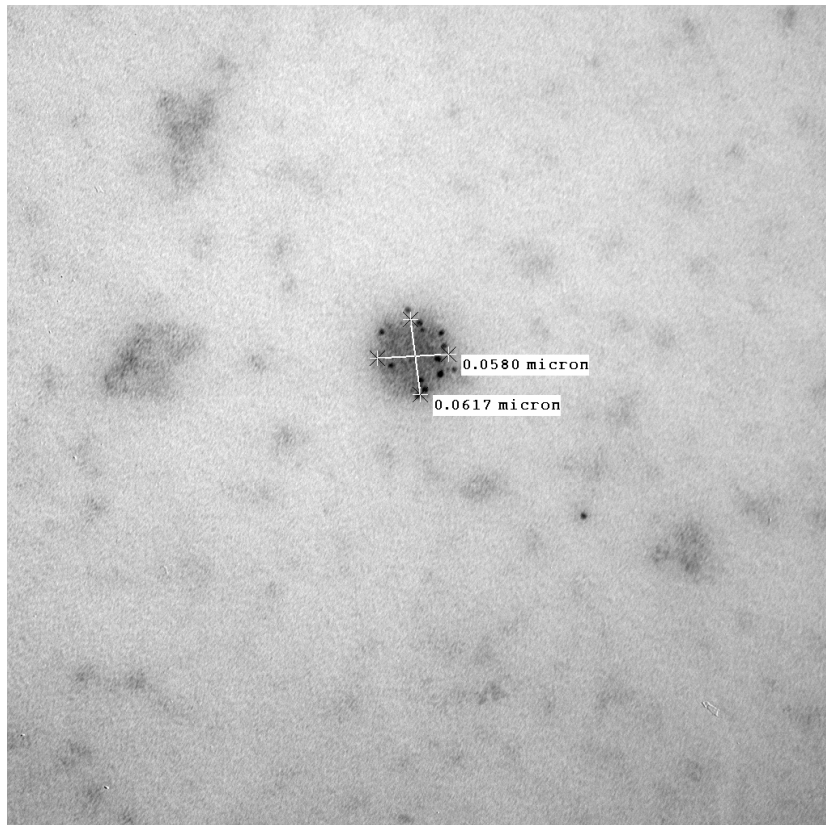
100 nm  
HV=80kV  
Direct Mag: 200000x  
AMT Camera System

MET de VLPs **inmunomarcadas con oro coloidal**



200.10M.tif  
Print Mag: 75600x @ 51 mm  
10:45 10/02/12

100 nm  
HV=80kV  
Direct Mag: 200000x  
AMT Camera System

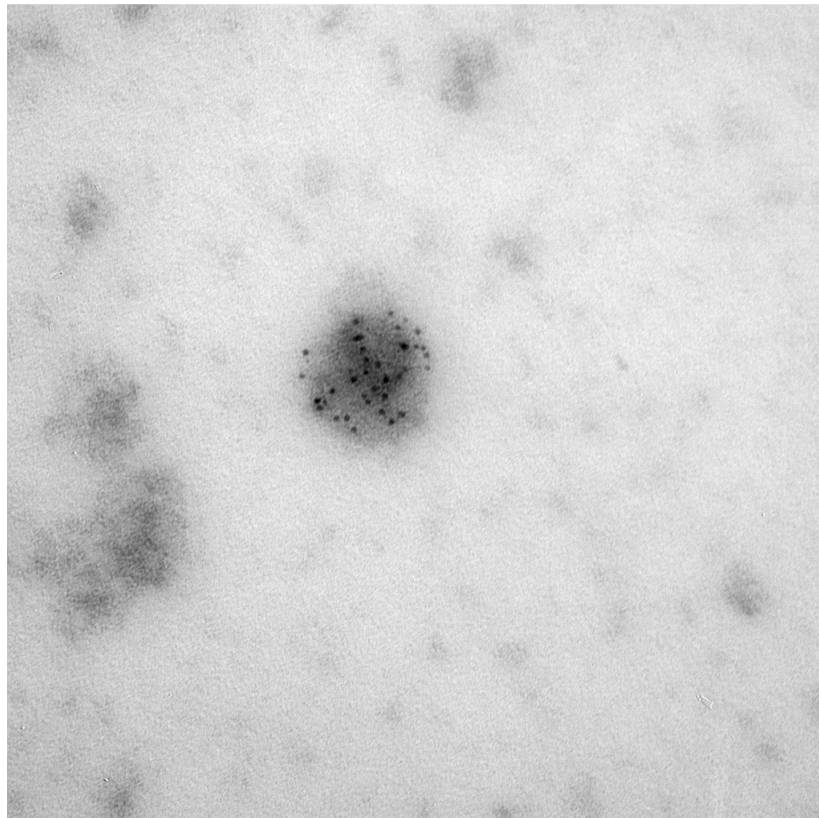


200.17M.tif  
Print Mag: 75600x @ 51 mm  
11:08 10/02/12

100 nm  
HV=80kV  
Direct Mag: 200000x  
AMT Camera System

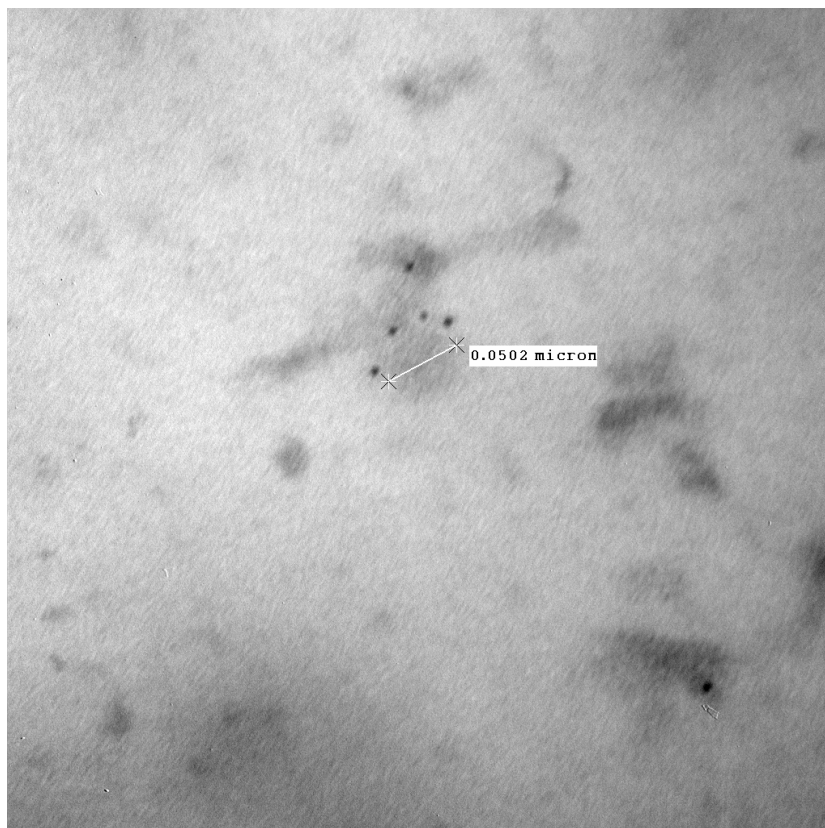


MET de VLPs **inmunomarcadas con oro coloidal**



200.23.tif  
Print Mag: 75600x @ 51 mm  
11:22 10/02/12

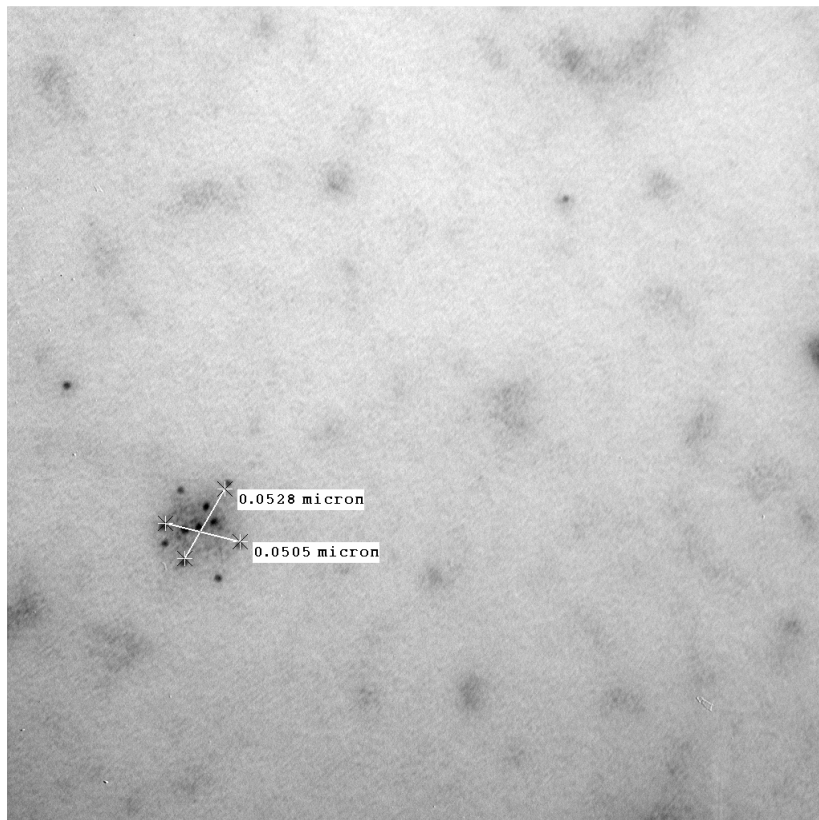
100 nm  
HV=80kV  
Direct Mag: 200000x  
AMT Camera System



250.13M.tif  
Print Mag: 94500x @ 51 mm  
10:55 10/02/12

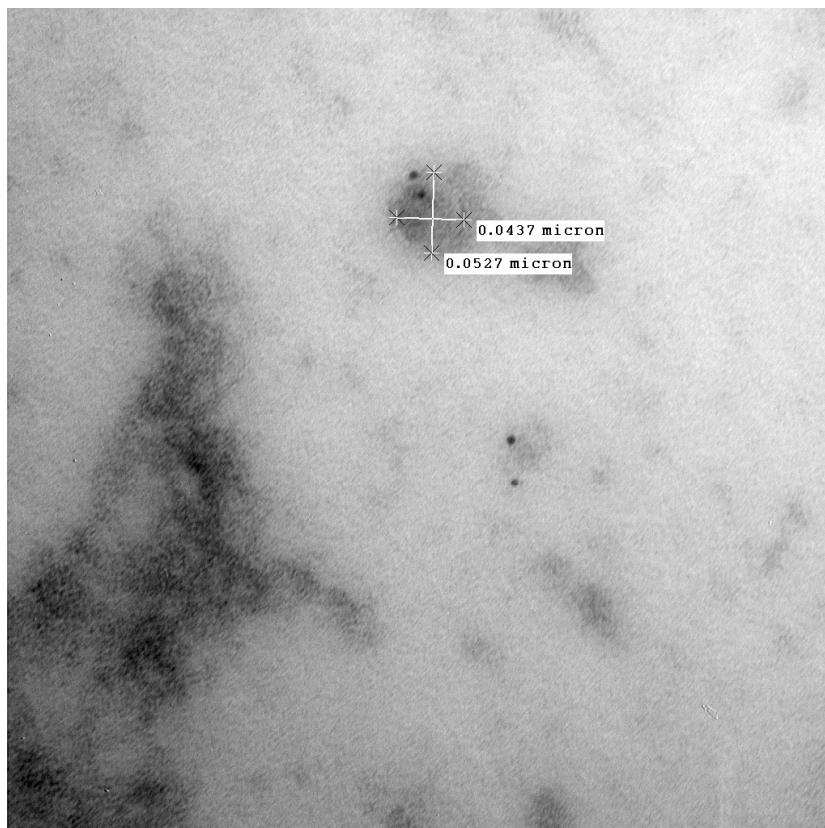
100 nm  
HV=80kV  
Direct Mag: 250000x  
AMT Camera System

MET de VLPs **inmunomarcadas con oro coloidal**



250.20M.tif  
Print Mag: 94500x @ 51 mm  
11:17 10/02/12

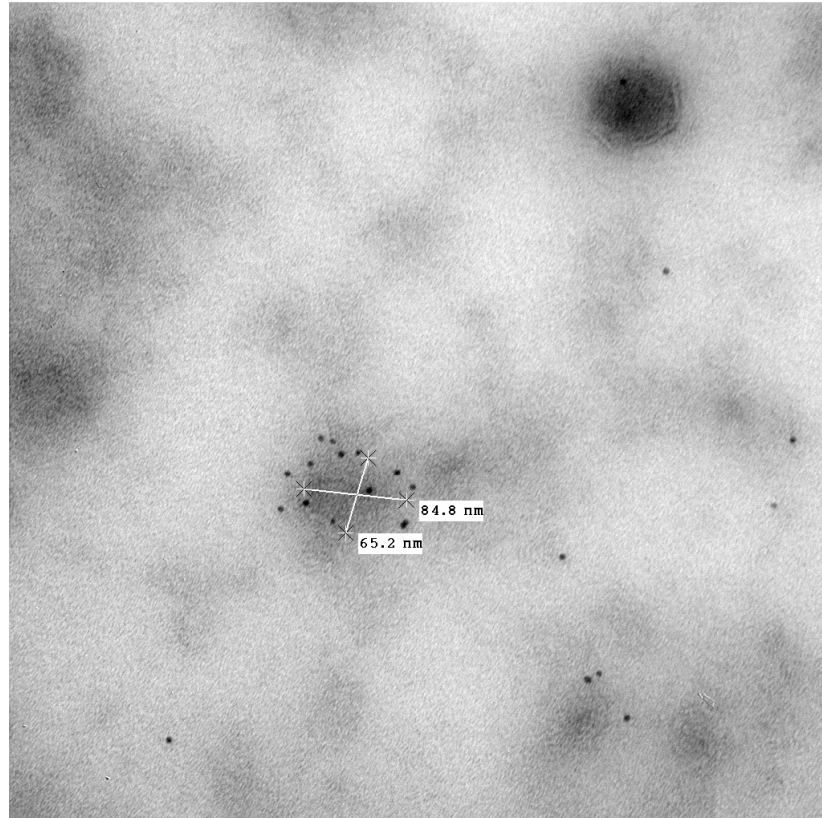
100 nm  
HV=80kV  
Direct Mag: 250000x  
AMT Camera System



250.21M.tif  
Print Mag: 94500x @ 51 mm  
11:19 10/02/12

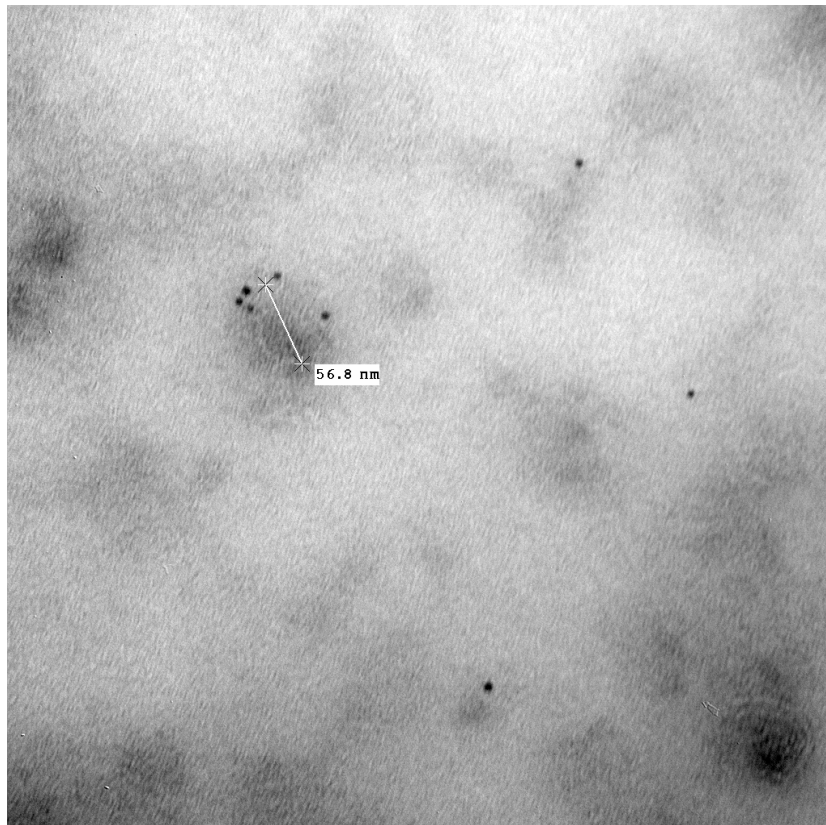
100 nm  
HV=80kV  
Direct Mag: 250000x  
AMT Camera System

MET de VLPs **inmunomarcadas con oro coloidal**



200.01M.tif  
Print Mag: 75600x @ 51 mm  
12:50 10/02/12

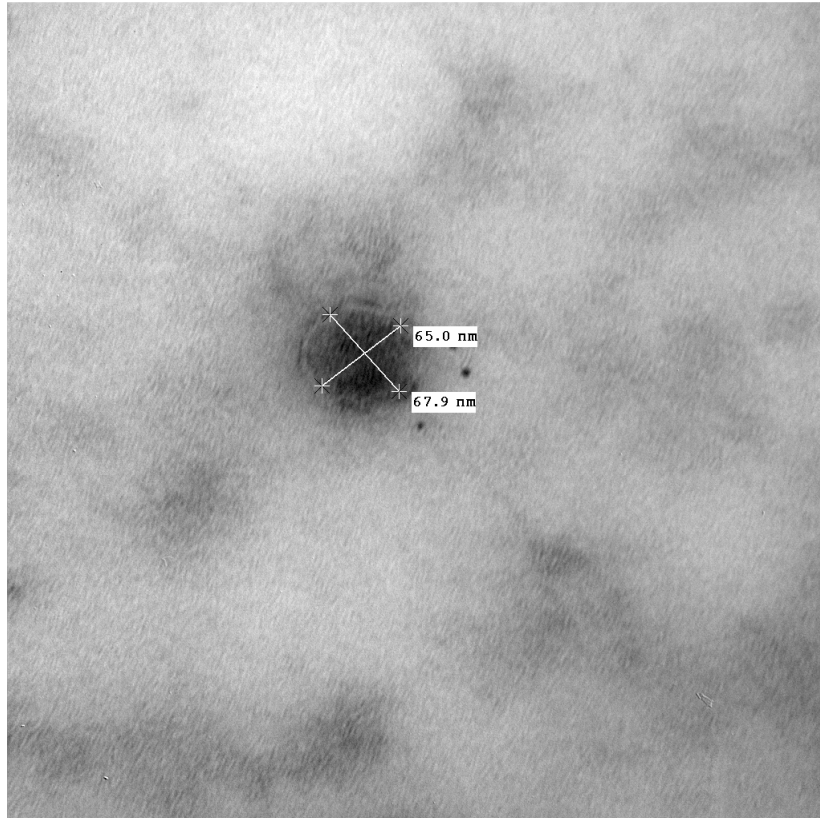
100 nm  
HV=80kV  
Direct Mag: 200000x  
AMT Camera System



250.05M.tif  
Print Mag: 94500x @ 51 mm  
12:59 10/02/12

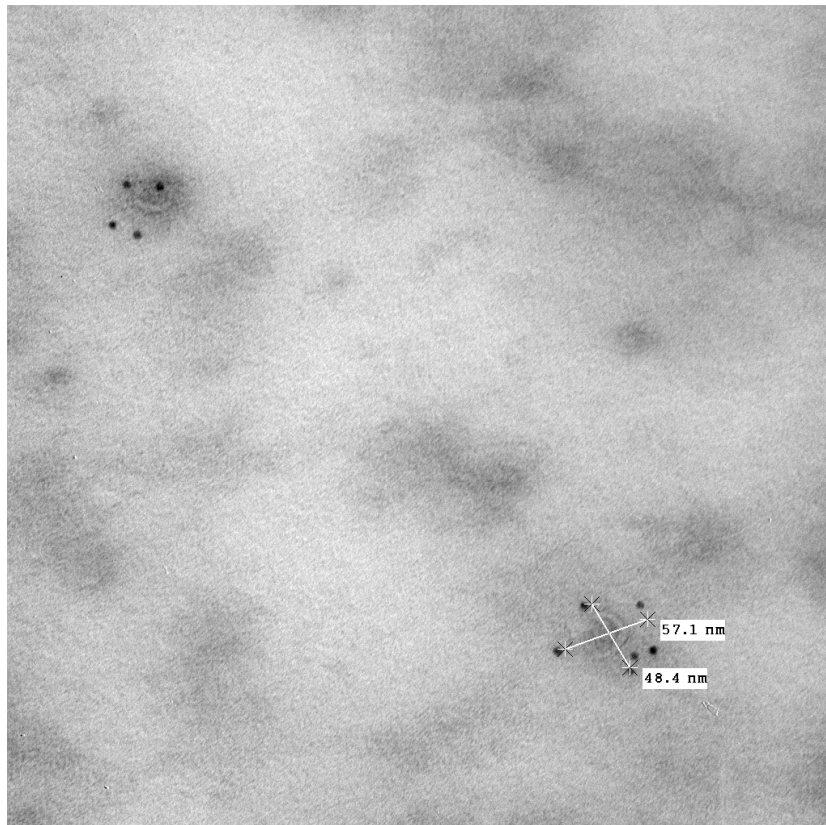
100 nm  
HV=80kV  
Direct Mag: 250000x  
AMT Camera System

MET de VLPs **inmunomarcadas con oro coloidal**



250.06M.tif  
Print Mag: 94500x @ 51 mm  
13:02 10/02/12

100 nm  
HV=80kV  
Direct Mag: 250000x  
AMT Camera System



250.08M.tif  
Print Mag: 94500x @ 51 mm  
13:09 10/02/12

100 nm  
HV=80kV  
Direct Mag: 250000x  
AMT Camera System

# **ANEXO II**

**OBTENCIÓN DE UN CLON CELULAR VERO-G COMO  
TARGET PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS  
ANTI-RABIA**

---

## **ANEXO II: OBTENCIÓN DE UN CLON CELULAR VERO-G COMO TARGET PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-RABIA**

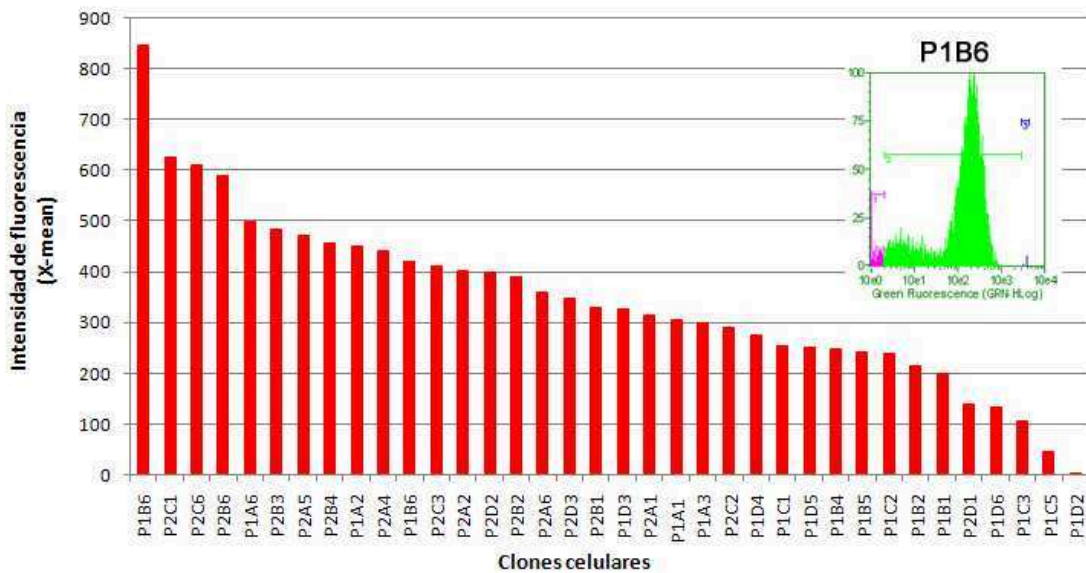
A partir de los resultados obtenidos con la línea celular VERO-G (detallados en el inciso 1.2.2. de la sección Resultados), que demuestran una muy buena expresión de la glicoproteína G del virus de la rabia con una localización de membrana pero con una muy baja o nula producción de VLPs, se decidió utilizar dichas células recombinantes con una finalidad distinta, detectar anticuerpos anti-rabia en sueros de animales vacunados (resultados mostrados en sección 2.4 de Resultados).

La posibilidad de contar con un método que detecte, en sueros de animales vacunados, la presencia de anticuerpos específicos, capaces de reconocer a la glicoproteína G del virus de la rabia en su conformación nativa, es de gran interés. En los ensayos utilizados habitualmente para la detección de anticuerpos, como ELISAs, el antígeno a ser reconocido se encuentra adsorbido de sobre una superficie artificial, pudiendo haber perdido su conformación nativa y, por lo tanto, no presentar todos los epitopes que naturalmente se encuentran expuestos sobre la superficie del virus. En las células recombinantes desarrolladas en este trabajo, la glicoproteína G se encuentra anclada a la membrana plasmática formado trímeros como ocurre en el virión durante una infección natural, por lo cual es muy interesante su utilización para detección de anticuerpos, específicamente los que poseen capacidad neutralizante.

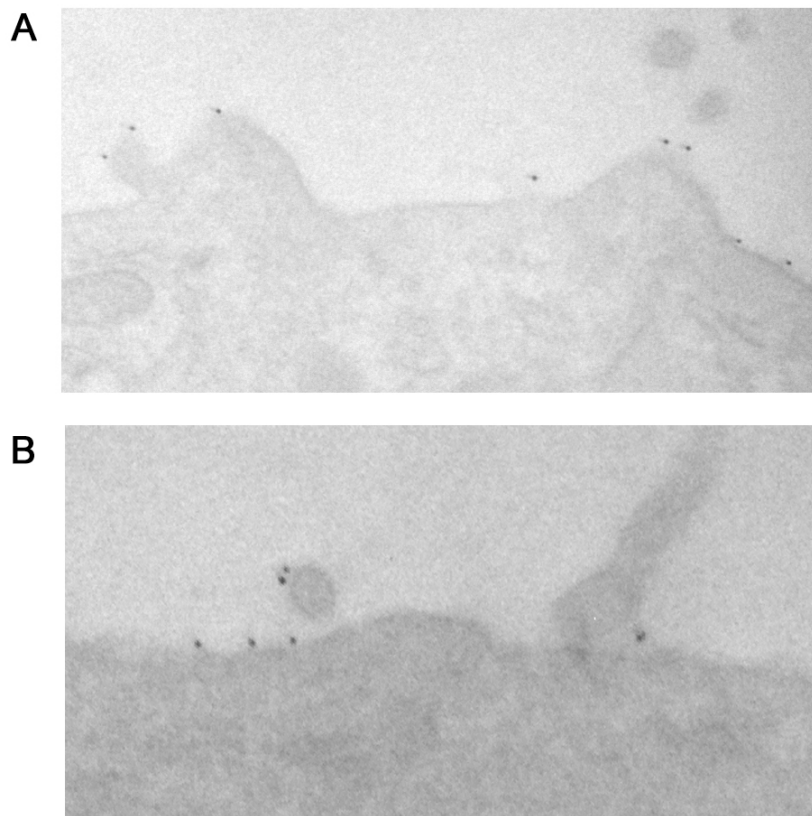
Por este motivo, se decidió obtener un clon celular con expresión homogénea de glicoproteína G sobre su membrana externa, para ser utilizado para la detección de anticuerpos, utilizando la citometría de flujo como método de análisis.

### **1. Obtención de un clon productor de glicoproteína G**

A partir de la línea celular LVERO-G previamente descrita, se llevó a cabo un clonado celular por el método dilución límite. Los clones obtenidos fueron analizados por citometría de flujo (Fig. 73), y P1B6 fue seleccionado por ser el que presentó mayor intensidad de fluorescencia, lo que se corresponde con el nivel de expresión de glicoproteína sobre la membrana de la célula.



**Figura 73. Análisis de los clones de la línea LVERO-G, por citometría de flujo.** P1B6 fue seleccionado por sus características productivas y su homogeneidad de expresión.



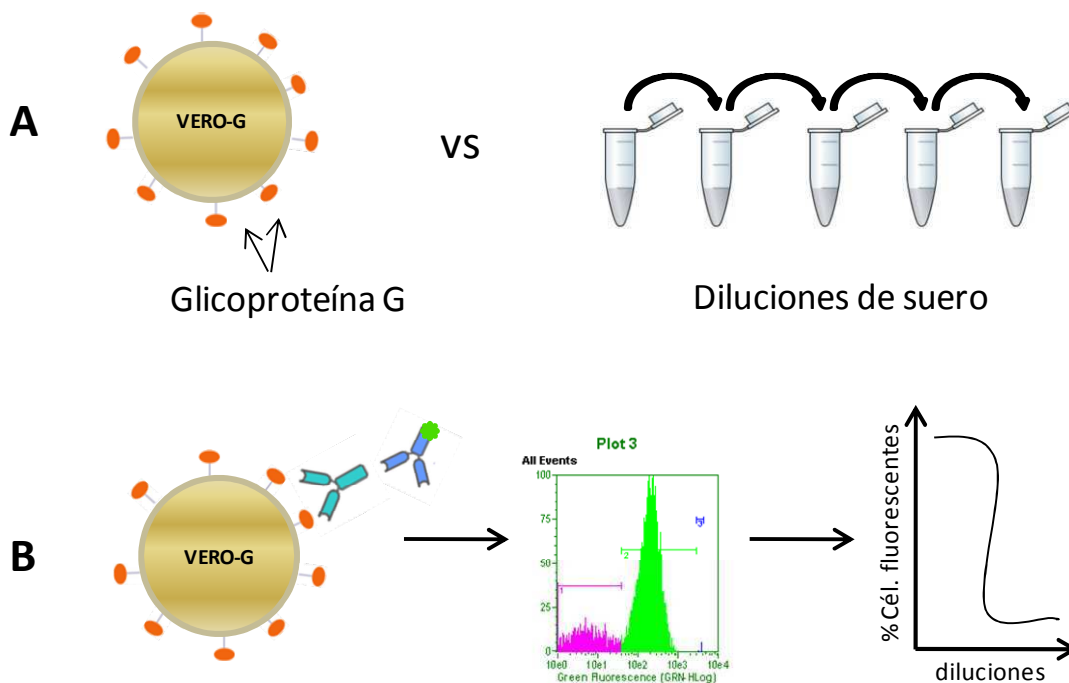
**Figura 74. MET de la monocapa celular del clon P1B6.** Se llevó a cabo la inmunodetección utilizando un anticuerpo específico anti-glicoproteína G y un anticuerpo secundario conjugado a partículas de oro coloidal de 6 nm de diámetro.

P1B6 fue analizado también por MET observando cortes ultrafinos de la monocapa celular, realizando una inmunomarcación con un anticuerpo específico para la glicoproteína G y un anticuerpo secundario conjugado a oro

coloidal. Como puede verse en la figura 74, las partículas de oro se localizaron, como era de esperar, sobre la membrana externa de la célula.

## 2. Detección de anticuerpos anti-glicoproteína G del virus de la rabia

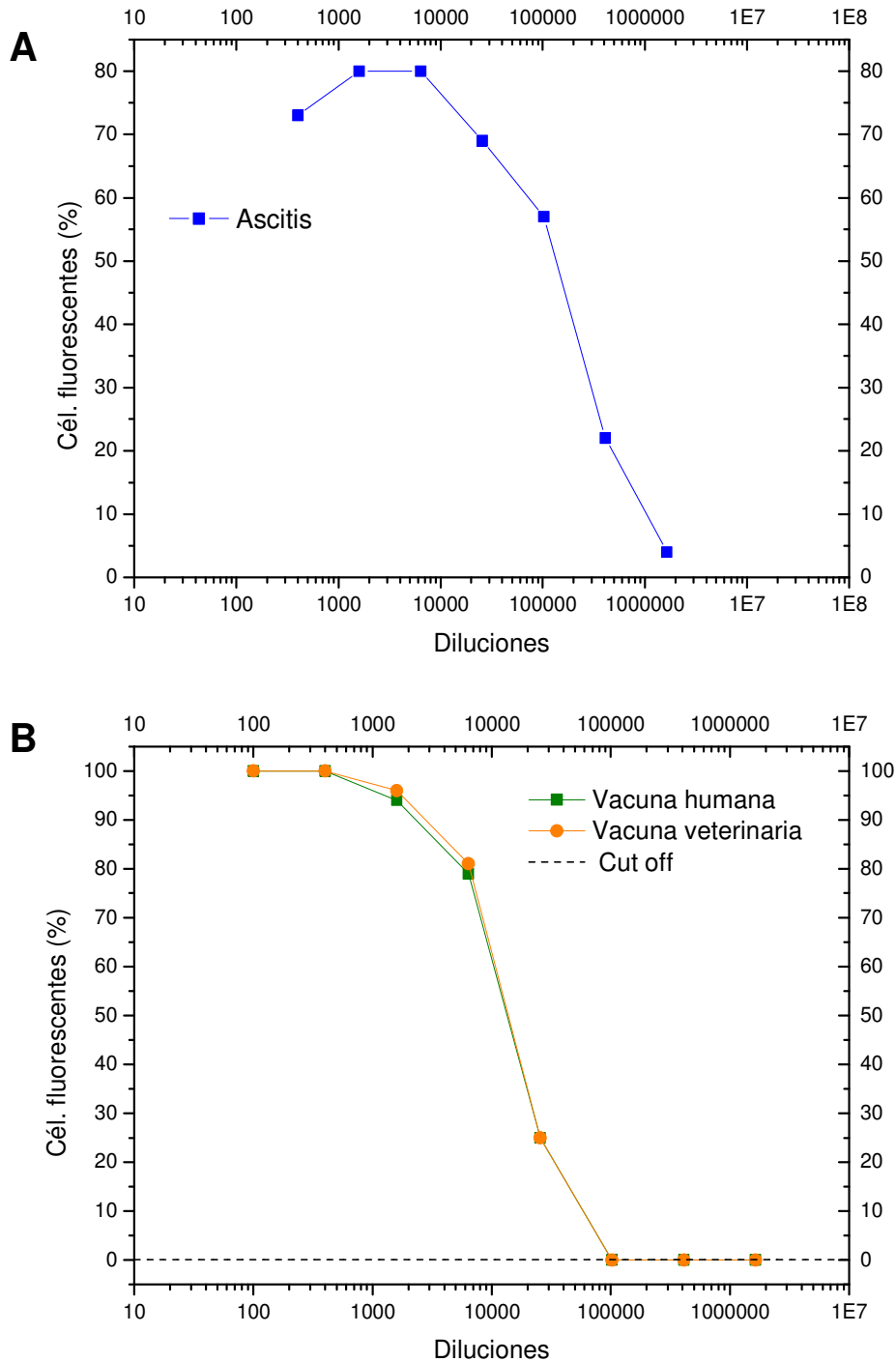
Se evaluó, entonces, el clon P1B6 para detectar anticuerpos en suero de animales. En un primer paso se incubó un número fijo de células totales con diluciones seriadas de los sueros a evaluar, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, y luego de dos lavados sucesivos, las células se incubaron con un anticuerpo secundario fluorescente para luego ser analizadas por citometría de flujo. En la figura 75 se esquematiza el procedimiento descrito.



**Figura 75. Esquema del ensayo de detección de anticuerpos específicos para la glicoproteína G del virus de la rabia utilizando células VERO-G. A.** Diluciones seriadas del suero a evaluar se incuban con una cantidad fija de células durante 20 minutos a TA. **B.** Las células son incubadas con un anticuerpo conjugado a un fluoróforo para luego ser analizadas por citometría de flujo, obteniendo información sobre el porcentaje de células fluorescentes para cada dilución.

En primera instancia se evaluó una ascitis conteniendo un anticuerpo monoclonal específico para la glicoproteína G (AB5). Se sabe que este anticuerpo, producido previamente en nuestro laboratorio, reacciona con la proteína nativa y no con la proteína desnaturalizada (Ramírez, 2008). Como puede verse en la figura 76-A, se obtuvo una buena relación dosis-respuesta utilizando el clon P1B6.





**Figura 76. Detección de anticuerpos anti-rabia utilizando células VERO-G. A.** Se analizó el clon P1B6 utilizando un anticuerpo monoclonal anti-G (AB5). Diluciones seriadas del anticuerpo se incubaron con una cantidad constante de células para luego ser incubadas con un anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo AlexaFluor488. El porcentaje de células fluorescentes para cada dilución se analizó por citometría de flujo. **B.** El mismo análisis se realizó utilizando sueros de ratones inmunizados con vacunas antirrábicas comerciales. *Cut off.* % células fluorescentes obtenidas con un suero basal más dos desviaciones estándar.

Posteriormente, se evaluó la capacidad de detección de anticuerpos presentes en sueros de animales inmunizados con vacunas comerciales. Se analizaron sueros de ratones Balb/c vacunados con una vacuna antirrábica humana (VERORAB, Sanofi-Pasteur) y una vacuna de uso veterinario para animales domésticos (Bagovac Rabia, Biogénesis Bagó). Como control negativo se utilizó un suero basal de ratón, el cual fue utilizado también para calcular el límite de corte para una reacción negativa (*cut off*), establecido como el valor de absorbancia de ese suero más dos desviaciones estándar.

Como puede observarse en la figura 76-B, se obtuvo una buena correlación entre las diluciones realizadas a los sueros y el porcentaje de células fluorescentes del clon P1B6. Por otro lado, el suero basal no presentó reacción con las células demostrando que la interacción es específica.

Con estos resultados se pudo confirmar que las células VERO-G, especialmente las del clon P1B6, son capaces de detectar anticuerpos que reconocen a la glicoproteína G en su conformación nativa, anclada a la membrana plasmática.

Como ya se mencionó, el objetivo de este estudio fue desarrollar un método con el cual se pueda analizar, en sueros de animales vacunados, la presencia de anticuerpos con capacidad neutralizante sin la utilización del virus de la rabia activo como lo requieren las metodologías actuales (Kropowski, 1996; Smith y Yager, 1996; Moore y Hanlon, 2010). Es importante destacar que el método desarrollado debe ser comparado y correlacionado con los ensayos estándar recomendados por la OMS pero, dado que en nuestro laboratorio no es posible manipular el virus de la rabia activo, durante este trabajo de tesis esta metodología se utilizó de forma cualitativa para evaluar la respuesta inmune inducida por las RV-VLPs producidas y para compararla con la generada con las vacunas comerciales.

# **ANEXO III**

## **DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES**

## ANEXO III: DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES

La detección de anticuerpos neutralizantes del virus de la rabia se realiza, generalmente, llevando a cabo el ensayo *in vivo* de referencia (ensayo de neutralización en ratones) (Kroprowski, 1996) o el ensayo *in vitro* recomendado por la OMS (*Rapid fluorescent focus inhibition test*) (Smith y Yager, 1996). En estos métodos es necesaria la manipulación del virus de la rabia activo, por lo cual estas metodologías no pueden llevarse a cabo en nuestro laboratorio debido a la falta de la contención viral necesaria para este tipo de virus.

Por tal motivo, surgió la necesidad de desarrollar un método bioseguro y específico para analizar la presencia de anticuerpos neutralizantes en sueros de animales inmunizados con las RV-VLPs. Los resultados correspondientes se muestran en 2.4.3 y 3.4.2.

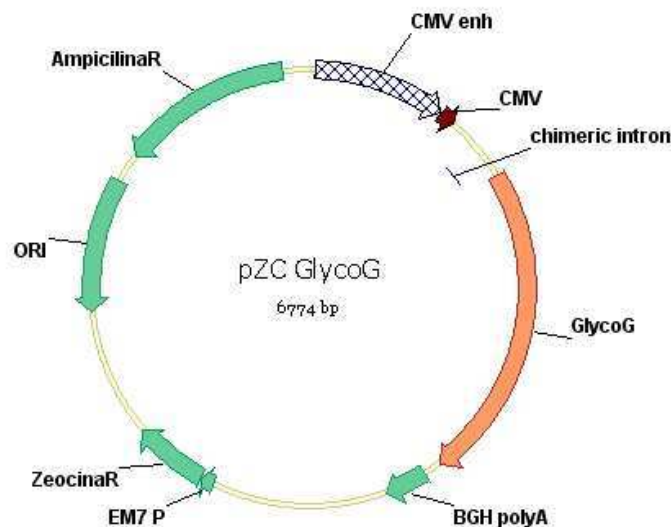
### 1. Producción de lentivirus pseudotipados con la glicoproteína G del virus de la rabia: LV-GFP (GlycoG)

Durante el proceso de producción de lentivirus de tercera generación se utilizan 4 vectores plasmídicos que poseen las secuencias codificantes de las proteínas estructurales como así también secuencias regulatorias y *cis* actuantes para su ensamblado. La proteína de envoltura que se utiliza generalmente es la glicoproteína del virus de la Estomatitis Vesicular (VSV, *vesicular stomatitis virus*). Esta posee tropismo por un gran número de células, como así también aporta una elevada estabilidad a la estructura del lentivirus (Pfeifer y col., 2010). De todas formas, se pueden utilizar otras proteínas virales como proteína de envoltura siendo la glicoproteína de rabia una de ellas (Mazarakis y col. 2001; Wright y col., 2008; Carpentier y col., 2012).

#### 1.1. Construcción de un vector plasmídico para la expresión de la glicoproteína G

Como primer paso se llevó adelante la construcción de un vector de expresión para células animales. La secuencia codificante de la glicoproteína G del virus de la rabia fue amplificada a través de una reacción de PCR, utilizando como templado un plásmido de clonado (pGlycoGHIS, GeneArt, Life Technologies). El fragmento amplificado y purificado a partir de un gel de

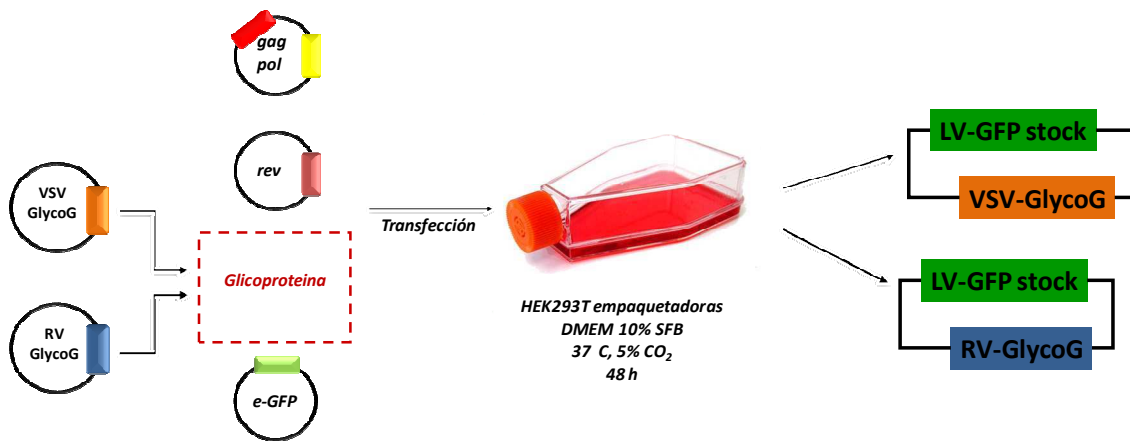
agarosa fue digerido con el par de enzimas de restricción *NheI* y *NotI*, para luego ser ligado dentro del vector de expresión pZC. Este es un vector construido previamente en nuestro laboratorio, a partir de los vectores pcDNA3.1/Zeo (Invitrogen) y pCI-neo (Promega). Combina la región promotora del virus CMV y su respectivo *enhancer*, la secuencia de poliadenilación de BGH (*bovine growth hormone*) y un gen de resistencia al antibiótico zeocina (pcDNA3.1/Zeo). El vector de expresión para la glicoproteína obtenido, y denominado pZC-GlycoG (Fig. 77), fue analizado por perfil de restricción con enzimas de restricción y su identidad confirmada por secuenciación.



**Figura 77. Mapa del vector pZC-GlycoG.** Plásmido para la expresión transiente de la glicoproteína G del virus de la rabia en células animales.

## 1.2. Ensamblado de LV-GFP (GlycoG)

Al momento de ensamblar los LV-GFP pseudotipados con la glicoproteína de rabia se llevaron a cabo dos transfecciones transientes. En una de ellas se utilizó el vector pMD.G que expresa la glicoproteína G del VSV, para utilizarlo como control, y en otra el vector previamente construido pZC-GlycoG (Fig. 78). En ambas reacciones se transfectaron también el resto de los vectores lentivirales estructurales y regulatorios, pREV, pMDL/pRRE (Naldini y col., 1996; Dull y col., 1998), como así también el vector de transferencia pLV-CMV-eGFP que porta la secuencia codificante de la GFP. De esta forma, se obtuvieron dos stock de lentivirus, cada uno de ellos pseudotipados con distintas proteínas de membrana.

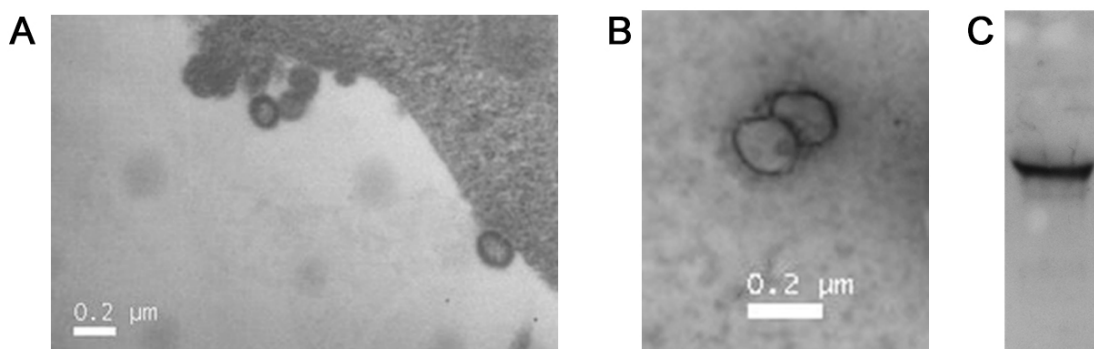


**Figura 78. Esquema del ensamblado de vectores lentivirales utilizando distintas glicoproteínas de membrana.** En este caso se muestran posibles transfecciones para ensamblar lentivirus utilizando las proteínas de envoltura de los virus de la estomatitis vesicular (VSV) o del virus de la rabia (RV).

### 1.3. Caracterización de LV-GFP (GlycoG)

Una vez producidos los stocks de lentivirus, se procedió a analizar las partículas virales producidas. En primera instancia se observó al MET las partículas lentivirales producidas por las células empaquetadoras. Para tal fin, 48 h postransfección se fijaron las células, se les realizó el tratamiento necesario para su inclusión en resina y posterior obtención de cortes ultrafinos. Al observar las células al MET se pudieron identificar las partículas lentivirales brotando hacia el exterior (Fig. 79-A).

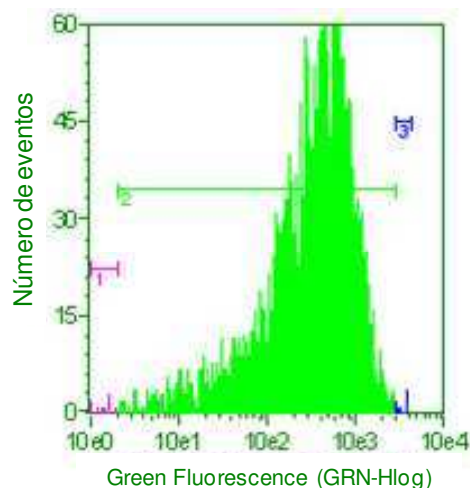
Posteriormente, las partículas lentivirales fueron concentradas por ultracentrifugación para luego ser analizadas por MET con tinción negativa (Fig. 79-B) y, finalmente, fue confirmada la presencia de la glicoproteína formando parte de la estructura de la partícula lentiviral a través de un ensayo de western blot utilizando un anticuerpo específico (Fig. 79-C).



**Figura 79. Caracterización de LV-GFP (GlycoG).** A. MET de células HEK293 empaquetadoras produciendo partículas lentivirales. B. Tinción negativa de lentivirus purificados por centrifugación. C. Western blot utilizando un suero de conejo anti-virus de la rabia.

Finalmente, los lentivirus producidos fueron utilizados para transducir células HEK293 y comprobar de esa forma su funcionalidad. Luego de 72 h de

transducción las células fueron analizadas por citometría de flujo obteniendo un 100% de células fluorescentes (GFP positivas) utilizando el stock puro (Fig. 80). En el mismo experimento los lentivirus fueron titulados, obteniendo un valor de  $4,5 \times 10^7$  UT.ml<sup>-1</sup>.



**Figura 80. Citometría de flujo de células transducidas con LV-GFP (GlycoG).** Luego de 72 h pos transducción, células HEK293 fueron analizadas por citometría de flujo obteniendo el valor de porcentaje de células fluorescentes.

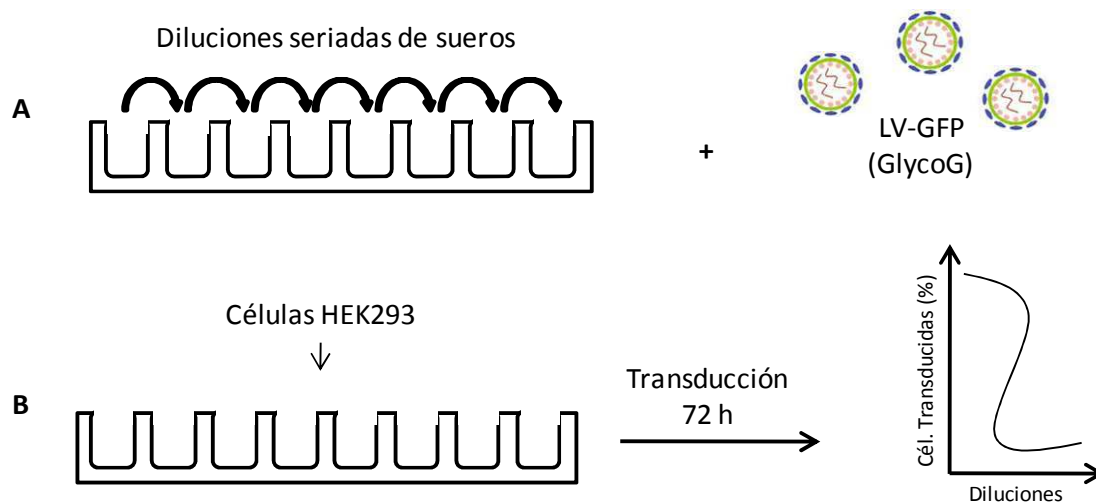
Con estos experimentos se confirmó que, utilizando la glicoproteína G del virus de la rabia como proteína de envoltura, los LVs pudieron ser eficientemente ensamblados y que, además, estos LVs tienen la capacidad de transducir células *in vitro*, o sea que son vectores virales funcionales.

## 2. ENSAYO DE NEUTRALIZACIÓN UTILIZANDO LV-GFP (GlycoG)

Una vez producidos y caracterizados, los LV-GFP (GlycoG) se utilizaron como herramienta para la detección de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia. Para tal fin, se desarrolló un protocolo en el que una cantidad constante de LVs es incubada a 37°C durante 1 h con diluciones seriadas de las muestras de sueros a evaluar (Fig. 81-A). Luego de esta incubación, se adiciona una cantidad fija de células que son incubadas por 72 h a 37°C. Finalmente, estas células son analizadas por citometría de flujo con la finalidad de cuantificar el porcentaje de células que fueron transducidas (Fig. 81-B).

Con este procedimiento se intenta demostrar que los anticuerpos presentes en la muestra evaluada son capaces de interactuar con la glicoproteína G que se encuentra anclada a la membrana de la envoltura de los LVs, neutralizándolos e impidiendo que estos puedan transducir las células adicionadas posteriormente.

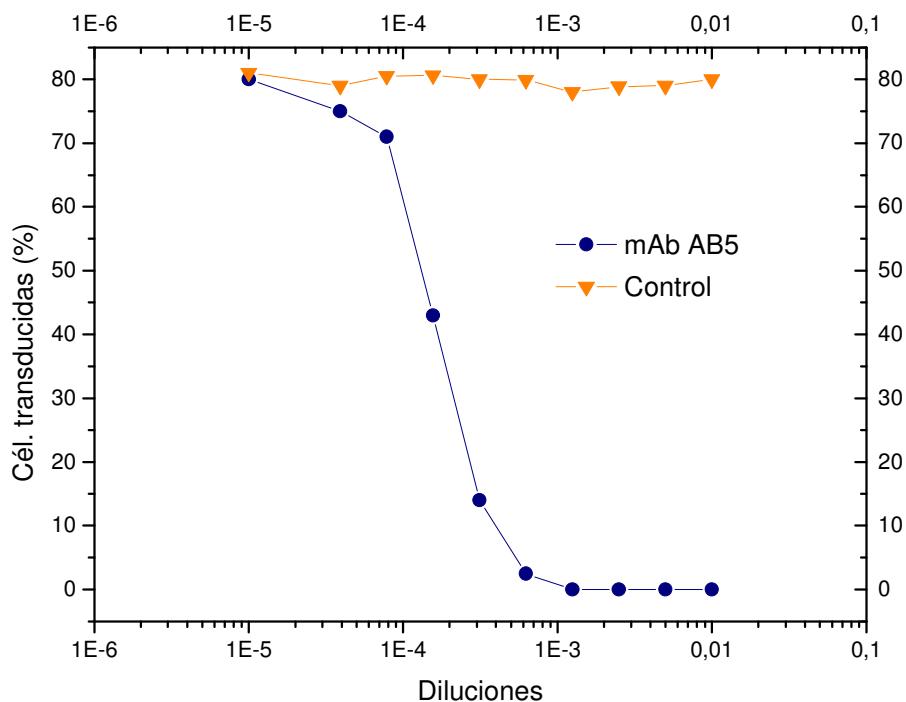
Utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce a la glicoproteína G en su forma nativa (AB5) (Ramírez, 2008) se demostró que la metodología desarrollada presenta una buena correlación dosis-respuesta y utilizando un suero no relacionado se analizó a especificidad de la respuesta (Fig. 82), demostrando que la matriz en la cual se encuentran los anticuerpos (suero) no está afectando la interacción específica antígeno-anticuerpo ni produce reacciones cruzadas.



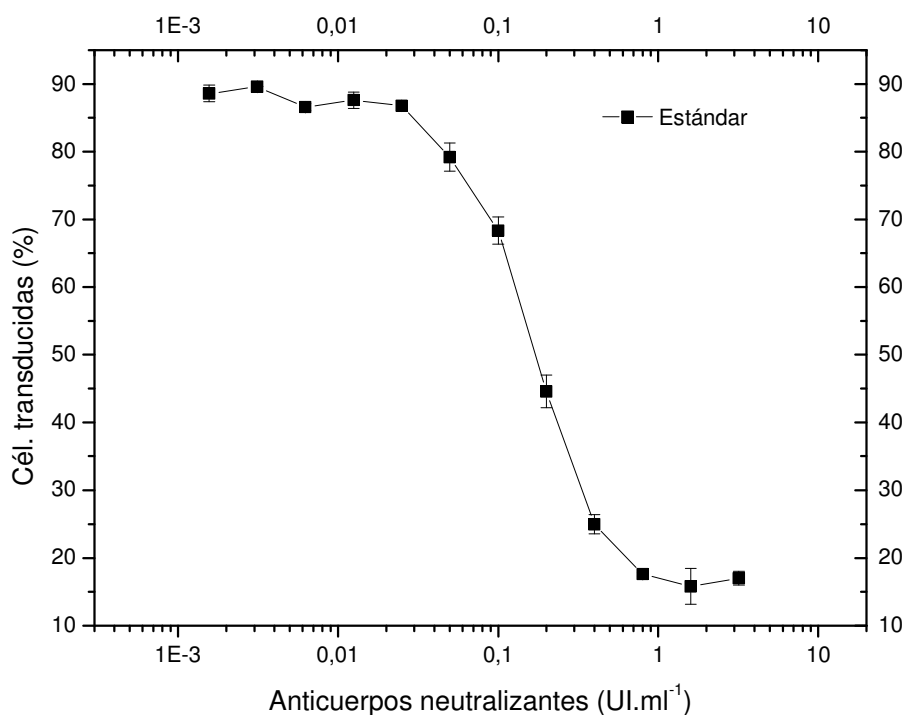
**Figura 81. Esquema del ensayo de detección de anticuerpos neutralizantes utilizando LV-GFP (GlycoG).** **A.** Diluciones seriadas de los sueros a evaluar son incubadas, por 1 h a 37°C, con una cantidad constante de LVs. **B.** Se agregan a cada pozo una cantidad fija de células HEK293 que serán cultivadas durante 72 h para luego ser analizadas por citometría de flujo, cuantificando el porcentaje de células transducidas para cada dilución de suero.

Finalmente, se evaluó la metodología desarrollada utilizando un estándar de anticuerpos neutralizantes del virus de la rabia con el objetivo de cuantificar las muestras evaluadas. Se utilizó el 2<sup>nd</sup> *International Standard for Anti-Rabies Immunoglobulin* (NIBSC), que es el patrón de la OMS utilizado en los ensayos de cuantificación de anticuerpos neutralizantes. De esta forma, el porcentaje de células transducidas obtenido se refirió a una concentración de anticuerpos neutralizantes (expresadas como UI.ml<sup>-1</sup>) en vez de a un valor de dilución (Fig. 83).





**Figura 82. Detección de anticuerpos neutralizantes utilizando el ensayo de LV-GFP (GlycoG).** Resultado del ensayo utilizando un anticuerpo monoclonal anti-G (AB5) y un control negativo (anticuerpo no relacionado).



**Figura 83. Cuantificación de anticuerpos neutralizantes utilizando el ensayo de LV-GFP (GlycoG).** Resultado del ensayo de neutralización utilizando un estándar internacional de anticuerpo neutralizante para el virus de la rabia. La concentración de anticuerpos se expresa en unidades internacionales por mililitro (UI.ml<sup>-1</sup>).

Los resultados obtenidos fueron muy satisfactorios, ya que se pudo demostrar que la metodología desarrollada es específica para la detección de anticuerpos neutralizantes del virus de la rabia *in vitro* y que, si se utiliza el estándar correspondiente, es posible cuantificar las muestras evaluadas, obteniéndose un valor de concentración. Además, la técnica es muy simple y puede llevarse a cabo en pequeños volúmenes en placas de 96 pozos, reduciendo drásticamente los costos y los tiempos invertidos.

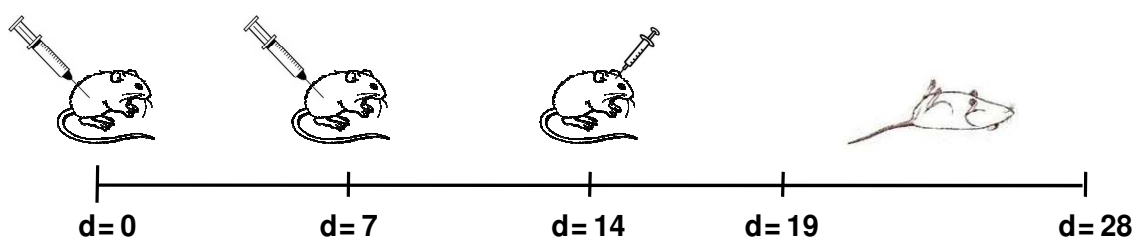
Una vez comparado y validado con las metodologías de referencia (actividades que exceden los objetivos de la presente tesis), el procedimiento desarrollado podría representar una alternativa interesante para la detección y cuantificación de anticuerpos neutralizantes.

# **ANEXO IV**

**INFORMES DE RESULTADOS DE POTENCIA DE  
VACUNA ANTIRRÁBICA REALIZADO A MUESTRAS DE  
RV-VLPs**

## ANEXO IV: INFORMES DE RESULTADOS DE POTENCIA DE VACUNA ANTIRRÁBICA REALIZADO A MUESTRAS DE RV-VLPs

El análisis de potencia de vacuna antirrábica se lleva a cabo con el ensayo de referencia, recomendado por la OMS, denominado NIH *potency test* o ensayo de potencia del NIH (Wilbur y Aubert, 1996). En el mismo se dosan las muestras utilizando un estándar internacional de vacuna antirrábica (WHO 6<sup>th</sup> *International Standard for Rabies vaccine*) con la metodología descrita en el apartado 5.2 de Materiales y Métodos (Fig. 84).



**Figura 84. Test de potencia de vacuna antirrábica del NIH.** Ratones CF-1 son inmunizados con dos dosis (días 0 y 7) de la vacuna a evaluar o de una vacuna de referencia y, en el día 14, son desafiados intracerebralmente con el virus de la rabia activo. Durante los 14 días siguientes, se cuantifican los animales muertos y sobrevivientes.


En el desarrollo de esta tesis, estos ensayos no fueron realizados en nuestro laboratorio no contar con las instalaciones aptas para la manipulación del virus de la rabia activo. Debido a esto, se llevaron a cabo colaboraciones con dos laboratorios de referencia en cuanto a la producción y control de vacunas antirrábicas:

- **Laboratorio Animal DILAB-SENASA** (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). Este laboratorio es el encargado de la evaluación y liberación de lotes de vacuna antirrábica veterinaria comercializados en el país. Los ensayos NIH se llevaron a cabo en colaboración con la Lic. Susana Russo, jefa del Departamento de Rabia y Pequeños Animales de dicha institución.

- **Instituto Biológico “Dr. Tomás Perón”** de la Provincia de Buenos Aires. En dicha institución se producen, entre otros productos biológicos, vacunas y sueros para enfermedades infecciosas, entre las cuales se encuentran vacunas antirrábicas de uso humano y de uso veterinario, del tipo CRL. En este contexto, se trabajó en colaboración con el Departamento de Calidad de Productos Biológicos de la mencionada institución.

A continuación se presentan los informes de los resultados entregados por dichas instituciones para cada muestra de RV-VLPs evaluadas y cuyos

valores fueron referenciados en los apartados 2.5, 3.4.1 y 4.3 de la sección Resultados.

	DILAB	DLA	COORDINACIÓN DE VIROLOGIA	Dpto. de Rabia y Enfermedades de Pequeños Animales	Página 1 de 2
<b>Planilla de cálculos Reed y Muench</b>					

RABIA PRUEBA 19/13 03/07/2013

SENASA-DILAB  
Potencia (Prueba NIH)

Vacuna de referencia BHK-3 (10ml) Requisito mínimo de potencia 1,0

Dilución vacuna	Ratones Muertos	Ratones Sobrev.	Acumul. Muertos	Acumul. Sobrev.	Muertos/Totales	% Protegidos
1: 5	4	12	4	28	28 / 32	88
1: 25	7	9	11	16	16 / 27	59
1: 125	10	6	21	7	7 / 28	25
1: 625	15	1	36	1	1 / 37	3

Cálculos: 0,19 DE50%: 39

Vacuna: Universidad Nacional del Litoral A

Dilución vacuna	Ratones Muertos	Ratones Sobrev.	Acumul. Muertos	Acumul. Sobrev.	Muertos/Totales	% Protegidos
1: 5	3	13	3	29	29 / 32	91
1: 25	6	10	9	16	16 / 25	64
1: 125	11	5	20	6	6 / 26	23
1: 625	15	1	35	1	1 / 36	3

Cálculos: 0,24 DE50%: 43  
VA:= 1,1 Result.: Aprobada.

Dilución virus 10-	Ratones Muertos	Ratones Sobrev.	Acumul. Muertos	Acumul. Sobrev.	Muertos/Totales	% Mortandad	prot
10- 5	10	0	20	0	20 / 20	100	5
10- 6	7	3	10	3	10 / 13	77	21
10- 7	2	8	3	11	3 / 14	21	77
10- 8	1	9	1	20	1 / 21	5	100

Cálculos: 0,5  
Titulo: 10^ 6,5  
DL50 usadas: 30,6

**Figura. 85. Informe de resultados del ensayo de potencia de vacuna antirrábica.** La muestra analizada fueron RV-VLPs producidas en cultivos en adherencia y purificadas por ultracentrifugación (nombre de la muestra: Universidad Nacional del Litoral A).

**Planilla de cálculos Reed y Muench**

RABIA PRUEBA 36/13 19/11/2013

SENASA-DILAB  
Potencia (Prueba NIH)

Vacuna de referencia BHK-3 (10ml) Requisito mínimo de potencia 1,0

Dilución vacuna	Ratones Muertos	Ratones Sobrev.	Acumul. Muertos	Acumul. Sobrev.	Muertos/ Totales	% Protegidos
1: 5	2	14	2	29	29 / 31	94
1: 25	7	9	9	15	15 / 24	63
1: 125	11	5	20	6	6 / 26	23
1: 625	15	1	35	1	1 / 36	3

Cálculos: 0,22 DE50%: 42

Vacuna: Universidad Nacional del Litoral " D"

Dilución vacuna	Ratones Muertos	Ratones Sobrev.	Acumul. Muertos	Acumul. Sobrev.	Muertos/ Totales	% Protegidos
1: 5	4	12	4	31	31 / 35	89
1: 25	5	11	9	19	19 / 28	68
1: 125	10	6	19	8	8 / 27	30
1: 625	14	2	33	2	2 / 35	6


Cálculos: 0,33 DE50%: 53  
VA:= 1,3 Result.: Aprobada.

SENASA-DILAB  
Potencia (Prueba NIH)

Dilución virus 10-	Ratones Muertos	Ratones Sobrev.	Acumul. Muertos	Acumul. Sobrev.	Muertos/ Totales	% Mortandad	prot
10- 5	10	0	20	0	20 / 20	100	5
10- 6	7	3	10	3	10 / 13	77	21
10- 7	2	8	3	11	3 / 14	21	77
10- 8	1	9	1	20	1 / 21	5	100

Cálculos: 0,5  
Titulo: 10^ 6,5  
DL50 usadas: 30,6

**Figura. 86. Informe de resultados del ensayo de potencia de vacuna antirrábica.** La muestra analizada fueron RV-VLPs producidas en SFM, purificadas por ultracentrifugación e inyectadas sin adyuvante (nombre de la muestra: Universidad Nacional del Litoral D).

	DILAB	DLA	COORDINACIÓN DE VIROLOGIA	Dpto. de Rabia y Enfermedades de Pequeños Animales	Página 1 de 2
<b>Planilla de cálculos Reed y Muench</b>					

RABIA PRUEBA 35/13 05/11/2013

SENASA-DILAB  
Potencia (Prueba NIH)

Vacuna de referencia BHK-3 (10ml) Requisito minimo de potencia 1,0

Dilución vacuna	Ratones Muertos	Ratones Sobrev.	Acumul. Muertos	Acumul. Sobrev.	Muertos/ Totales	% Protegidos
1: 5	3	13	3	27	27 / 30	90
1: 25	8	8	11	14	14 / 25	56
1: 125	11	5	22	6	6 / 28	21
1: 625	15	1	37	1	1 / 38	3

Cálculos: 0,12 DE50%: 33

Vacuna: Universidad Nacional del Litoral " C"

Dilución vacuna	Ratones Muertos	Ratones Sobrev.	Acumul. Muertos	Acumul. Sobrev.	Muertos/ Totales	% Protegidos
1: 5	2	14	2	31	31 / 33	94
1: 25	7	9	9	17	17 / 26	65
1: 125	10	6	19	8	8 / 27	30
1: 625	14	2	33	2	2 / 35	6

Cálculos: 0,30 DE50%: 50  
VA:= 1,5 Result.: Aprobada.

Dilución virus 10-	Ratones Muertos	Ratones Sobrev.	Acumul. Muertos	Acumul. Sobrev.	Muertos/ Totales	% Mortandad	prot
10- 5	10	0	21	0	21 / 21	100	0
10- 6	9	1	11	1	11 / 12	92	18
10- 7	2	8	2	9	2 / 11	18	92
10- 8	0	10	0	19	0 / 19	0	100

Cálculos: 0,6  
Titulo: 10^ 6,6  
DL50 usadas: 36,9

**Figura. 87. Informe de resultados del ensayo de potencia de vacuna antirrábica.** La muestra analizada fueron RV-VLPs producidas en SFM, purificadas por ultracentrifugación e inyectadas con el agregado de adyuvante (nombre de la muestra: Universidad Nacional del Litoral C).

LABORATORIO CENTRAL DE SALUD PÚBLICA  
Potencia (Prueba NIH)

FECHA: 22-05-15

Vacuna de referencia..... C.R.L. (S.M.B.)

Dilucion vacuna	Ratones Muertos	Ratones Sobrev.	Acumul. Muertos	Acumul. Sobrev.	Sobrev./ Totales	% Protegido
5	0	16	0	26	26 / 26	100
25	6	10	6	10	10 / 16	63
125	16	0	22	0	0 / 22	0
625	16	0	38	0	0 / 38	0

Cálculos: 0,14 DE50%: 34,49

Vacuna: . Sta Fé G 1

Dilucion vacuna	Ratones Muertos	Ratones Sobrev.	Acumul. Muertos	Acumul. Sobrev.	Sobrev. Totales	% Protegido
5	0	16	0	32	32 / 32	100
25	2	14	2	16	16 / 18	89
125	14	2	16	2	2 / 18	11
625	16	0	32	0	0 / 32	0

Cálculos: 0,35 DE50%: 55,90

**VA:= 1,62** Result.: Aprobada.

Virus CVS

Dilucion	Ratones Muertos	Ratones Sobrev.	Acumul. Muertos	Acumul. Sobrev.	Muertos/ Totales	% Mortandad
4,7	10	0	19	0	19 / 19	100
5,7	8	2	9	2	9 / 11	82
6,7	1	9	1	11	1 / 12	8
7,7	0	10	0	21	0 / 21	0

**Figura. 88. Informe de resultados del ensayo de potencia de vacuna antirrábica.** La muestra analizada fueron RV-VLPs producidas en SFM e inyectadas sin purificar ni agregado de adyuvante.



**Planilla de cálculos Reed y Muench**

RABIA

PRUEBA  
13/14

07/05/2014

SENASA-DILAB  
Potencia (Prueba NIH)

Vacuna de referencia

BHK -3 (10ml) Requisito mínimo de potencia

1,0

Dilución vacuna	Ratones Muertos	Ratones Sobrev.	Acumul. Muertos	Acumul. Sobrev.	Muertos/ Totales	% Protegidos
1: 5	2	14	2	28	28 / 30	93
1: 25	8	8	10	14	14 / 24	58
1: 125	11	5	21	6	6 / 27	22
1: 625	15	1	36	1	1 / 37	3

Cálculos:

0,16

DE50%:

36

Vacuna:

U.N.L E

Dilución vacuna	Ratones Muertos	Ratones Sobrev.	Acumul. Muertos	Acumul. Sobrev.	Muertos/ Totales	% Protegidos
1: 5	3	13	3	30	30 / 33	91
1: 25	6	10	9	17	17 / 26	65
1: 125	10	6	19	7	7 / 26	27
1: 625	15	1	34	1	1 / 35	3

Cálculos:

0,28

DE50%:

48

VA:=

1,3

Result.: Aprobada.

Dilución virus 10-	Ratones Muertos	Ratones Sobrev.	Acumul. Muertos	Acumul. Sobrev.	Muertos/ Totales	% Mortandad	prot
10- 5	10	0	20	0	20 / 20	100	5
10- 6	7	3	10	3	10 / 13	77	21
10- 7	2	8	3	11	3 / 14	21	77
10- 8	1	9	1	20	1 / 21	5	100

Cálculos:

0,5

Título: 10^

6,5

DL50 usadas:

30,6

**Figura. 89. Informe de resultados del ensayo de potencia de vacuna antirrábica.** La muestra analizada fueron RV-VLPs producidas en un biorreactor de 5 L (nombre de la muestra: Universidad Nacional del Litoral E).

# **BIBLIOGRAFÍA**

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abbas, A. K.; Lichtman, A. H. y Pober, J. S. (2002) *Inmunidad innata*. En: *Inmunología Celular y Molecular 4ª edición* (Eds. Abbas, A. K.; Lichtman, A. H. y Pober, J. S.) McGraw Hill – Interamericana, Madrid, España. p. 280-302.
- Almo, S. C. y Love, J. D. (2014) *Better and faster: improvements and optimization for mammalian recombinant protein production*. *Curr Opin Struct Biol* 26:39–43.
- André, F. E. (2003) *Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises*. *Vaccine* 21:593–5.
- Bachmann, M. F. y Jennings, G. T. (2010) *Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns*. *Nat Rev Immunol* 10(11):787-96.
- Balinska, M. A. (2003) *Vaccination is tomorrow's society*. *Lancet Infect Dis* 3:443-7.
- Bandaranayake, A. D. y Almo, S. C. (2014) *Recent advances in mammalian protein production*. *FEBS Lett* 588:253–60.
- Bandaranayake, A. D.; Correnti, C.; Ryu, B. Y.; Brault, M.; Strong, R. K. y Rawlings, D. J. (2011) *Daedalus: a robust, turnkey platform for rapid production of decigram quantities of active recombinant proteins in human cell lines using novel lentiviral vectors*. *Nucleic Acids Res* 39(21):e143.
- Basualdo J., Coto C. y de Torres R. (1996) *Virus de la Rabia*. En: *Microbiología Biomédica*. Atlante, Buenos Aires, Argentina. p. 814-21.
- Benmaamara, R; Astray, R; Wagner, R. y Pereira, C. A. (2009) *High-level expression of rabies virus glycoprotein with the RNA-based Semliki Forest Virus expression vector*. *J Biotechnol* 139:283–90.
- Bourhy, H.; Dautry-Varsat, A.; Hotez, P. J. y Salomon, J. (2010) *Rabies, still neglected after 125 years of vaccination*. *PLoS Negl Trop Dis* 4(11):e839.
- Braun, M.; Jandus, C.; Maurer, P.; Hammann-Haenni, A.; Schwarz, K.; Bachmann, M. F.; Speiser, D. y Romero, P. (2012) *Virus-like particles induce robust human T-helper cell responses*. *Eur J Immunol* 42:1-11.
- Briggs, D. J. (2012) *The role of vaccination in rabies prevention*. *Curr Opin Virol* 2:309–14.

- Brun, A.; Bárcena, J.; Borrego, B.; Dory, D y Escribano, J. M. (2011) *Current strategies for subunit and genetic viral veterinary vaccine development*. Virus Res 157:1–12.
- Buckland, B. (2005) *The process development challenge for a new vaccine*. Nature Med Suppl 11(4):S16-19.
- Burger, S. R.; Remaley, A. T.; Danley, J. M.; Moore, J.; Muschel, R. J.; Wunner, W. H. y col. (1991) *Stable expression of rabies virus glycoprotein in Chinese hamster ovary cells*. J Gen Virol 72:359–67.
- Bushman, F.; Lewinski, M.; Ciuffi, A.; Barr, S.; Leipzig, J.; Hannanalli, S. y Hoffmann, C. (2005) *Genome-wide analysis of retroviral DNA integration*. Nat Rev Microbiol 3(11):848–58.
- Carballal, G. y Oubiña, J. (1998) *Familia Rhabdoviridae*. En: *Virología Biomédica*. El Ateneo, Buenos Aires, Argentina. p.245-60.
- Carpentier, D. C. J.; Vevis, K; Trabalza, A.; Georgiadis, C.; Ellison, S. M.; Asfahani, R. I. y Mazarakis, N. D. (2012) *Enhanced pseudotyping efficiency of HIV-1 lentiviral vectors by a rabies/vesicular stomatitis virus chimeric envelope glycoprotein*. Gene Ther 19:761-74.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC) (2008). *Human Rabies Prevention*. Morb Mortal Wkly Rep 2008; 57(RR-3).
- Cervera, L.; Gutiérrez, S.; Marínez, M.; Blanco, J.; Gòdia, F. y Segura, M. (2013) *Generation of HIV-1 Gag VLPs by transient transfection of HEK 293 suspension cell cultures using an optimized animal-derived component free medium*. J Biotechnol 166(4):152-65.
- Chakerian, B. (2007) *Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development*. Expert Rev Vaccines 6:381-90.
- Cisterna, D. Rabia en murciélagos de Argentina. XI Congreso Argentino de Virología - II Congreso Latinoamericano de Virología. Buenos Aires, Argentina. 23-26 de junio de 2015.
- Cornetta, K.; Yao, J.; Jasti, A.; Koop, S.; Douglas, M.; Hsu, D; Couture, L. A.; Hawkins, T. y Duffy, L. (2009) *Replication-competent lentivirus analysis of clinical grade vector products*. Mol Ther 19(3):557–66.

- Crisci, E.; Bárcena, J. Y. y Montoya, M. (2012) *Virus-like particles: the new frontier of vaccines for animal viral infections*. *Vet Immunol Immunopathol* 148:211-25.
- Croughan, M.; Konstantinov, K. y Cooney, C. (2015) *The future of industrial bioprocessing: batch or continuous?* *Biotechnol Bioeng* 112(4):648-51.
- Darby, N. (2008) *Trends in biological manufacturing*. [www.asmeconferences.org/bioprocseurope08/ASMEDarby.pdf](http://www.asmeconferences.org/bioprocseurope08/ASMEDarby.pdf).
- Davlin, S. L. y VonVille, H. M. (2012) Canine rabies vaccination and domestic dog population characteristics in the developing world: A systematic review. *Vaccine* 30:3492–502.
- Delany, I.; Rappuoli, R. y De Gregorio, E. (2014) *Vaccines for the 21st century*. *EMBO Mol Med* 6(6):708-20.
- Delenda, C. (2004) *Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression*. *J Gene Med* 6:S125–S138.
- Dull, T.; Zufferey, R.; Kelly, M.; Mandel, R. J.; Nguyen, M.; Trono, D. y Naldini, L. (1998) *A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system*. *J Virol* 72:8463–71.
- Ertl, H. (2009) *Novel vaccines to human rabies*. *PLoS Negl Trop Dis* 3(9):e515.
- Fainboim, L. (2005) *Memoria inmunitaria*. En: *Introducción a la inmunología humana 5ª edición* (Eds.: Fainboim, L. y Geffner, J.) Panamericana, Buenos Aires, Argentina. p. 345-352.
- Food and Drug Administration (FDA) (2006) *Briefing document – testing for replication competent retrovirus (RCR)/lentivirus (RCL) in retroviral and lentiviral vector based gene therapy products – revisiting current FDA recommendations*. United States FDA. <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/CellularTissueandGeneTherapiesAdvisoryCommittee/UCM232592.pdf>.
- Frazatti-Gallina, N. M.; Mourao-Fuches, R. M.; Paoli, R. L.; Silva, M. L. N.; Miyaki, C.; Valentini, E. J. G.; Raw, I. y Higashi, H. G. (2004) *Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium*. *Vaccine* 23:511–7.

- Freshney, R. I. (2000) *Cloning and selection*. En: *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. 4<sup>a</sup> edición (Ed.: Freshney, R. I.) Wiley-Liss, Nueva York, Estados Unidos. p. 195-213.
- Gallo-Ramirez, L.; Nikolay, A.; Genzel, Y. y Reichl, U. (2015) *Bioreactor concepts for cell culture-based viral vaccine production*. *Expert Rev Vaccines* 14(9):1181-95.
- Garcea, R. L. y Grissmann, L. (2004) *Virus-like particles as vaccines and vessels for the delivery of small molecules*. *Curr Opin Biotechnol* 15:513-17.
- Garguilo, L. (2015) *Sanofi Pasteur: vaccine ecosystem in danger*. <http://www.outsourcedpharma.com/doc/sanofi-pasteur-vaccine-ecosystem-in-danger-0001>.
- Gaudin, Y. y Maillard, A. (2002) *Rabies virus glycoprotein can fold in two alternative, antigenically distinct conformations depending on membrane-anchor type*. *J Gen Virol* 83:1465-76.
- Gaudin, Y.; Ruigrok, R. W.; Tuffereau, C.; Knossow, M. y Flamand, A. (1992) *Rabies virus glycoprotein is a trimer*. *Virology* 187(2):627-32.
- Gluska, S.; Finke, S. y Perlson, E. (2015) *Receptor-mediated increase in rabies virus axonal transport*. *Neural Regen Res* 10(6):883-4.
- Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C. y Nairn, R. (1977). *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. *J Gen Virol* 36(1):59-72.
- Grgacic, E. y Anderson, D. (2006) *Virus-like particles: Passport to immune recognition*. *Methods* 40:60-65.
- Grimm, S. y Ackerman, M. (2013) *Vaccine design: emerging concepts and renewed optimism*. *Curr Op Biotechnol* 24(6): 1078-88.
- Gury-Dohmen, F.; Baspineiro, B.; Gury, G.; Martinez, L.; Miranda, M. R. y Cisterna, D. (2009) *Diagnóstico de un caso de rabia humana en Jujuy, 2008*. *Medicina (Buenos Aires)* 69(5) 00-00.
- Hacker, D. L.; Kiseljak, D.; Rajendra, Y.; Thurnheer, S; Baldi, L. y Wurm, F. M. (2013) *Polyethyleneimine-based transient gene expression processes for suspension-adapted HEK-293E and CHO-DG44 cells*. *Protein Exp Purif* 92:67-76.

- Harty, R. N.; Paragas, J.; Sudol, M. y Palese P. (1999) *A Proline-Rich Motif within the Matrix Protein of Vesicular Stomatitis Virus and Rabies Virus Interacts with WW Domains of Cellular Proteins: Implications for Viral Budding*. J Virol 73(4): 2921–9.
- Harty, R.; Paragas, J.; Sudol, M. y Palese, P. (1998) *A proline-rich motif within the matrix protein of VSV an Rabies Virus interact with WW domains of cellular proteins: Implications for viral budding*. J Virol. 73:2921-9.
- Heldens, J.; Patel, J.; Chanter, N.; ten Thij, G.; Gravendijck, M.; Schijns, V.; Langen, A y Schetters, T. (2008) *Veterinary vaccine development from an industrial perspective*. The Vet J 178:7–20.
- Hemachudha, T.; Ugolini, G.; Wacharapluesadee, S.; Sungkarat, W.; Shuangshoti, S. y Laothamatas, J. (2013) *Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis, and management*. Lancet Neurol 12(5):498-513.
- Hess, R.; Weber, F.; Watson, K. y Schmitt, S. (2012) *Regulatory, biosafety and safety challenges for novel cells as substrates for human vaccines*. Vaccine 30:2715–27.
- Hicks, D. J.; Fooks, A. R. y Jhonson, N. (2012) *Developments in rabies vaccines*. Clin Exp Immunol 169(3):199–204.
- Hu, S. L. y Ho, R. (2013) *Vaccines*. En: *Biotechnology and biopharmaceuticals: transforming proteins and genes into drugs 2<sup>a</sup> ed.* (Ed.: Ho, R.) Wiley, Hoboken, N. J., Estados Unidos. p. 389-416.
- Ingolotti, M.; Kawalekar, O.; Shedlock, D. J.; Muthumani, K. y Weiner, D. (2010) *DNA vaccines for targeting bacterial infections*. Exp. Rev. Vaccines 9(7):747-63.
- Jackson, A. (2011) *Therapy of human rabies*. Adv Virus Res 79:365-75.
- Jackson, A. (2013) *Current and future approaches to the therapy of human rabies*. Antiviral Res 99(1):61-7.
- Johnson, N.; Cunningham, A. F. y Fooks, A. R. (2010) *The immune response to rabies virus infection and vaccination*. Vaccine 28(23):3896–901.
- Josefsberg, J. O. y Buckland, B. (2012) *Vaccine process technology*. Biotechnol Bioeng 109(6):1443-60.

- Kallel, H.; Jouini, A.; Majoul, S. y Rourou, S. (2002) *Evaluation of various serum and animal protein free media for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells*. J Biotechnol 95:195–204.
- Kallel, H.; Rourou, S.; Majoul, S. y 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*. Appl Microbiol Biotechnol 61:441–6.
- Kaur, M.; Saxena, A.; Rai, A. Y Bhatnagar, R. (2010) *Rabies DNA vaccine encoding lysosome-targeted glycoprotein supplemented with Emulsigen-D confers complete protection in preexposure and postexposure studies in BALB/c mice*. FASEB J 24: 173-83.
- Knipe, D. y Howley, P. (2007) *Rhabdoviridae*. En: *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins. p. 1364-1408.
- Koprowski, H. (1996) *The mouse inoculation test*. En: *Laboratory techniques in rabies* 4<sup>a</sup> edición. (Eds.: Meslin, F. X.; Kaplan, M. M. Y Koprowski, H.) World Health Organization, Geneva, Switzerland; p. 80-6.
- Koraka, P.; Bosck, B.; Cox, M.; Chubet, R.; van Amerongen, G.; Bengtsson, L. K.; Martina, B.; Roose, J.; Rottier, P. y Osterhaus, A. (2014) *A recombinant rabies vaccine expressing the trimeric form of the glycoprotein confers enhanced immunogenicity and protection in outbred mice*. Vaccine 32(36):4644-50.
- Langevin, C.; Jaaro, H.; Bressanelli, S.; Fainzeilber, M. y Tuffereau, C. (2002) *Rabies Virus Glycoprotein (RVG) is a trimeric ligand for the N-terminal cysteine-rich domain of the mammalian p75 neurotrophin receptor*. J Biol Chem 277:37655-62.
- Le Ru, A.; Jacob, D.; Transfiguración, J.; Ansoorge, S.; Henry, O. y Kamen, A. (2010) *Scalable production of influenza virus in HEK-293 cells for efficient vaccine manufacturing*. Vaccine 28:3661–71.
- Li, M.; Schmitt, P.T.; Li, Z.; McCrory, T.S.; He, B. y Schmitt, A.P. (2009) *Mumps virus matrix, fusion, and nucleocapsid proteins cooperate for efficient production of virus-like particles*. J Virol 83(14):7261–72.



- Lin, C.; Huang, Z.; Wen, W.; Wu, A.; Wang, C. y Niu, L. (2015) *Enhancing protein expression in HEK-293 cells by lowering culture temperature*. PLoS One 10(4):e0123562.
- Liste-Calleja, L.; Lencina, M. y Joan-Cairó, J. (2013) *HEK293 cell culture media study towards bioprocess optimization: Animal derived component free and animal derived component containing platforms*. J Biosci Bioeng 117(4):471-7.
- Liste-Calleja, L.; Lencina, M.; Lopez-Repullo, J.; Albiol, J.; Solá, C. y Joan-Cairó, J. (2015) *Lactate and glucose concomitant consumption as a self-regulated pH detoxification mechanism in HEK293 cell cultures*. Appl Microbiol Biotechnol doi: 10.1007/s00253-015-6855-z.
- Liu, F.; Ge, S.; Li, L.; Wu, X.; Liu, Z. y Wang Z. (2011) *Virus-like particles: potential veterinary vaccine immunogens*. Res Vet Sci 93(2):553-559.
- Liu, F.; Wu, X.; Li, L.; Ge, S.; Liu, Z. y Wang, Z (2013). *Virus-like particles: promising platforms with characteristics of DIVA for veterinary vaccine design*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 36(4):343–52.
- Loza-Rubio, E.; Rojas-Anaya, E.; López, J.; Olivera-Flores, M. T.; Gómez-Lim, M. y Tapia-Pérez, G. (2012) *Induction of a protective immune response to rabies virus in sheep after oral immunization with transgenic maize, expressing the rabies virus glycoprotein*. Vaccine 30:5551–6 .
- Lua, L. H. L.; Connors, N. K.; Sainsbury, F.; Chuan, Y. P.; Wibowo, N. y Middelberg, A. P. J. (2014) *Bioengineering virus-like particles as vaccines*. Biotechnol Bioeng 111(3):425-40.
- Ludwig, C. y Wagner, R. (2007) *Virus-like particles: universal molecular toolboxes*. Curr Opin Biotechnol 18:537–45.
- Macfarlan, R.; Dietzschold, B. y Koprowski, H. (1986) *Stimulation of cytotoxic T-lymphocyte responses by rabies virus glycoprotein and identification of an immunodominant domain*. Mol Immunol 23:733–41.
- Mandell, R.; Koukuntla, R.; Mogler, L.; Carlozi, A.; Holbrook, M. R.; Martin, B. y col. (2010) *Novel suspension cell-based vaccine production systems for Rift Valley fever virus- like particles*. J Virol Methods 169:259–68.

- Mazarakis, N. D.; Azzouz, M.; Rohll, J. B.; Ellard, F. M.; Wilkes, F. J.; Olsen, A L; Carter, E. E.; Barber, R. D.; Baban, D. F.; Kingsman, S. M.; Kingsman, A. J.; O'Malley, K y Mitrophanous, K. A. (2001) *Rabies virus glycoprotein pseudotyping of lentiviral vectors enables retrograde axonal transport and acces to the nervous system after peripheral delivery*. Hum Mol Genet 10 (19):2109-21.
- Mebatsion, T.; Lonig, M. y Conzelmann, K. (1996) *Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein*. Cell 84:941-51.
- Mebatsion, T.; Weiland, F. y Conzelmann, K. (1998) *Matrix protein of rabies virus is responsable for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike Glycoprotein G*. J Virol 71:242-50.
- Meeusen, E.; Walker, J.; Peters, A.; Pastoret, P. y Jungersen, G. (2007) *Current status of veterinary vaccines*. Clin Microbiol Rev 20(3):489–510.
- Melito, P. L.; Qiu, X.; Fernando, L. M.; de Varennes, S. L.; Beniac, D. R.; Booth, T. F. y col. (2008) *The creation of stable cell lines expressing Ebola virus glycoproteins and the matrix protein VP40 and generating Ebola virus-like particles utilizing an ecdysone inducible mammalian expression system*. J Virol Methods 148:237– 43.
- Mignaqui, A. C.; Ruiz, V.; Perret, S.; St-Laurent, G.; Chahal, P. S.; Transfiguración, J.; Sammarruco, A.; Gnazzo, V.; Durocher, Y. y Wigdorovitz, A. (2013) *Transient gene expression in serum-free suspension-growing mammalian cells for the production of foot-and-mouth disease virus empty capsids*. PLoS ONE 8(8):e72800.
- Miller, E. (2014) *The most ambitious vaccine introduction in history*. Vaccine 32:4599–601.
- Ministerio de Salud, Argentina (2008) *Situación de Rabia Humana en Argentina*. DIREPI/ALERTA/A82/4.2008.  
<http://www.colvetrionegro.com.ar/alerta.pdf>
- Ministerio de Salud, Argentina (2015) *Normas y Recomendaciones Nacionales para la vigilancia, prevención y control de la Rabia*.

- <http://www.msal.gov.ar/index.php/home/funciones/materiales-para-equipos-de-salud>.
- Moore, S. M. y Hanlon C. A. (2010) *Rabies-specific antibodies: measuring surrogates of protection against a fatal disease*. PLoS Negl Trop Dis 4(3):e595.
  - Moser, M y Leo, O. (2010) *Key concepts in immunology*. Vaccine 28:2-13.
  - Murata, K.; Lechmann, M.; Qiao, M.; Gunji, T.; Alter, H.J. y Liang, T.J. (2003) *Immunization with hepatitis C virus-like particles protects mice from recombinant hepatitis C virus-vaccinia infection*. Proc Natl Acad Sci USA 100(11):6753-8.
  - Murray, K. (1988) *Application of recombinant DNA techniques in the development of viral vaccines*. Vaccine 6:164-74.
  - Nadeau, I. y Kamen A. (2003) *Production of adenovirus vector for gene therapy*. Biotechnol Adv 20:475-89.
  - Naldini, L.; Blomer, U.; Gallay, P.; Ory, D.; Mulligan, R.; Gage, F. H y col. (1996) *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector*. Science 272:263–7.
  - Neurath, A. R.; Wiktor, T. J. y Koprowski, H. (1966) *Density gradient centrifugation studies on rabies virus*. J Bacteriol 92(1):102-6.
  - Noad, R. y Roy, P. (2003) *Virus-like particles as immunogens*. Trends Microbiol 11(9):438-44.
  - Oberbek, A.; Matasci, M.; Hacker, D. y Wurm, F. M. (2011) *Generation of stable, high-producing CHO cell lines by lentiviral vector-mediated gene transfer in serum-free suspension culture*. Biotechnol Bioeng 108(3):600–10.
  - Okumura, A. y Harty, R. (2011) *Rabies virus assembly and budding*. Adv Virus Res 79:23-32.
  - Organización Mundial de la Salud (OMS) (1998) *Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals*. World Health Organ Tech Rep Ser 878:20–53.
  - Organización Mundial de la Salud (OMS) (2007) *Rabies vaccine WHO position paper*. WHO Wkly Epidemiol Rec 82:425-36.

- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2013) *WHO Expert Consultation on Rabies*. World Health Organ Tech Rep Ser 982.
- Paillet, C.; Forno, G.; Kratje, R. y Etcheverrigaray, M. *Suspension-Vero cell cultures as a platform for viral vaccine production*. *Vaccine* 27(46):6464–7.
- Patiño, S. F; Astray, R.; Pereira, C. A.; Suazo, T. C. A.; Zucatelli, R.; Mendoca, R. Z. y Jorge, S. A. C. (2014) *Transient expression of rabies virus glycoprotein (RVGP) in Drosophila melanogaster Schneider 2 (S2) cells*. *J Biotechnol* 192: 255–62.
- Perrin, P.; Madhusudana, S.; Gontier-Jallet, C., Petres, S.; Tordo, N. y Merten, O. (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(13):1244-50.
- Petiot E.; Jacob, D.; Lanthier, S.; Lohr, V. y Kamen A. (2011) *Metabolic and kinetic analyses of influenza*. *BMC Biotechnol* 11:84.
- Petiot E.; Kamen A. y Emma P. (2012) *Real-time monitoring of influenza virus production kinetics in HEK293 cell cultures*. *Biotechnol Prog* 29(1):275-84.
- Petiot, E.; Cuperlovic-Culf, M.; Shen, C. F. y Kamen, A. (2015) *Influence of HEK293 metabolism on the production of viral vectors and vaccine*. *Vaccine* 33(44):5974-5981.
- Pfeifer, A.; Lim, T. y Zimmermann, K. (2010) *Lentivirus transgenesis*. En: *Methods in Enzymology* 2ª edición (Ed.: Abelson, J. N. y Simon, M. I.) Elsevier, p. 3-15.
- Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) (2013) *Vaccine fact book*. [http://www.phrma.org/sites/default/files/pdf/PhRMA\\_Vaccine\\_FactBook\\_2013.pdf](http://www.phrma.org/sites/default/files/pdf/PhRMA_Vaccine_FactBook_2013.pdf).
- Pichon, S.; Guinet-Morlot, F.; Minutello, M.; Donazzolo, Y.; Rouzier, R.; Chassard, D.; Fitoussi, S. y Hou, V. (2013) *A serum-free, purified vero cell rabies vaccine is safe and as immunogenic as the reference vaccine Verorab™ for pre-exposure use in healthy adults: Results from a randomized controlled phase-II trial*. *Vaccine* 31:2295–301.

- 
- Pijlman, G. (2015) *Enveloped virus-like particles as vaccine against pathogenic arboviruses*. *Biotechnol J* 10:1-12.
  - Poulet, H.; Minke, J.; Pardo, M.; Juillar, V.; Nordgren, B. y Audonnet, J. (2007) *Development and registration of recombinant veterinary vaccines The example of the canarypox vector platform*. *Vaccine* 25:5606–12.
  - Prieto, C.; Fontana, D.; Etcheverrigaray, M. y Kratje, R. (2011) *A strategy to obtain recombinant cell lines with high expression levels. Lentiviral vector-mediated transgénesis*. *BMC Proc* 5(8):7.
  - Raghunandan, R. (2011) *Virus-like particles: innate immune stimulators*. *Exp. Rev. Vaccine* 10(4):409-11.
  - Ramírez, H. (2008) *Desarrollo de métodos inmunoquímicos para la identificación y cuantificación de virus de la rabia*. Tesina para optar por el título de Licenciado en Biotecnología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.
  - Reculard P. (1996) *Cell culture vaccines for veterinary use*. En: *Laboratory techniques in rabies* 4<sup>a</sup> ed. (Eds.: Meslin, F. X.; Kaplan, M. M. Y Koprowski, H.) World Health Organization, Geneva, Switzerland. p. 314–23.
  - Renard, J.M.; Spagnoli, R.; Mazier, C.; Salles, M.F. y Mandine, E. (1988) *Evidence that monoclonal antibody production kinetics is related to the integral of the viable cells curve in batch systems*. *Biotechnol Lett* 10: 91-96.
  - Rodríguez-Limas, W. A.; Sekar, K. y Tyo, K. E. J. (2013) *Virus-like particles: the future of microbial factories and cell-free systems as platforms for vaccine development*. *Curr Opin Biotechnol* 24:1-5.
  - Roldão, A.; Mellado, M. C.; Castillo, L. R.; Carrondo, M. J. T. y Alves, P. M. (2010) *Virus-like particles in vaccine development*. *Expert Rev Vaccines* 9(10):1149–76.
  - Sastry, L.; Xu, Y.; Johnson, T.; Desai, K.; Rissing, D.; Marsh, J. y Cornetta, K. (2003) *Certification assay for HIV-1-based vectors: Frequent passage of Gag sequence without evidence of replication-competent viruses*. *Mol Ther* 8(5):830-9.
  - Saxena, S.; Sonawane, A.; Dahiya, S.; Patel, C.; Saini, M.; Rai, A y Gupt, P. (2008) *Induction of immune responses and protection in mice against rabies*

- using a self-replicating RNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein. Vet Microbiol* 136:36-44.
- Schnell, M. J.; Buonocore, L.; Boritz, E.; Ghosh, H. P.; Chernish, R. y Rose, J. K. (1998) *Requirement for non-specific glycoprotein cytoplasmic domain sequence to rive efficient budding of vesicular stomatitis virus. EMBO J* 17(5):1289-96.
  - Schnell, M. J.; McGettigan, J. P.; Wirblich, C. y Papaneri, A. (2010) *The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. Nat Rev Microbiol* 8:51-61.
  - Shang, W.; Liu, J.; Yang, J.; Hu, Z.; Rao, X. (2012) *Dengue virus-like particles: construction and application. Appl Microbiol Biotechnol* 94(1):39-46.
  - Shen, C. F.; Lanthier, S.; Jacob, D.; Montes, J.; Beath, A.; Beresford, A. y Kamen, A. (2010) *Process optimization and scale-up for production of rabies vaccine live adenovirus vector (AdRG1.3). Vaccine* 30(2):300-6.
  - Shwiff, S.; Anderson, A. y Hampson, K. (2013) Potential economic benefits of eliminating canine rabies *Antiviral Res* 98(2):352-6.
  - Smith, J. S. y Yager, P. A. (1996) *A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralising antibody. En: Laboratory techniques in rabies 4<sup>a</sup> ed. (Eds.: Meslin, F. X.; Kaplan, M. M. Y Koprowski, H.) World Health Organization, Geneva, Switzerland; p.181-91.*
  - Sunley, K.; Butler, M. (2010) *Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest. Biotechnol Adv* 28(3):385-94.
  - Swiech, K.; Picanço-Castro, V. y Covas, D. T. (2012) *Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production. Protein Expr Purif* 84:147–53.
  - Tacken, P. J., de Vries, I. J. M., Torensma, R. y Rigdor C. G. (2007) *Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. Nature Rev Immunol* 7:790-802.
  - Tan, Y.; Liang, H.; Chen, A. y Gou, X. (2010) *Coexpression of double or triple copies of the rabies virus glycoprotein gene using a 'self-cleaving' 2A*

- peptide-based replication-defective human adenovirus serotype 5 vector*. *Biologicals* 38:586-93.
- Thompson, C. M.; Petiot, E.; Mullick, A.; Aucoin, M. G.; Henry, O. y Kamen, A. (2015) *Critical assessment of influenza VLP production in Sf9 y HEK293 expression system*. *BMC Biotechnol* 15:31.
  - Tissot, A. C.; Renhofa, R., Schmitz, N.; Cielens, I.; Meijerink, E.; Ose, V.; Jennings, G. T., Saudan, P., Pumpens, P. y Bachmann, M. F. (2010) *Versatile virus-like particle carrier for epitoped based vaccines*. *PLoS ONE* 5(3)e9809.
  - Tiwari, S.; Roy, S.; Tuli, R.; Mishra, D. K.; Singh, A. y Singh, P.K. (2009) *High level expression of a functionally active cholera toxin B: rabies glycoprotein fusion protein in tobacco seeds*. *Plant Cell Rep* 28:1827–36.
  - Tomar, N.; Chandra, R.; Kumar, R.; Tiwari, A. K. y Kumar, A. (2011) *Expression of rabies virus glycoprotein gene into eukaryotic system and determination of potential T-cell epitopes*. *Indian J Exp Biol* 49:594–9.
  - Toovey, S. (2007) *Preventing rabies with the Verorabs vaccine: 1985-2005 Twenty years of clinical experience*. *Travel Med Infect Dis* 5(6):327-48.
  - Trevani, A. y Geffner, J. (2005) *Inmunidad innata: barreras naturales, mecanismos de reconocimiento y sistema del complemento*. En: *Introducción a la inmunología humana* 5ª edición (Eds.: Fainboim, L. y Geffner, J.) Panamericana, Buenos Aires, Argentina. p. 9-50.
  - Tuffereau, C.; Leblois, H.; Bénéjean, J.; Coulon, P.; Lafay, F. y Flamand, A. (1989) *Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice*. *Virology* 172(1):206-12.
  - Turan, S.; Galla, M.; Ernst, E.; Qiao, J.; Voelkel, C.; Schiedlmeier, Zehe, C. y Bode, J. (2011) *Recombinase-Mediated cassette exchange (RMCE): traditional concepts and current challenges*. *J Mol Biol* 407:193–221.
  - Walpita, P.; Barr, J.; Sherman, M.; Basler, C. F. y Wang, L. (2011) *Vaccine potential of Nipah virus-like particles*. *PLoS ONE* 6(4):e18437.
  - Warikoo, V.; Godawat, R.; Brower, K.; Jain, S.; Cummings, D.; Simons, E.; Johnson, T.; Walther, J.; Marcella, Y.; Wright, B.; McLarty, J.; Karey, K.; Hwang, C.; Zhou, W.; Riske, F. y Konstantinov, K. (2012) *Integrated*

- continuous production of recombinant proteins.* Biotechnol Bioeng 109(12):3018-29.
- Warrel, M. J. (2012) *Current rabies vaccines and prophylaxis schedules: Preventing rabies before and after exposure.* Travel Med Infect Dis 10(1):1-15.
  - Wilbur, L. A. y Aubert, M. F. A. (1996) *The NIH test for potency.* En: *Laboratory techniques in rabies* 4ª edición. (Ed.: Meslin, F. X., Kaplan, M. M. y Koprowsky, H.) Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza; p. 360—8.
  - Win, S.J.; Ward, V. K.; Dunbar, P.R.; Young, S.L. y Baird, M.A. (2011) *Cross-presentation of epitopes on virus-like particles via the MHC I receptor recycling pathway.* Immunol Cell Biol 89(6):681-8.
  - Wirblich, C.; Tan, G. S.; Papaneri, A.; Godlewsky, P. J.; Orenstein, J. M.; Harty, R. N. y Schnell, M. J. (2008) *PPEY motif within rabies virus (RV) matrix protein is essential for efficient virion release and RV pathogenicity.* J Virol 82(19):9730-8.
  - Wirth, D.; Gama-Norton, L.; Riemer, P.; Sandhu, U.; Schucht, R. y Hauser, H. (2007) *Road to precision: recombinase-based targeting technologies for genome engineering.* Curr Opin Biotechnol 18:411—9.
  - Wright, E.; Temperton, N. J.; Marston, D. A.; McElhinney, L. M.; Fooks, A. R. y Weiss, R. A. (2008) *Investigating antibody neutralization of lyssaviruses using lentiviral pseudotypes: a cross-species comparison.* J Gen Virol 89:2204-13.
  - Wunderli, P. S.; Dreesen, D. W.; Miller, T. J. y Baer, G. M. (2006) *The rabies peripheral challenge test: More accurate determination of vaccine potency.* Vaccine 24:7115-23.
  - Yang, D.; Kim, H.; Lee, K. y Song J. (2013) *The present and future of rabies vaccine in animals.* Clin Exp Vaccine Res 2:19-25.
  - Yousaf, M. Z.; Qasim, M.; Zia, S.; Khan, M. R.; Ashfaq, U. A. y Khan, S. (2012) *Rabies molecular virology, diagnosis, prevention and treatment.* Virol J 9:50.



- Zeltins, A. (2012) *Construction and characterization of virus-like particles: a review*. Mol Biotechnol 53(1):92-107.
- Zepp, F. (2010) *Principles of vaccine design—Lessons from nature*. Vaccine 28:14-24.
- Zhu, J. (2012) *Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production*. Biotechnol Adv 30:1158-70.