

PRODUCCIÓN DE *VIRUS-LIKE PARTICLES* DEL VIRUS DE LA RABIA EN BIORREACTOR UTILIZANDO MEDIO LIBRE DE SUERO FETAL BOVINO

Marsili Federico Francisco^{a, b}

^aEstudiante de Licenciatura en Biotecnología. Becario de la Fundación Nuevo Banco de Santa Fe.

^bLaboratorio de Desarrollo Biotecnológico, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Biotecnología

Grupo: X

Palabras clave: Vacunas, Virus-like particles, Rabia.

INTRODUCCIÓN

La vacunación es considerada una de las formas más efectivas para prevenir enfermedades y controlar la circulación de patógenos, tanto en seres humanos como en animales (Crisci E. y col., 2012). En las últimas décadas, el desarrollo de partículas pseudovirales o *virus-like particles* (VLPs), como alternativa a las vacunas convencionales basadas en virus atenuados o inactivados, constituyó un enfoque atractivo para la inmunización, en virtud de sus propiedades inmunogénicas y de su seguridad (Jennings G. y col., 2008). Las VLPs pueden definirse como ensamblajes supramacromoleculares de geometrías bien definidas, que imitan la estructura de viriones nativos; la diferencia fundamental con respecto a éstos radica en la ausencia de ácidos nucleicos en su composición, incrementando así su bioseguridad (Johnson J. y col., 2000). La formación de estas partículas se basa en la habilidad natural que poseen algunas proteínas virales de autoensamblarse en forma espontánea, hecho que les otorga mucha aplicabilidad cuando se busca producirlas en sistemas de expresión heterólogos (Garcea R. y col., 2004). Numerosas copias de estas proteínas se ubican sobre la superficie, ofreciendo un patrón de exposición multivalente altamente ordenado capaz de inducir respuestas inmunes, tanto humorales como celulares.

Por otro lado, la rabia es una encefalitis viral con una mortalidad cercana al 100% para la cual no existe tratamiento curativo disponible. Tanto la profilaxis como la prevención de esta enfermedad dependen de la administración de vacuna antirrábica, que en la actualidad están basadas en virus de la rabia inactivado producidos en cultivos celulares y, en algunos casos, en tejido nervioso de ratón lactante. La posibilidad de contar con una tecnología de producción de una vacuna antirrábica biosegura, sin manipulación del virus activo como así también de animales, cobra gran importancia. En trabajos previos, nuestro laboratorio desarrolló VLPs para rabia (RV-VLPs) expresando la glicoproteína G de dicho virus en células de mamífero (Fontana D. y col., 2014; Fontana D. y col., 2015). Las RV-VLPs generadas son partículas con envoltura que brotan hacia el sobrenadante de cultivo en un proceso de ensamblaje mediado por la glicoproteína G, que está presente en la membrana celular. Además, los cultivos celulares recombinantes fueron adaptados para su crecimiento en suspensión utilizando medios de cultivo libres de suero (SFM, *serum free medium*) y fue evaluada su inmunogenicidad y capacidad de protección en animales de experimentación. En el presente trabajo se buscó estudiar el crecimiento de un clon celular productor en diferentes SFM, como también analizar la producción de RV-VLPs en cada condición con el objetivo de establecer una plataforma de producción de una vacuna de nueva generación en biorreactor.

Proyecto: Desarrollo y optimización de un proceso de producción de vacunas de tercera generación para animales.

Director del proyecto: Dr. Claudio Prieto

Director del becario: Dr. Claudio Prieto

Co Director: Dr. Diego Fontana

OBJETIVOS

- Adaptar un clon productor de RV-VLPs al medio de cultivo SMF4HEK 293.
- Estudiar parámetros cinéticos de crecimiento, como así también el consumo de nutrientes y producción de metabolitos, en diferentes condiciones de cultivo.
- Cultivar el clon productor de RV-VLPs en un biorreactor de 1L.

METODOLOGÍA

Adaptación al medio comercial SFM4HEK293

En el presente trabajo se partió del clon celular sP2E5 HEK 293 (*human embryonic kidney*) productor de RV-VLPs, adaptado al SFM denominado EX-CELL 293 (SAFC Biosciences, USA). Con el objetivo de adaptar dicho cultivo al medio de cultivo SFM4HEK 293 (Hyclone™, GE Healthcare) se llevó a cabo un protocolo de adaptación secuencial donde se realizaron subcultivos sucesivos, incrementando gradualmente la concentración de la nueva condición de cultivo (90%/10%, 75%/25%, 50%/50%, 25%/75%, 10%/90%) hasta llegar al 100%. Cada vez que se realizaba un cambio incremental se esperó hasta que el cultivo recuperara una viabilidad superior al 90% y una tasa de duplicación estable antes de llevar a cabo un nuevo cambio. Para caracterizar el crecimiento y la producción de RV-VLPs en cada medio de cultivo, se llevaron a cabo curvas de crecimiento en condiciones de cultivo *batch*. Para tal fin, se inoculó un frasco de cultivo con 1×10^6 cél./ml y se incubó durante 8 días a 37°C, atmósfera de CO₂ y en agitación orbital (140 rpm). Se tomaron muestras por duplicado en forma diaria, con las cuales se calculó la densidad celular, la viabilidad del cultivo y la concentración de nutrientes y metabolitos tóxicos. Las concentraciones de glucosa y lactato se determinaron mediante los métodos enzimáticos Glucosa Oxidasa/Peroxidasa (kit "Glucosa Enzimática", Sociedad de Bioquímicos) y Lactato Oxidasa/Peroxidasa (kit "Lactate", Wiener Lab.), respectivamente. Por otro lado, las concentraciones de amonio se determinaron mediante la reacción de Berthelot, con posterior lectura espectrofotométrica. La concentración de RV-VLPs fue analizada por ELISA sándwich, utilizando un estándar internacional de vacuna antirrábica (6th *International Standard for Rabies vaccine*, NIBSC) y expresando la concentración de glicoproteína G en unidades internacionales por ml (UI/ml).

Fermentación en biorreactor de 1L

Con el objetivo de evaluar la producción de RV-VLPs en biorreactor, se llevó a cabo una fermentación del clon sP2E5 en modo continuo, utilizando un biorreactor *BIOSTAT Qplus* (Sartorius) de 1 L de volumen de trabajo. El mismo cuenta con toda la periferia necesaria para su funcionamiento (electrodo de oxígeno, electrodo redox, electrodo de pH, sensor de temperatura, agitador de *impeller*, sistema de aireación con membrana, botellas de alimentación y cosecha). El biorreactor se inoculó con un cultivo del clon sP2E5 en medio EX-CELL 293 en una concentración inicial de 2×10^6 cél./ml. La fermentación se llevó a cabo durante un período de 12 días, durante los cuales se controlaron los parámetros de temperatura, agitación, porcentaje de saturación de oxígeno y pH, y a partir de la toma de una muestra diaria se determinó la concentración celular, su viabilidad, la concentración de glucosa y lactato (kit de tiras reactivas Reflectoquant® System, Millipore) como así también la concentración de RV-VLPs por ensayo de ELISA sándwich.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Adaptación del clon productor de RV-VLPs al medio de cultivo SFM4HEK 293

A partir del clon sP2E5 creciendo en medio EX-CELL 293 se llevó a cabo una adaptación

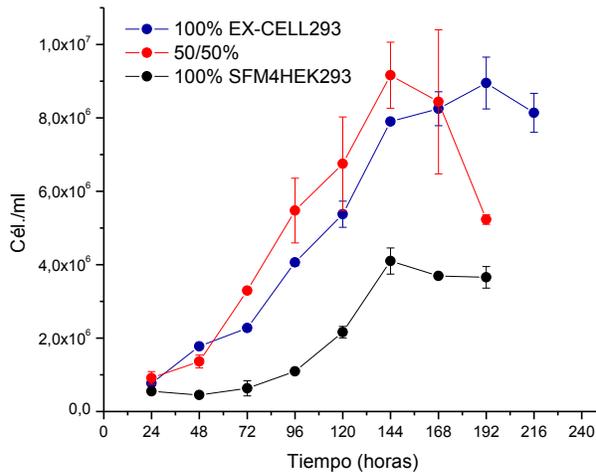


Figura 1. Curvas de crecimiento del clon sP2E5 en condiciones batch para los distintos medios de cultivo. Se muestra solo la concentración celular en cada condición.

293 se llevó a cabo una adaptación al medio SFM4HEK 293 llevando a cabo un protocolo de adaptación secuencial. Luego de aproximadamente 100 días de adaptación, se logró obtener un cultivo en 100% SFM4HEK 293 con viabilidades celulares superiores al 95% y una tasa de duplicación celular estable, sin la formación de agregados celulares. Se mantuvo también una condición de cultivo 50%/50% para ser evaluada. Para poder comparar el crecimiento del clon productor, como así también la productividad de RV-VLPs en cada medio de cultivo, se llevó a cabo una curva de crecimiento en condiciones *batch* de cultivo (Fig. 1), a partir de la cual se calcularon los parámetros cinéticos de crecimiento, consumo de

nutrientes, producción de metabolitos y productividad específica de RV-VLPs (Tabla 1). Como puede observarse, los mejores resultados con respecto al crecimiento celular fueron obtenidos en la condición de cultivo de 100% EX-CELL 293 obteniendo una concentración celular máxima cercana a los 9×10^6 cél./ml y observando una buena viabilidad durante la fase estacionaria lograda durante los últimos 72 h de cultivo. Además, puede observarse que en la condición 50%/50% se obtuvo una densidad celular máxima similar, pero perdiendo significativamente su viabilidad durante las últimas 48 h de cultivo. A su vez, se observó que en la condición 100% SFM4HEK 293 la concentración celular máxima lograda fue cercana a 4×10^6 cél./ml, muy inferior a la de las otras condiciones. Por otro lado, puede observarse como la mayor productividad específica de RV-VLPs fue obtenida en la condición de 100% EX-CELL 293 (Tabla 1), concluyendo entonces que este medio de cultivo es el más propicio para la producción de nuestro candidato vacunal, utilizando el clon celular sP2E5.

Cultivo	$\mu_{\text{máx}}$ (1/h)	q_{Amonio} (pmol/cél. h)	q_{Glucosa} (pmol/cél. h)	q_{Lactato} (pmol/cél. h)	Productividad (UI./10E6 cél.d)
100% EX-CELL	0,016	0,011	0,023	0,015	0,47
50/50 EX-CELL/SFM4HEK 293	0,014	0,054	0,054	0,015	0,44
100% SFM4HEK 293	0,013	0,026	0,119	0,036	0,16

Tabla 1. Parámetros cinéticos calculados para el clon sP2E5 en cada medio de cultivo.

Producción de RV-VLPs en biorreactor

Con el objetivo de evaluar la producción de RV-VLPs utilizando el medio de cultivo EX-CELL 293 a mayor escala, se llevó a cabo una fermentación del clon celular sP2E5 utilizando un biorreactor de 1 L operado en modo continuo con perfusión. El reactor fue

inoculado a una concentración inicial de 2×10^6 cél./ml, llegando a una densidad celular máxima $1,8 \times 10^7$ cél./ml (**Fig. 2**). El biorreactor comenzó a perfundirse en el día 4 y el caudal varió entre 0,2 y 0,4 volúmenes de reactor por día. 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 20×10^6 cél./ml.

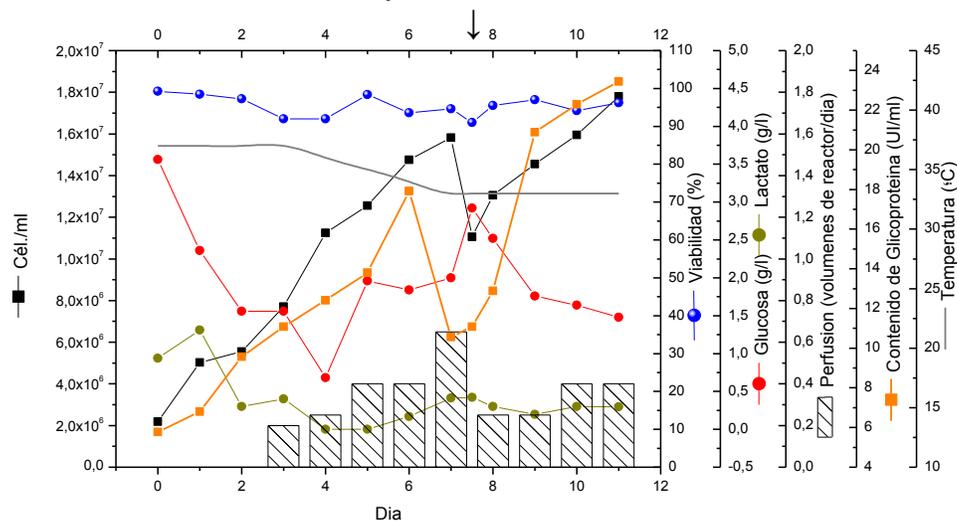


Figura 2. Fermentación del clon sP2E5 en biorreactor de 1 L. Se tomó una muestra diaria y se analizó en cuanto a la densidad celular, su viabilidad y concentración de glucosa y lactato, como así también se analizó el contenido de glicoproteína por ELISA sándwich. ↓: en el día 7 se realizó un sangrado de medio volumen de reactor.

Finalmente, se puede ver que la producción de RV-VLPs se mantuvo durante toda la fermentación, la cual fue concluida en el día 12 de cultivo y la cosecha obtenida, de aproximadamente 3,8 L presentó un valor de concentración de 10,3 UI/ml en cuanto al contenido de glicoproteína G, evaluado por ELISA sándwich. Esta cosecha fue clarificada y enviada a SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) para evaluar su potencia de vacuna antirrábica (*NIH potency test*; Wilbur y Aubert, 1996). Con los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que la mejor opción para el desarrollo del clon sP2E5 y para la producción de RV-VLPs, alcanzando la escala de biorreactor, es el medio de cultivo EX-CELL 293.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Crisci E., Bárcena J., Montoya M., 2012. Virus-like particle-based vaccines for animal viral infections. *Inmunología*, 3 2(3), 102-116.
- Jennings G., Bachmann M., 2008. The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol Chem.*, 521-536.
- Johnson J., Chiu W., 2000. Structures of virus and virus-like particles. *Curr Opin Struct Biol.*, 10, 229-35.
- Garcea R., Gissmann L., 2004. Virus-like particles as vaccines and vessels for the delivery of small molecules. *Curr Opin Biotechnol.*, 15, 513.
- Liu F., Ge S., Li L., Wu X., Liu Z., Wang Z., 2011. Virus-like particles: potencial veterinary vaccine immunogens. *Research in Veterinary Science*, 93, 553-559.
- Fontana D., Kratje R., Etcheverrigaray M., Prieto C., 2014. Rabies virus-like particles expressed in HEK293 cells. *Vaccine*, 32, 2799-2804.
- Fontana D., Kratje R., Etcheverrigaray M., Prieto C., 2014. Immunogenic virus-like particles continuously expressed in mammalian cells as a veterinary rabies vaccine candidate. *Vaccine*, 33, 4238-4246.