

## DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN PROCESO DE PRODUCCIÓN DE VACUNAS DE TERCERA GENERACIÓN PARA ANIMALES

**Federico Marsili**

*Estudiante de Lic. en Biotecnología. Becario de la Fundación Nuevo Banco de Santa Fe  
Laboratorio de Desarrollo Biotecnológico, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas  
Universidad Nacional del Litoral  
Ciencias Biológicas, Biotecnología. Grupo Y*

Palabras clave: vacunas, virus-like particles, rabia

### INTRODUCCIÓN

Las vacunas para enfermedades virales normalmente están compuestas por virus atenuados o químicamente inactivados. Una incompleta inactivación del virus o bien una reversión de la atenuación a una forma más virulenta puede generar enfermedad en individuos vacunados, por lo cual el desarrollo de vacunas novedosas, aplicando biotecnología moderna, es de gran interés en el ámbito de la salud humana y animal (Noad y Roy, 2003). Las partículas pseudovirales o *virus-like particles* (VLPs) representan uno de los avances más importantes en el desarrollo vacunas de nueva generación. Las VLPs están formadas por proteínas virales estructurales que tienen la propiedad de autoensamblarse e imitar la morfología del patógeno. Además debido a que carecen del material genético viral, la posibilidad de infección es nula, incrementando así su bioseguridad (Liu y col., 2011). Previamente nuestro grupo de trabajo ha desarrollado un método de producción de VLPs del virus de la rabia (RV-VLPs), expresando la glicoproteína G de dicho virus en cultivos de células de mamífero, adaptadas al crecimiento en suspensión (Fontana y col., 2015).

### OBJETIVOS

Como objetivo principal de este trabajo se planteó la optimización del proceso de producción y formulación de esta vacuna de tercera generación biosegura y efectiva para el virus de la rabia. Los objetivos específicos son:

- Optimizar del proceso de producción de RV-VLPs, utilizando medios de cultivo libres de suero fetal bovino (SFM, *Serum Free Media*), y su posterior escalado en biorreactores.
- Evaluar las características inmunogénicas de las RV-VLPs producidas, utilizando diversas formulaciones.

### METODOLOGÍA

**Optimización de las condiciones de cultivo: Evaluación de distintos SFM.** En esta etapa todos los cultivos se llevaron a cabo en frascos schott o erlenmeyer con 30 ml de volumen total, a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y agitación orbital a 140 rpm. Se evaluaron los medios de cultivo SFM4 HEK 293 (Hyclone®) y P2G (diseñado en nuestro laboratorio) para el crecimiento de células en suspensión. Partiendo del clon celular productor de RV-VLPs adaptado al medio EX-CELL 293 (SAFC Biosciences), se realizó un procedimiento de adaptación secuencial a SFM4 HEK 293 y a una nueva formulación con 50% EX-CELL 293 y 50% P2G (denominada RVPM, *Rabies Vaccine Production Medium*). Una vez lograda la adaptación a SFM4 HEK 293 y a RVPM se determinaron para cada condición los parámetros cinéticos asociados al crecimiento celular, al consumo de glucosa y a la producción de lactato y amonio. Asimismo se determinó la productividad específica de RV-VLPs por ELISA sándwich.

**Escalado de la producción: Cultivo en Biorreactor de 1L.** Con el objetivo de evaluar la producción de RV-VLPs en una mayor escala y poder comparar la

Director del proyecto y del becario: Dr. Claudio Prieto

Co-director del becario: Dr. Diego Fontana

Proyecto: *Desarrollo de una plataforma tecnológica para la producción de vacunas innovadoras y bioseguras.*

productividad obtenida con cada una de las formulaciones de medios de cultivos, se llevaron a cabo dos fermentaciones paralelas en modo continuo, en volumen final de 1L. Se emplearon biorreactores multivasos BIOSTAT Q-plus (Sartorius), equipados con toda la periferia necesaria para su funcionamiento (electrodo de oxígeno, electrodo de pH, sensor de temperatura, agitador de impeller, sistema de aireación con membrana, botellas de alimentación y cosecha). Las células fueron inoculadas a una densidad de  $1 \times 10^6$  cél/ml, utilizando inicialmente el medio EX-CELL 293 en ambos biorreactores. Al cabo de 5 días de fermentación comenzó a perfundirse medio fresco, operando en un rango entre 0,2 y 0,5 volúmenes de reactor por día. Durante los 14 días de fermentación se tomaron muestras para realizar recuentos de células viables, determinación de glucosa y lactato (kit de tiras reactivas Reflectoquant® System, Millipore), así como también determinación del contenido de RV-VLPs (por ELISA sándwich).

### Evaluación de las características inmunogénicas de las RV-VLPs

**Test de potencia del NIH.** Para confirmar la capacidad de las RV-VLPs de generar una respuesta inmune protectora en animales vacunados, se llevó a cabo el test de potencia del NIH (*National Institute of Health*) para vacuna antirrábica (Wilbur y col., 1996). Este ensayo de referencia fue llevado a cabo por el Departamento de Rabia del SENASA, dado que nuestro laboratorio no cuenta con las instalaciones requeridas para la manipulación del virus rábico activo. La cosecha obtenida en biorreactor fue clarificada por centrifugación, filtrada en esterilidad y acondicionada con solución estabilizante para vacuna, para luego ser enviada al SENASA.

**Caracterización de la respuesta inmune inducida por las RV-VLPs.** Con el objetivo de caracterizar la respuesta inmune inducida por nuestro candidato vacunal se llevó a cabo un plan de inmunización de animales de experimentación, en donde las RV-VLPs fueron evaluadas utilizando dos tipos de adyuvantes. Por un lado las VLPs fueron formuladas con gel de hidróxido de aluminio (Alhydrogel®), un adyuvante ampliamente utilizado tanto en vacunas de uso humano como veterinario. Por otro lado se utilizó un preparado liposomal conteniendo saponina (IREmax), proporcionado por la empresa Lipomize S.R.L. Asimismo el plan incluyó la inmunización de un grupo de animales con las RV-VLPs sin adyuvante, como así también a un grupo control inmunizado con la vacuna comercial para rabia. En la práctica se inmunizaron grupos de ratones hembra Balb/c con cada una de las preparaciones descritas, las cuales se administraron en dos dosis (separadas por 7 días) por vía intraperitoneal. Posteriormente se fueron extrayendo muestras de suero en los tiempos estipulados (**Figura 1**) a partir de los cuales se evaluó la respuesta inmune inducida. Se realizaron determinaciones de los títulos de anticuerpos específicos totales, por ELISA específico indirecto, y de la concentración de anticuerpos neutralizantes (RVNA, *Rabies Virus Neutralizing Antibodies*), mediante el ensayo *in-vitro* de lentivirus pseudotipados.



**Figura 1. Plan de inmunización.** Los individuos pertenecientes a los distintos grupos fueron inmunizados en una primera dosis con RV-VLPs (con y sin adyuvantes) y con la vacuna comercial. La segunda dosis tuvo lugar al cabo de un período de 7 días. Se realizaron sucesivas extracciones de sangre al cumplirse 17, 47 y 147 días de la primera dosis.

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

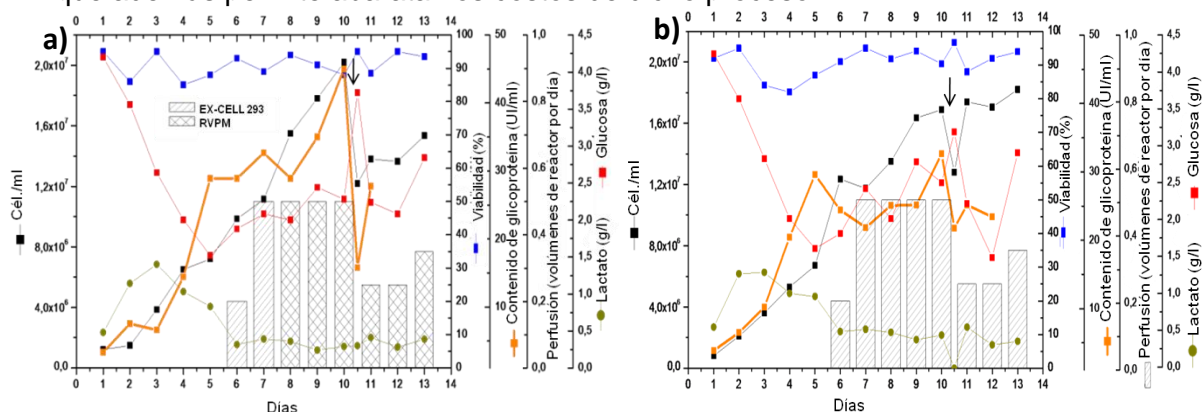
**Optimización de las condiciones de cultivo.** Se llevó a cabo un procedimiento de adaptación secuencial del clon productor de RV-VLPs a distintos medios de cultivo. Una vez lograda la adaptación se realizaron curvas de crecimiento en EX-CELL 293, SFM4 HEK 293 y en RVPM, a partir de cuyas muestras se determinaron las concentraciones de glucosa, lactato y amonio. Se calcularon los parámetros cinéticos de consumo de glucosa, de producción de lactato y amonio, así como la tasa de

crecimiento celular. El contenido de RV-VLPs fue determinado para la fase de crecimiento exponencial, mediante ELISA sándwich. A partir de estos resultados se calculó la productividad específica para cada condición, quedando expresada en UI/10<sup>6</sup>cél.día (**Tabla 1**). Puede observarse que la productividad disminuye cuando se emplea el medio de cultivo SFM4 HEK 293, razón por la cual no se continuó trabajando con el mismo. Por otro lado, se tuvo gran interés en evaluar el crecimiento y la producción de VLPs en RVPM, dado que su formulación permitió reducir el volumen empleado del medio EX-CELL 293 (a expensas de un medio basal mínimo), disminuyendo así los costos del proceso. Si bien la densidad celular máxima alcanzada en RVPM a los 5 días de cultivo fue de 4,5x10<sup>6</sup>cél/ml (contra un valor de 8x10<sup>6</sup>cél/ml en EX-CELL 293), no hubo un cambio en la productividad específica de RV-VLPs. Además fue posible comprobar un buen crecimiento celular cuando se realizaron subcultivos en forma directa desde la condición 100% EX-CELL 293 a RVPM, hecho que resultó de importante aplicación cuando se avanzó hacia la escala de trabajo en biorreactor, con régimen de perfusión.

**Tabla 1.** Valores de productividad específica

CULTIVO	Productividad (UI/10E6 cél.d)
EX-CELL 293	0,88
SFM4 HEK 293	0,16
RVPM	0,90

**Escalado de la producción.** Para evaluar y comparar los rendimientos de los medios de cultivos EX-CELL 293 y RVPM en la producción a mayor escala, se llevaron a cabo dos fermentaciones paralelas en volumen final de 1L. En función de los valores de densidad celular máxima observados en la pequeña escala, se optó por inocular ambos biorreactores utilizando EX-CELL 293 y mantener los cultivos en modo *batch* hasta alcanzar densidades celulares elevadas (1x10<sup>7</sup>cél/ml). A partir del día 5 se comenzó a perfundir medio EX-CELL 293 fresco, siendo éste luego reemplazado por RVPM en la alimentación de uno de los reactores (día 7). En la **Figura 2** se observa la evolución en el tiempo de los parámetros estudiados para cada biorreactor. En ambos casos se registró una producción continua y sostenida de RV-VLPs durante los 14 días de fermentación, acompañada de un buen crecimiento celular. A su vez, la determinación de la concentración de RV-VLPs en las cosechas obtenidas dio lugar a resultados similares para ambas condiciones de cultivo (16,1 UI/ml en RVPM y 14,1 UI/ml en EX-CELL 293). A partir de estos resultados se pudo concluir que el empleo del medio RPVM en el cultivo de las células en escala de fermentación constituye una estrategia beneficiosa para el proceso de producción, ya que no sólo mantiene un nivel de producción comparable al registrado en EX-CELL 293 (el medio de partida) sino que además permite abaratar los costos de dicho proceso.

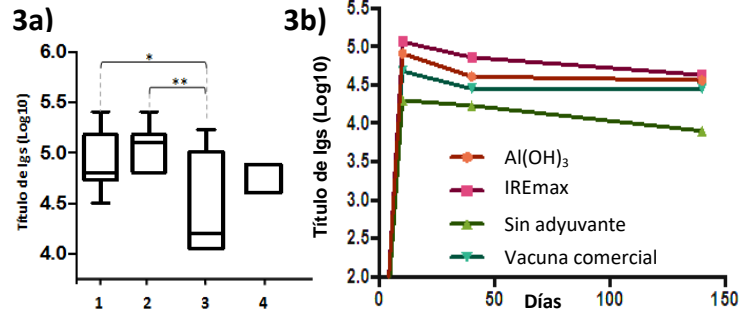


**Figura 2.** Evolución de los parámetros de cultivo en biorreactores de 1L. Se llevaron a cabo dos fermentaciones paralelas con el fin de evaluar el crecimiento y la producción de RV-VLPs utilizando distintos medios de cultivo, una vez iniciado el régimen de perfusión. a) RVPM b) EX-CELL 293. ↓: Sangrado del biorreactor.

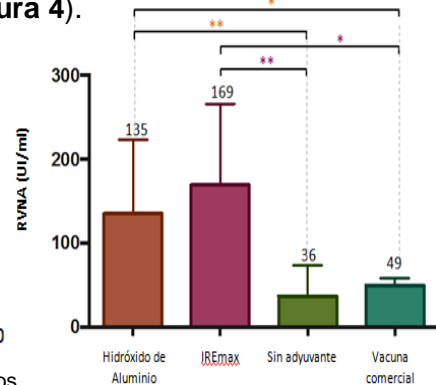
**Características inmunogénicas de las RV-VLPs: Test de NIH.** El laboratorio del SENASA informó un valor de potencia de 1,5 UI/ml para la vacuna basada en

RV-VLPs, obtenido por comparación con una vacuna para rabia de referencia (siendo el valor de 1UI/ml el mínimo requerido para la autorización del lote).

**Caracterización de la respuesta inmune inducida.** A partir de los sueros obtenidos en las extracciones de sangre se determinaron los títulos de anticuerpos específicos totales (**Figura 3**) y las concentraciones de RVNA (**Figura 4**).



**Figura 3. Títulos de anticuerpos específicos totales.** a) Títulos obtenidos para la primera extracción. 1. Hidróxido de aluminio. 2. IREmax. 3. Sin adyuvante. 4. Vacuna comercial. b) Títulos de anticuerpos específicos en el tiempo.



**Figura 4. Títulos de RVNA para la primera extracción.**

En primer lugar, en la **Figura 3a** puede observarse que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de animales inmunizados con las RV-VLPs y la vacuna comercial, lo que demuestra la capacidad del candidato vacunal de producir una respuesta inmune específica comparable a la de un producto actualmente utilizado. Además, se puede observar que la utilización de adyuvantes produjo un incremento en los títulos de los anticuerpos inducidos, encontrando diferencias significativas para ambos grupos en comparación con el grupo de animales que fue inmunizado sólo con las VLPs. Por otro lado, se evaluó la evolución del título de anticuerpos a lo largo del tiempo (**Figura 3b**). Puede observarse que en todos los grupos se indujo una respuesta de anticuerpos de larga duración, aunque para el grupo de las RV-VLPs inyectadas sin adyuvante se observen los menores títulos en el tercer sangrado. Estos resultados demuestran entonces que la inclusión de los adyuvantes en la formulación final de la vacuna sería beneficiosa, induciendo no solo títulos superiores de anticuerpos sino lográndose mantener dichos títulos en valores elevados por mayor tiempo. En la **Figura 4** puede observarse que las RV-VLPs son capaces de inducir anticuerpos neutralizantes con un título significativamente superior a 0,5 UI/ml, valor mínimo que representa una adecuada vacunación (primera extracción). Además, no se observaron diferencias significativas entre este grupo y el inmunizado con la vacuna comercial, resultado que demuestra que las RV-VLPs por si solas son un excelente candidato vacunal. Por otro lado, la adición de adyuvantes a la formulación de las VLPs resultó en la inducción de títulos de RVNA significativamente superiores en comparación con los grupos inmunizados con las RV-VLPs y la vacuna comercial. Puede concluirse que las RV-VLPs producidas por nuestra tecnología son capaces generar una respuesta inmune protectora, caracterizada por la producción de anticuerpos específicos y neutralizantes. Además dicha producción se ve incrementada cuando se incluye adyuvante en la preparación de la vacuna, con lo cual esta elección en la formulación podría aumentar la eficiencia del producto veterinario final y del proceso de producción global.

## BIBLIOGRAFIA BASICA

- Noad R., Roy P., 2003. Virus-like particles as immunogens. Trends in Microbiology, Vol 11, No. 9
- Liu F., Ge S., Li L., Wu X., Wang Z., 2011. Virus-like particles: potential veterinary vaccine immunogens. Research in veterinary science.
- Fontana D., Kratje R., Etcheverrigaray M., Prieto C., 2015. Immunogenic virus-like particles continuously expressed in mammalian cells as a veterinary rabies vaccine candidate. Vaccine, 33, 4238-4246.
- Wilbur L. A. The NIH test for potency. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowsky H, editores. Laboratory techniques in rabies. Ginebra, Suiza: WHO; 1996 p. 360-64.