



Código: PICYDT-CAyT-01-2016

“DESARROLLO DE TÉCNICAS DE
DOWNSTREAM PARA LA OBTENCIÓN A
ESCALA DE VECTORES VIRALES
RECOMBINANTES”

Director: Pérez, Oscar Ramón

Integrantes: MICUCCI, Matías; GARANZINI, Débora;
JURADO, Rosana; RAIBENBERG, Fernando

Año: 2020



INFORME FINAL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN RESULTADOS ALCANZADOS Y PRODUCCIÓN CyT Universidad Nacional de Moreno

DATOS BÁSICOS DEL PROYECTO

Clase y convocatoria:

PICYDT - CONVOCATORIA 2016 PARA LA PRESENTACIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DESARROLLO TECNOLÓGICO (PICYDT): DESARROLLO INTEGRAL CON EQUIDAD DEL ÁREA METROPOLITANA BUENOS AIRES (AMBA)

Nombre completo del proyecto:

“Desarrollo de técnicas de downstream para la obtención a escala de vectores virales recombinantes”.

Fecha de inicio y de finalización:

01/04/18 al 30/03/19

Departamento/Centro/Carrera:

Ciencias Aplicadas y Tecnología – Lic. En Biotecnología.

Director del Proyecto:

Lic. Oscar Ramón Pérez

PALABRAS CLAVE: RABIA, VACUNA, BIOPROCESOS, ULTRAFILTRACIÓN TANGENCIAL

PARTE I: INFORME FINAL DE LOS RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN PARA REPOSITO- RIO UNM.

a). Presentación del proyecto y desarrollo logrado

Las modernas tecnologías de producción de vacunas de segunda y tercera generación, involucran escalado de cultivo masivo de células animales y métodos de procesos aguas abajo o downstream process. Estos son críticos a la hora de disponer biomoléculas de uso terapéutico, no solo en lo referente a su grado de pureza sino también, en lo que atañe a la productividad del proceso de elaboración elegido, para tal producto biológico.

Tomando como modelo el desarrollo de vacunas contra el virus de la rabia y, en función de lo expuesto, se propuso el proyecto en cuestión, para el cual se trazaron los siguientes objetivos:

1). Puesta a punto de las condiciones necesarias para concentrar un volumen de antígeno viral (en una primera etapa proveniente de vacunas de segunda generación virus PV BHK y en una segunda vector viral MVA recombinante) y un modelo de escalado de tales condiciones. El método utilizado fue ultrafiltración tangencial.

2). Puesta a punto de un método in vitro de titulación de virus en cultivo celulares.

Este proyecto permitió la puesta a punto de una serie de técnicas que aún no se habían aplicado en los protocolos de rutina de elaboración de vacunas de segunda y tercera generación. El método de concentración mediante ultrafiltración tangencial, ofrece una alternativa satisfactoria en cuanto a su reproducibilidad y escalado.

Los ensayos de evaluación in vitro aún deben ser ajustados en cuanto a su correlación con los realizados in vivo.

b). Marco teórico:

La rabia es una enfermedad zoonótica de evolución aguda, habitualmente mortal. Es causada por el virus de la rabia (VR), que se transmite entre algunas especies de sangre caliente y el hombre. Para su prevención la principal herramienta es la vacunación. Actualmente se utilizan vacunas basadas en virus rábico crecido sobre células e inactivado, donde su producción requiere de laboratorios con altos niveles de bioseguridad porque se manipulan grandes cantidades de un agente infeccioso que causa enfermedad (tanto para los animales como para las personas). También, para evitar esta desventaja, existen desarrollos de vacunas recombinantes que portan el gen de la glicoproteína del VR (RG), proteína target contra la que se dirige la mayor respuesta inmunológica en el huésped. Específicamente, como resultado de un trabajo en colaboración entre el Servicio Vacuna Antirrábica de la ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" y el Instituto de Biotecnología de INTA Castellar, se desarrolló un vector recombinante virus vaccinia Ankara modificado (MVA) que expresan la RG. Existen numerosos antecedentes que demuestran que estos vectores virales no replican productivamente a mamíferos pero son capaces de expresar la proteína foránea induciendo respuestas inmunes específicas.

Para mejorar la eficacia de ambos tipos de vacunas mediante concentración antigénica se puede utilizar un método de ultrafiltración tangencial que consiste en someter a cada suspensión vacunal a circular por presión a través de una membrana porosa, que según el tamaño del poro y la magnitud de la presión, entre otros factores, deja pasar solvente y componentes de bajo peso molecular, de manera tal de concentrar y purificar el antígeno.

c). Resultados:

El VR utilizado para la producción del lote vacunal de segunda generación fue cuantificado por el método tradicional en ratones ($10^{7,8}$ DL₅₀/mL) y por el nuevo diseño de titulación en células ($10^{6,1}$ DICT₅₀/mL). El diseño de esta titulación in vitro del virus se realizó sobre células BHK-21 cultivadas en placas estériles multipocillo de 96 pocillos. Para ello, primero se estableció el tiempo de cultivo óptimo y la densidad celular necesaria para realizar la titulación en un período de incubación no mayor a 48 hs en las placas utilizadas. El uso de una densidad inicial de 300.000 células/ml (30.000 células por pocillo de placa de 96 pocillos) asegura la formación de una monocapa con 90/95% de confluencia celular a las 48hs por sembrado. En este formato, el virus de la rabia logra una replicación visible (efecto ci-

topático) a las 48hs post-infección, se realiza la titulación viral mediante diluciones seriadas al décimo y siembra de las mismas por octuplicado. El título se expresó como la cantidad de dosis que provocan 50% de efecto citopático (muerte celular en la mitad de los pocillos, cuatro de ocho pocillos infectados con la misma dilución viral) por mililitro de muestra (DCT50/ml). Si bien se pudo cuantificar el virus in vitro mediante este método que implica observación directa al microscopio, los resultados obtenidos no resultan tan sensibles como la titulación in vivo a través del uso de ratones. En una etapa próxima se plantea aumentar la sensibilidad del método in vitro mediante el empleo de una tinción específica con anticuerpos anti-virus de la rabia conjugados con enzimas o fluorocromos. El lote final formulado (8L) se controló por el método NIH de potencia en modelo murino, resultando un valor antigénico de 1,2 UI/mL.

Dicho lote de segunda generación formulado fue sometido a un ensayo de concentración por ultración tangencial. La puesta a punto de dicha metodología se describe a continuación.

Se trabajó con dos potencias de bomba: 2,1% y 5%. Estos porcentajes correspondieron con caudales totales de 700 y 1200 mL/min, respectivamente. Para una potencia de bomba de 2,1% con agua purificada, se registraron los siguientes parámetros.

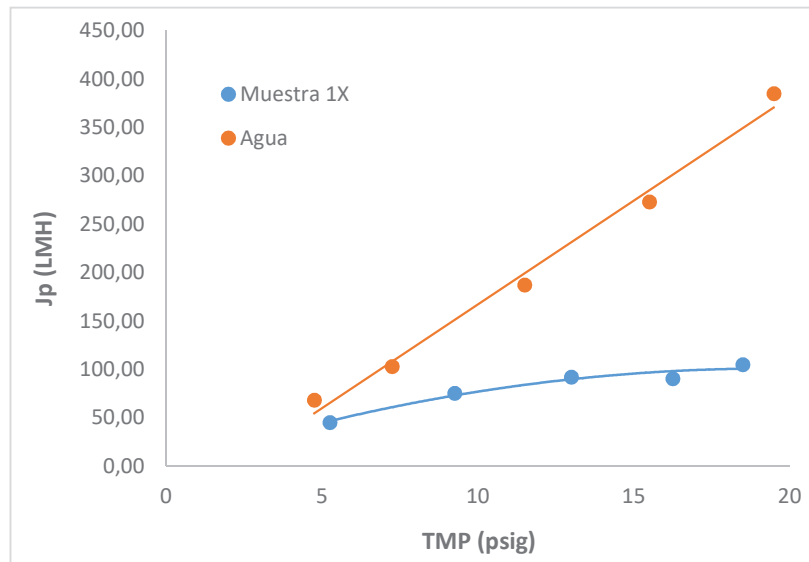
P _{in} (psig)	P _{out} (psig)	ΔP (psig)	TMP (psig)	Fp (ml/min)	Jp (LMH)
5,5	4	1,5	4,75	12,5	68,18
8	6,5	1,5	7,25	18,9	103,09
12	11	1	11,5	34,35	187,36
16	15	1	15,5	50,1	273,27
20	19	1	19,5	70,6	385,09

Luego de equilibrar la membrana con PBS, con una potencia de bomba también de 2,1%, para un volumen de 400 mL de muestra se registraron las siguientes variables:

Pin (psig)	Pout (psig)	DeltaP (psig)	TMP (psig)	Fp (ml/min)	Jp (LMH)
6,5	4	2,5	5,25	8,31	45,33
10	8,5	1,5	9,25	13,8	75,27
14	12	2	13	16,89	92,13
18	14,5	3,5	16,25	16,62	90,65

20	17	3	18,5	19,22	104,84
----	----	---	------	-------	--------

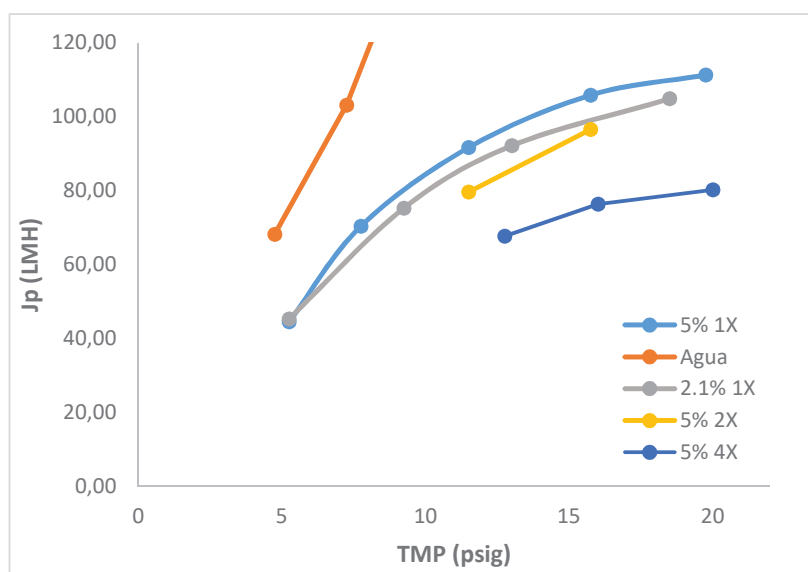
Comparando ambos resultados mediante un gráfico de Jp en función de la TMP:



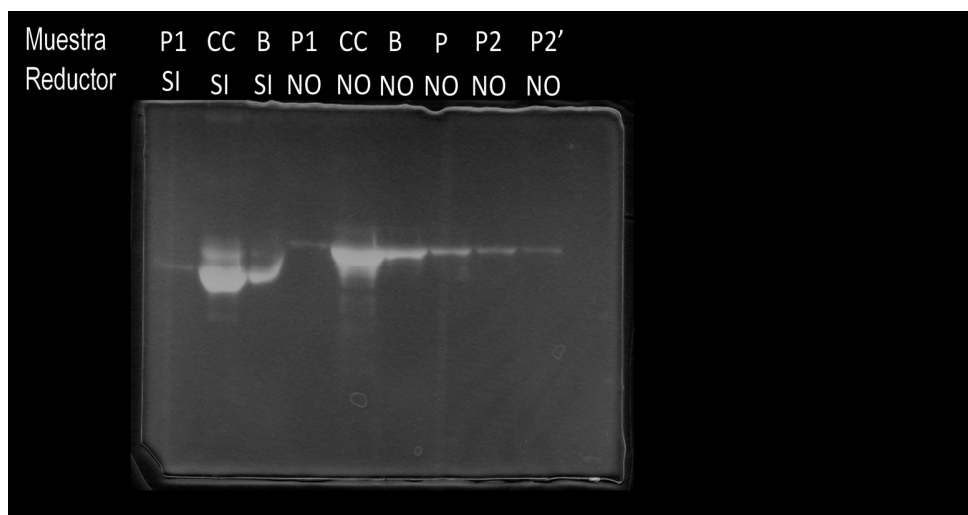
Dada la buena performance de la membrana, se decidió realizar la concentración a con un mayor flujo total aumentando la potencia de la bomba al 5%. Los resultados obtenidos, para una concentración progresiva, fueron los siguientes:

Muestra	Pin (psig)	Pout (psig)	DeltaP (psig)	TMP (psig)	Fp (ml/min)	Jp (LMH)
1X	8,5	2	6,5	5,25	8,16	44,51
	10,5	5	5,5	7,75	12,9	70,36
	14	9	5	11,5	16,8	91,64
	18	13,5	4,5	15,75	19,4	105,82
	22	17,5	4,5	19,75	20,4	111,27
2X	14	9	5	11,5	14,6	79,64
	18	13,5	4,5	15,75	17,7	96,55
4X	14	11,5	2,5	12,75	12,4	67,64
	17	15	2	16	14	76,36
	21	19	2	20	14,7	80,18

Con un nuevo gráfico de Jp en función de la TMP podemos comparar la performance de la membrana para cada caso:

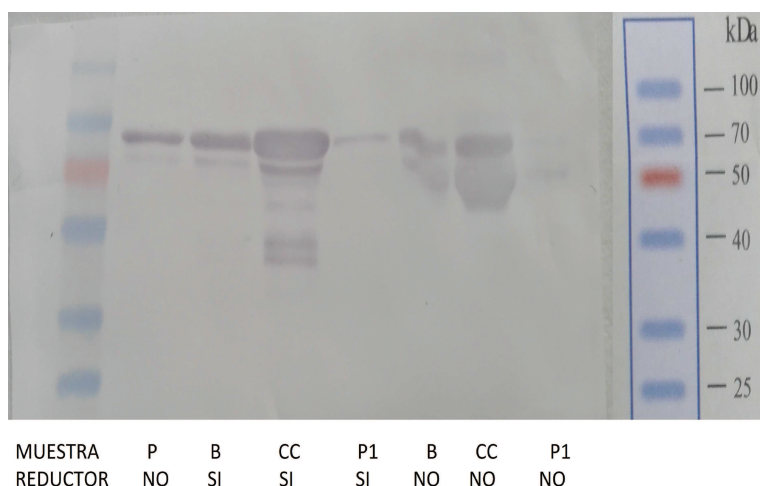


Como resultado final, se concentró un volumen de antígeno de aproximadamente 950 mL a 240 mL (concentración 4X). El resultado se analizó mediante un SDS-Page en gel de poli-acrilamida 12.5% revelado con Coomassie Blue R-250.



Por el método de Bradford, resultaron concentraciones proteicas de 0,73 mg/mL en el bulk, 2,26 mg/mL en el concentrado y 0,11 mg/mL en el permeado

Ensayo Western Blot



La realización de este ensayo confirma la especificidad del antígeno concentrado, ya que la glicoproteína del VR tiene un peso de 60 Kd.

Ensayo de potencia. Comparación entre Bulk y Concentrado

Se realizó el ensayo de potencia en el modelo murino, según método NIH, evaluando tanto la vacuna sin concentrar (Bulk) y el producto obtenido luego de la ultrafiltración (Concentrado). Los resultados fueron 1,1 y 1,9 UI/mL, respectivamente. Esta comparación no muestra una certera correlación con el grado de concentración antigénica obtenida, pero sí indica un aumento de la eficacia de la vacuna.

Escalado

Del gráfico de J_p en función de la TMP, mediante el cálculo de la integral del área debajo de cada curva, se establecen los siguientes parámetros para el escalado del proceso:

V=5 litros / Cf= 4x		A (cm ²)			t (hr)	
TMP	Integral	t= 60 min	t= 90 min	t= 120 min	A= 110 cm ²	A= 220 cm ²
12 psi	9,10E-03	455,00	303,33	227,50	4,14	2,07
15,75 psi	7,60E-03	380,00	253,33	190,00	3,45	1,73

e). Conclusiones:

El proyecto ha concluido en cuanto a la puesta a punto de los métodos mencionados, principalmente el de ultrafiltración tangencial (bioproceso de aguas abajo). Se advierte que aún se deben ajustar etapas posteriores para generar un proceso integral de producción cerrado, que garantice la esterilidad del producto. Por otra parte si bien el proceso es reproduci-

ble se están repitiendo ensayos con volúmenes mayores de antígenos recombinantes, a fin de alcanzar consistencia de lote para este tipo de biológico.

Aún se debe continuar con el ajuste de la técnica de evaluación in vitro.