



Código: PI-CAyT-04-2019

**“DESARROLLO DE UN MÉTODO DOWNSTREAM
DE CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN
ANTIGÉNICA POR ULTRACENTRIFUGACIÓN DE
VACUNAS ANTIRRÁBICAS DE SEGUNDA Y
TERCERA GENERACIÓN”**

Director: PERÉZ, Oscar

Integrantes: CALAMENTE, Gabriela; MICUCCI, Matías Ariel; RIVA,
Diego Ariel; KNAUPP, Julián

Año: 2020



Informe Final de Proyectos de Investigación (PI) Universidad Nacional de Moreno

Identificación del proyecto

| | |
|---|---|
| Tipo de proyecto y año de convocatoria: | PI UNM 2018 |
| Nombre completo del proyecto: | DESARROLLO DE UN MÉTODO DOWNSTREAM DE CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN ANTIGÉNICA POR ULTRACENTRIFUGACIÓN VACUNAS ANTIRRÁBICAS DE SEGUNDA Y TERCERA GENERACIÓN. |
| Director/a: | Lic. Oscar Pérez |
| Lineamiento estratégico: ¹ | INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA Bioprocesos |
| Fecha de inicio: | 01/04/2019 |
| Fecha de finalización: | 30/11/2021 |
| Unidad de localización: Departamento/Centro/ Programa | DEPARTAMENTO DE CIENCIAS APLICADAS Y TECNOLOGÍA PROGRAMA ACADÉMICO PARA LA INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA |
| Resumen: (máx. 300 palabras) | <p>La rabia es una enfermedad que, una vez presente la sintomatología típica, tiene una altísima mortalidad, causada por el virus de la rabia (RABV). La vacunación es la única forma de prevenirla.</p> <p>Este proyecto, continúa la línea del PICYTD 2016 ("Desarrollo de técnicas de downstream para la obtención a escala de vectores virales recombinantes") y está basado en el desarrollo de otra técnica downstream de concentración/purificación antigénica con el fin de comparar ambas metodologías y optimizar la plataforma productiva de vacunas virales tomadas como modelo.</p> <p>El Servicio Vacuna Antirrábica de la ANLIS Malbrán tiene vasta experiencia en el desarrollo de vacunas antirrábicas de 2º generación, basadas en amplificación viral sobre cultivos celulares e inactivación. También realiza trabajos en cooperación con el INTA. Como resultado de esta interacción se desarrolló un vector poxviral recombinante que</p> |

¹ Según Resolución UNM- CS 848/21 Lineamientos estratégicos de Investigación y Desarrollo Tecnológico 2022-2027.

| | |
|------------------|---|
| | <p>expresa la proteína G de RABV: virus vaccinia Ankara modificado (MVA-RG). Nuestro grupo de investigación demostró que induce protección frente a RABV en el modelo murino.</p> <p>Se parte de la hipótesis que la concentración por ultracentrifugación de los antígenos vacunales RABV inactivado (VRI) y MVA-RG correlaciona con un aumento de los niveles de protección frente al desafío con virus rábico.</p> <p>Los virus RABV y MVA-RG fueron amplificados sobre cultivo de células BHK-21. RABV se inactivó químicamente. Ambos stocks fueron sometidos a un método de concentración y purificación por ultracentrifugación. Se evaluaron y optimizaron parámetros tales como tipo, tiempo y velocidades de centrifugación para cada virus. Para evaluar el grado de purificación y la concentración antigénica se realizaron SDS-PAGE y Western Blot. Se llevaron a cabo pruebas de potencias comparativas en modelo murino (método NIH) antes y después de la concentración antigénica. Finalmente, se compararon los resultados obtenidos para definir un protocolo de concentración.</p> |
| Palabras claves: | Vacunas, Rabia, concentración, purificación. |

Parte I

Informe de resultados para el repositorio²

1. Introducción y objetivos (*mínimo 1 página- máximo 2 páginas*)

- Realizar una presentación general del estudio (tema/problema) y una justificación de su relevancia (motivos para estudiarlo, aportes potenciales).

- Indicar el objetivo general de la investigación y los interrogantes efectivamente trabajados en el proyecto.

El concepto «**Una sola salud**» resume la noción donde la salud humana y la sanidad animal son interdependientes y están vinculadas a los ecosistemas en los cuales coexisten. La OIE apoya y aplica este enfoque para comprender los riesgos que deben afrontar la salud humana y la sanidad animal, respecto a los animales domésticos o silvestres, y los ecosistemas¹.

Las enfermedades de origen animal a las que el hombre es sensible, como la influenza aviar, la rabia, la tuberculosis o la brucelosis, representan riesgos mundiales para la salud pública. La rabia es una enfermedad zoonótica de evolución aguda, habitualmente mortal. Es causada por el virus de la rabia (VR) el cual se transmite entre algunas especies de sangre caliente y el hombre. El principal vector de contagio del hombre son los perros y en menor medida los gatos.

La rabia es una enfermedad que, una vez presente la sintomatología típica, tiene una altísima mortalidad. Generalmente, tiene impacto sanitario en poblaciones pobres y vulnerables que no disponen o no tienen fácil acceso a las vacunas humanas e inmunoglobulinas. A pesar de ser una enfermedad totalmente prevenible, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la rabia causa decenas de miles de muertes cada año, principalmente en Asia y África. La vigilancia, prevención y el control están centrados en el eslabón animal, debido a que el humano adquiere la enfermedad mediante el contacto –mordedura, lamido– con un individuo infectado².

Actualmente, la baja disponibilidad de vacunas, especialmente de uso humano, es una señal de alarma para el Ministerio de Salud de la Nación (MSAL), en su objetivo de controlar esta zoonosis que, de ocurrir un evento en humanos, el único tratamiento eficaz es la vacunación. Por este motivo, en un contexto de soberanía sanitaria y de estímulo de la producción pública de medicamentos, es de importancia estratégica dotar al estado de una tecnología de producción de vacunas de calidad con el objetivo de contribuir a cubrir la demanda nacional de este biológico, tanto de uso humano como veterinario.

En la actualidad, existe una tendencia a eliminar componentes de origen animal en los medios de cultivo en los que crecen las células empleadas como sustrato para la replicación viral, ya sea para vacunas de segunda como de tercera generación. Esta restricción se fundamenta en la potencial presencia de priones en los componentes de tales medios, por ejemplo, en el suero utilizado como aditivo. Por otro lado, la demanda de vacunas de calidad y eficacia avanza en el sentido de las innovaciones tecnológicas. Tanto en los países de Europa como América del Norte se utilizan vacunas recombinantes para controlar la rabia silvestre y/o doméstica, pero nuestro país no dispone de este tipo de productos. Consideramos que es de interés estratégico el desarrollo de una plataforma para dotar al Ministerio de Salud y Desarrollo Social con este tipo de vacunas.

La Universidad Nacional de Moreno (UNM), en el marco de desarrollo de la carrera de Lic. en Biotecnología, se propone en llevar a cabo líneas de investigación tecnológica entre las cuales, la vacunología viral es un área temática de interés. En tal sentido, se iniciaron convenios de colaboración con el Servicio Vacuna Antirrábica (SVAR) perteneciente al Instituto Nacional de Producción de Biológicos (INPB) en el ámbito de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) "Dr. Carlos G. Malbrán" y con el Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria/CONICET. Como consecuencia de los mismos, el proyecto que aquí se describe involucra la necesidad de continuar con la implementación de tecnologías de procesos downstream para generar una plataforma optimizada para la elaboración de vacunas virales, tomando como modelo en este caso particular al VR.

Hipótesis: La concentración por el método de ultracentrifugación de los antígenos vacunales VR inactivado (VRI) y Virus Ankara modificado que expresa el gen de la glicoproteína del VR (MVA-RG) correlaciona con un aumento de los niveles de protección frente al desafío con virus rábico.

Objetivo específico 1: Implementar un método de ultracentrifugación para VRI y para MVA-RG.

Objetivo específico 2: Comparar la inmunogenicidad de VRI y MVA-RG antes y después de ser sometidos al proceso de concentración por ultracentrifugación.

Objetivo específico 3: Comparar la inmunogenicidad entre el VRI concentrado por los procesos downstream desarrollados en este proyecto y en el citado en los antecedentes (ultrafiltración tangencial).

2. Marco de referencia (min. 2 páginas- máx. 5 páginas)

Describir en qué campo (temático, disciplinar) se inserta la investigación, indicando:

- estudios antecedentes (propios o no) sobre el tema, avances y áreas de discusión.
- marco teórico o encuadre de referencia de la investigación: con qué enfoque, conceptos, dimensiones o modelos se abordó el tema/problema.

La rabia es una enfermedad viral zoonótica, que produce una encefalitis aguda casi siempre mortal una vez que han aparecido los síntomas clínicos. En hasta el 99% de los casos humanos, el virus de la rabia es transmitido por perros domésticos. La rabia afecta a animales domésticos y salvajes de sangre caliente y habitualmente se propaga a las personas por inoculación de saliva a través de mordeduras. La rabia está presente en todos los continentes, excepto en la Antártida, aunque más del 95% de las muertes humanas se registran en Asia y África. Se estima un número de 59000 muertes anuales en todo el mundo. La rabia ocurre en dos formas epidemiológicamente diferentes: rabia urbana, con el perro como reservorio y transmisor; y la rabia silvestre, con diferentes especies de vida silvestre actuando como reservorios o transmisores². El agente causal de la enfermedad de la rabia es el VR, miembro del género Lyssavirus perteneciente a la familia Rhabdoviridae. El genoma del VR está constituido por una molécula de ARN de cadena simple, no segmentada, de polaridad negativa, de aproximadamente 12 Kilobases (Kb). Los genes N, P, M, G y L codifican para la nucleoproteína, la fosfoproteína, la proteína de matriz, la glicoproteína y la proteína Large, respectivamente. Todas estas son proteínas estructurales. Los cinco genes están separados por secuencias intergénicas no codificantes compuestas por un dinucleótido entre los genes N y P, dos pentanucleótidos entre los genes P y M y M y G y una secuencia de 423 nucleótidos (entre G y L), que son únicos para los lyssavirus. La proteína G es la única proteína viral glicosilada. Produce las proyecciones triméricas tipo espigas o peplómeros en la superficie de la envoltura viral. La molécula de G está glicosilada con oligosacáridos de cadena ramificada, que representan el 10-12% de la masa total de la proteína. Es responsable de la adsorción del virus a su receptor específico presente en la superficie de las células blanco³.

La proteína G es el principal antígeno viral contra el que están dirigidos los anticuerpos neutralizantes producidos por la respuesta inmune del huésped. Se estima que hay alrededor de 450 trímeros de glicoproteína G, distribuidos en la superficie exterior de cada virión. La vacunación es la herramienta principal para la prevención y control de la enfermedad. Sin la administración de vacuna, la progresión de la infección por VR lleva a la muerte del individuo. La primera generación de vacunas humanas utilizadas se basaba en la amplificación de cepas vacunales virales en tejido nervioso animal (cabra, conejo, ratón lactante, rata lactante) y una posterior inactivación por métodos físicos como la luz ultravioleta. Hay una tendencia mundial para discontinuar su producción y, por ende, su utilización dado que, por su naturaleza, existe registro de aparición de eventos adversos de síndromes tipo Guillain-Barré⁴. La

presencia de mielina presente en el tejido nervioso utilizado como sustrato, puede generar la aparición de anticuerpos contra la mielina propia de los individuos vacunados, con la consecuente respuesta autoinmune. Otra desventaja de estas vacunas es que se necesitaban un número muy alto de administraciones para lograr la inmunización (el último esquema aprobado abarcaba 10 dosis en el rango de 1 mes). Es por estos motivos que la OMS/OPS ha recomendado la utilización de vacunas de segunda generación que, en lugar del tejido nervioso, la amplificación viral se realiza sobre cultivos celulares y son inactivadas por métodos químicos. Este tipo de vacunas son las más ampliamente elegidas como tratamiento tanto pre como postexposición a nivel mundial.

Tienen un mejor perfil de seguridad y una mayor potencia que la generación anterior, con la consecuente disminución de dosis necesarias para obtener un título de anticuerpos protectores: 3 dosis en un período de un mes³. Si bien estas vacunas son efectivas, presentan ciertas desventajas relacionadas con su obtención y administración. Esto se debe a que su control requiere la utilización y el sacrificio de un gran número de animales, y la manipulación de grandes cantidades del patógeno en plantas productoras, con estrictas condiciones de bioseguridad. Esto implica que el personal debe estar específicamente entrenado y poseer inmunidad, con un título de anticuerpos protectores validado. Entre las desventajas inherentes a su aplicación podemos mencionar la aparición de reacciones adversas locales asociadas a los adyuvantes presentes en la formulación y la posibilidad de transmisión de patógenos no detectados (virus, bacterias, priones).

La necesidad de disponer a nivel mundial de vacunas antirrábicas seguras, efectivas y de bajo costo ha llevado al desarrollo y evaluación de nuevos inmunógenos desde hace aproximadamente tres décadas. En este sentido, existen numerosos informes en la bibliografía que describen la utilización de vectores virales (replicativos o no) para el clonado y la expresión de la glicoproteína G del RABV, principal antígeno responsable de inducir inmunidad celular y humoral protectora en el hospedador^{5,6}. De este modo, se obtuvieron virus recombinantes basados en adenovirus canino y humano, en herpesvirus canino, en virus rábico no replicativo, en virus de la pseudorrabia y en los siguientes pxvirus: vaccinia; virus vaccinia Ankara modificado (MVA); racoonpox, fowlpox y canarypox (CNPV). El desarrollo local de una MVA portador del gen de la glicoproteína G (MVA-RG) ha dado resultados satisfactorios en cuanto, la inmunización de ratones y otras especies con estos vectores confirió protección frente al desafío letal con VR^{7,8,9}.

En Argentina, el último caso de rabia humana data de 2008 en la provincia de Jujuy. La rabia canina está restringida a las provincias del norte, pero controlada, gracias a la intervención de los estados nacional, provincial y municipal con campañas de vacunación y de promoción y prevención de la salud. La rabia pareasiente abarca una mayor zona de influencia llegando ya al norte de la Patagonia, consecuencia de la migración y distribución de murciélagos hematófagos, el reservorio más importante del RABV en la actualidad en nuestro país¹⁰.

La vacunación es el método más efectivo para la profilaxis y el control de la enfermedad en zonas endémicas. Las vacunas antirrábicas convencionales están basadas en el virus rábico amplificado tejido

nervioso de animales lactantes (Fuenzalida-Palacios, 1º generación) o en cultivos celulares (2º generación) y, posteriormente, inactivado. Las vacunas de 3º generación son aquellas que se producen utilizando técnicas de ingeniería genética (a subunidades, vectorizadas, etc.).

Siguiendo recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud, en Argentina se discontinuó la producción de vacunas antirrábicas tradicionales tipo Fuenzalida-Palacios, producida por amplificación viral en tejido nervioso animal, para suplantarla por vacunas más seguras y eficaces. Actualmente, se utilizan vacunas de segunda generación; se aplican tanto a nivel humano como veterinario y son importadas o adquiridas a productores privados locales, en su gran mayoría¹¹.

El SVAR tiene vasta experiencia en el desarrollo de vacunas antirrábicas de segunda generación, basadas en amplificación viral sobre distintos tipos de cultivos celulares y su posterior inactivación¹². También realiza trabajos en cooperación con el IABIMO. Como resultado de esta interacción se desarrollaron vectores poxvirales recombinantes que expresan la glicoproteína del virus rábico: virus CNPV⁸ y MVA⁹. Nuestro grupo de investigación demostró que los virus recombinantes CNPV y MVA que expresan la glicoproteína del virus rábico inducen protección frente al desafío con dicho patógeno en el modelo murino. De esta forma, estos vectores virales son potenciales candidatos a vacunas antirrábicas de tercera generación.

Por otra parte, en el ámbito de los Proyectos de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico (PICYDT) convocatoria 2016, promovidos por la Universidad Nacional de Moreno (UNM), se llevó a cabo el proyecto denominado "Desarrollo de técnicas de downstream para la obtención a escala de vectores virales recombinantes" (ejecución 01/04/2018 y el 30/03/2019).

Los resultados obtenidos en este proyecto mostraron la satisfactoria concentración de virus rábico (RABV) inactivado (vacuna segunda generación) por el método de ultrafiltración tangencial y la consiguiente mejora del nivel de protección frente al agente infeccioso. Es importante destacar que el empleo de virus rábico inactivado permite trabajar en condiciones de bioseguridad menos rigurosas que las exigidas en estos mismos procesos cuando se manipula virus vivo patógeno.

Se establecieron parámetros que podrán ser extrapolados de manera sencilla para el procesamiento downstream de lotes de vacuna antirrábica de tercera generación.

Este proyecto, se define como continuación del PICYTD 2016 y está basado en el desarrollo de otra técnica downstream de concentración/purificación antigénica con el fin de comparar ambas metodologías y optimizar la plataforma productiva de vacunas virales tomadas como modelo.

3. Métodos y técnicas (min. 2 páginas- máx. 4 páginas)

Indicar el trabajo de campo, documental y/o de laboratorio realizado, la forma de recolección de datos y sus fuentes. Al respecto, describir los métodos, técnicas, instrumentos y materiales utilizados para indagar el problema de investigación. Explicitar las unidades de análisis, los criterios de selección de muestras o casos. Indicar asimismo las formas de procesamiento y análisis de los datos recolectados.

Se descongeló una ampolla del banco trabajo de células BHK-21 en frascos de cultivo de 25 cm². Al llegar a un 80% de confluencia, las células en monocapa fueron amplificadas por sucesivos repiques en

frascos de 75 y 150 cm² mediante tripsinización y crecimiento a 37°C con medio de cultivo MEM-D suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB).

Virus rábico cepa CVS-Malbrán fue amplificado sobre la biomasa celular producida y descrita en el párrafo anterior. Para ello, las monocapas celulares fueron lavadas 3 veces con medio sin suero para eliminar el SFB. Luego del último lavado, los frascos de cultivo quedaron en agitación a temperatura ambiente por 30 minutos. Una ampolla del stock viral almacenado a -70°C fue descongelado para proceder a diluirlo en medio sin suero, de forma tal de que el inóculo viral agregado a los frascos de cultivo de 150 cm² sea de 7 ml para una multiplicidad de infección de 0,3. El proceso de adsorción viral por reconocimiento del receptor de membrana de las células se realizó a temperatura ambiente por 90 minutos. Finalmente, se completó a volumen con medio suplementado con 2% de SFB y antibiótico Penicilina-Estreptomicina 1X y la infección se realizó en estufa a 33°C. Se realizaron cosechas sucesivas de sobrenadante a las 48 hs (COS I), y luego cada 72 hs (COS II, III y IV) hasta desprendimiento de la monocapa celular. Luego de cada cosecha, el medio de cultivo suplementado fue repuesto para sostener el mantenimiento celular. Las cosechas fueron conservadas a -70°C y a cada una se le realizó control de esterilidad y titulación por ensayo de neurovirulencia en ratón. El ensayo de esterilidad se realizó según Farmacopea, en caldos sabureaud, tripticasa-soja y tioglicolato, en un periodo de 14 días. El ensayo de titulación se realizó según método NIH *in vivo*. Se realizaron diluciones seriadas en base 10 de cada cosecha. Grupos de 10 ratones fueron inoculados intracerebralmente con 0,03 ml de cada dilución y fueron observados durante 14 días. En ese lapso, se registraron diariamente tanto presencia de sintomatología compatible con enfermedad de la rabia como la muerte de los animales. Al día 14 se analizaron los resultados de cada cosecha estadísticamente bajo el método de Reed-Muench⁴.

Se polearon aquellas cuyo título era mayor o igual que 10^{6,0} DL₅₀/ml y se inactivaron con betapropiolactona (1:4000) durante 48°C a 2-8 °C. Luego se agregó thimerosal como conservante en concentración final 1:10000. Finalmente se llevó a pH 7,2-7,4 con HCl 0,2N. Para eliminar detritus celulares, se procedió a clarificar la suspensión por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos, a una temperatura de 2-8 °C. El VRI obtenido fue controlado mediante ensayos de esterilidad, de igual forma a la descrita en el párrafo anterior y de inocuidad en modelo murino. Este último ensayo consiste en inocular 0,03 ml del producto por la vía intracerebral en 20 ratones cepa NIH de 14-16 g de peso. Los animales son observados durante un periodo de 21 días. Si en ese lapso, ningún animal presenta sintomatología compatible con enfermedad de la rabia o muere, el ensayo se considera satisfactorio y el producto, inocuo, es decir, el VR fue inactivado correctamente y no existen partículas virales viables. De llegar a aparecer algún ratón con sospecha de rabia, se procede a confirmar el diagnóstico de la muerte por técnicas moleculares, inmunofluorescencia directa en muestra de cerebro o inoculación en modelo murino de un homogenato del cerebro del animal muerto.

Por otro lado, otro lote de células BHK-21 crecidas en monocapa en las mismas condiciones que las descritas anteriormente, fueron infectadas con un stock viral de MVA-RG con una multiplicidad de infección de 0,1 y mantenidas con MEM-D suplementado con SFB al 2% y Penicilina-Streptomicina 1X.

La única diferencia en comparación al procedimiento realizado con VR y detallado anteriormente, consistió en que la infección se realizó a 37 °C. Se cosecharon los sobrenadantes a los 5 días luego de evidenciar al microscopio la presencia de efecto citopático. Cada frasco de cultivo fue sometido a 3 ciclos de congelamiento a -70 °C y descongelamiento y, luego, fueron sonicadas, a fin de liberar el virus intracelular. Se polearon las cosechas de cada frasco de cultivo y se realizó una clarificación por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos, a una temperatura de 2-8 °C. Al producto final se le realizó un control de esterilidad, según Farmacopea, como fue descrito en párrafos anteriores. La cuantificación de MVA-RG fue realizada por el método de titulación (unidades formadoras de placas de lisis) en cultivo primario de células fibroblásticas de embrión de pollo. El MVA-RG tiene insertado en su genoma en el gen de la enzima marcadora GUS (beta-glucuronidasa). Esta enzima, en presencia del sustrato X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid), produce una reacción colorimétrica que evidencia la presencia de MVA-RG. Es una titulación en medio semisólido de diluciones seriadas en base 10 del stock viral y se informa como unidades formadoras de placa (UFP)/mL.

Tanto el VRI como el MVA-RG fueron sometidos a un método de concentración y purificación por ultracentrifugación. El equipamiento utilizado fue una centrífuga marca Coulter Beckman Avanti J-26 XP. Dada la disponibilidad de un único rotor (de ángulo fijo JA-25.50) y sus tubos correspondientes (6 tubos por ciclo de 42 ml de capacidad) se concentraron a 33.000 G durante 3 hs a 5°C. Los pellets de cada tubo fueron resuspendidos en 2 ml PBS 1X pH 7,4 y pooleados. Se cuantificaron las proteínas por método de Bradford. Se realizó un SDS-Page para control del proceso. Se definieron como productos finales de este proyecto el VRI y el MVA-RG, concentrados y purificados (VRIcp y MVA-RGcp, respectivamente).

Como análisis final del proceso, se realizó un ensayo de potencia relativa basado en el método NIH. Grupos de 10 ratones cepa NIH entre 14 y 16 g de peso fueron inoculados por la vía intraperitoneal con 0,5 ml de producto (VRI y VRIcp sin diluir y diluidos 1/5), en un esquema de 2 dosis separadas con un intervalo de 7 días. A los 7 días de la segunda dosis, todos los ratones fueron desafiados intracerebralmente con 0,03 ml de VR cepa desafío (stock viral producido en cerebro de ratón de título $10^{7,0} \text{DL}_{50}/\text{ml}$) y fueron observados durante 14 días. En ese lapso, se registraron diariamente tanto presencia de sintomatología compatible con enfermedad de la rabia como la muerte de los animales. Al día 14 se analizaron los datos registrados. En paralelo se realizó una titulación del virus desafío, de igual forma a la descrita para cosechas de VR, para validar el ensayo. Se deben inocular 12-50 $\text{DL}_{50}/\text{ratón}$, en el volumen de administración de 0,03 ml, para que sea considerado aceptado.

Para cumplir con el objetivo final del proyecto, se procedió a realizar una potencia según método NIH entre el stock producido en este proyecto (bulk) concentrado por la metodología de ultracentrifugación definida y por un proceso de ultrafiltración tangencial (UFT) descrito en el PICyDT 2016 "Desarrollo de técnicas de downstream para la obtención a escala de vectores virales recombinantes". El ensayo de potencia para evaluar la eficacia de una vacuna refiere a una vacuna de referencia (provista por SENASA) que tiene un valor asignado de 1 UI/ml. Tanto las vacunas a evaluar como la referencia fueron diluidas en base 5. Grupos de 10 ratones cepa NIH entre 14 y 16 g de peso fueron inoculados por la vía

intraperitoneal con 0,5 ml de cada dilución de cada producto (VRI y VRIcp sin diluir y diluidos 1/5), en un esquema de 2 dosis separadas con un intervalo de 7 días. A los 7 días de la segunda dosis, todos los ratones fueron desafiados intracerebralmente con 0,03 ml de VR cepa desafío (stock viral producido en cerebro de ratón de título $10^{7.0} \text{DL}_{50}/\text{ml}$) y fueron observados durante 14 días. En ese lapso, se registraron diariamente tanto presencia de sintomatología compatible con enfermedad de la rabia como la muerte de los animales. Al día 14 se analizaron los datos registrados. En paralelo se realizó una titulación del virus desafío, de igual forma a la descrita anteriormente, para validar el ensayo. Se deben inocular 12-50 $\text{DL}_{50}/\text{ratón}$, en el volumen de administración de 0,03 ml, para que sea considerado aceptado. El análisis estadístico se basó en el método de Reed y Muench, con un análisis comparativo de las diluciones de vacuna que protegen al 50% de los animales inmunizados (DP_{50}).

4. Resultados y discusión (min. 5 páginas- máx. 15 páginas)

Desarrollar los resultados, en relación a los objetivos del proyecto, especificando (de ser posible) los siguientes aspectos:

- nuevos conocimientos obtenidos sobre los casos o unidades bajo estudio.
- avances en materia de conocimiento científico sobre el temabajo estudio, formulación de enfoques originales e innovadores (modelos, conceptos, etc.).
- Contribuciones para la resolución de problemas específicos y/o formulación de herramientas de intervención, diseño o mejora de productos y procesos.

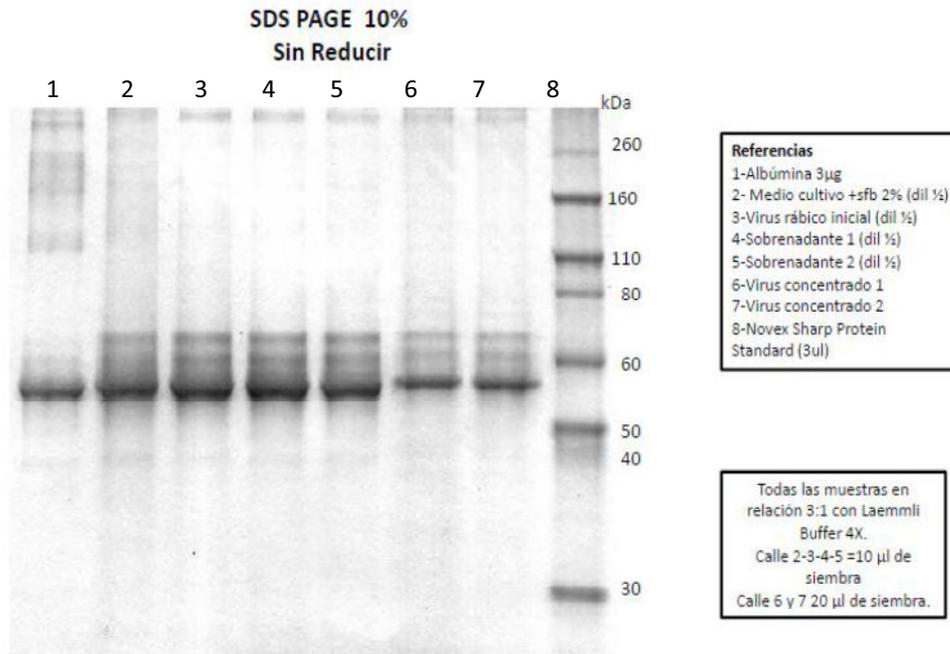
Por último, desarrollar las conclusiones y reflexiones finales a las que se llegó luego de la investigación, en relación a los interrogantes y objetivos planteados.

Producción de stock de VRI: No se observó crecimiento bacteriano ni fúngico en ninguna cosecha de virus rábico, resultando estériles. La COS I fue descartada por tener un título inferior a $10^{6.0} \text{DL}_{50}/\text{ml}$. Las cosechas II, III y IV fueron pooleadas por tener títulos superiores al valor de corte. El título del pool en muestra tomada previa a la inactivación fue de $10^{6.8} \text{DL}_{50}/\text{ml}$. El ensayo de esterilidad al VRI clarificado resultó satisfactorio y no produjo enfermedad en los ratones que participaron del ensayo de inocuidad. El volumen final de producto obtenido fue de alrededor de 500 ml.

Producción de stock de MVA-RG: No se observó crecimiento bacteriano ni fúngico en el pool de cosechas clarificado, resultando estéril. La titulación dio como resultado un valor de $10^{5.8} \text{UFP}/\text{ml}$. El volumen final de producto obtenido fue de alrededor de 250 ml.

Luego de la ultracentrifugación de cada suspensión viral, la cuantificación de proteínas resultó 3,0 mg/ml para el VRI sin concentrar y 0,08 mg/ml luego de la ultra. Para el MVA-RG, los resultados fueron 3,6 mg/ml y no detectable, respectivamente. Para confirmar la pérdida de proteínas en el procedimiento referido al MVA-RG, el producto obtenido luego de la ultracentrifugación, se tituló por UFP como fue descripto, resultando $< 10^{2.0} \text{UFP}/\text{ml}$.

En el SDS-Page realizado a las muestras correspondientes a VRI, acorde a la medición de proteínas, se visualiza una purificación evidenciada por la presencia de la banda de la glicoproteína del RABV en la banda de aproximadamente 60 Kd. También se puede observar la presencia de la albúmina del SFB del medio de cultivo en la banda de 60 Kd en la banda de los sobrenadantes de la ultracentrifugación.



El ensayo de potencia fue validado con 32 DL₅₀ de virus desafío inoculadas a cada ratón. El 100% (10/10) de los ratones inmunizados tanto con VRIcp sin diluir y diluido 1/5 no mostraron sintomatología compatible con rabia y sobrevivieron al ensayo. El 90% (9/10) de los ratones inmunizados con VRI sin diluir y el 70% (7/10) de los ratones inmunizados con VRI diluido 1/5 sobrevivieron al ensayo, sin evidenciar manifestaciones compatibles con rabia.

La potencia del bulk resultó 1,1 UI/ml, mientras que luego de ser procesado por ultracentrifugación y UFT arrojó valores de 1,6 y 2,1 UI/ml, respectivamente, ensayo validado por el resultado de 32 DL₅₀ de virus desafío inoculadas a cada ratón.

El stock de VRI pudo producirse sin inconvenientes, resultando un producto estéril y, en base a la experiencia previa del grupo de trabajo, el título viral obtenido es acorde a los resultados que se obtienen de rutina en el SVAR para la infección de células en monocapa. El stock de MVA-RG producido, en cambio, tuvo un título por debajo de lo esperado, ya que para que en los ensayos in vivo se observe una buena eficacia vacunal, el título debe ser alrededor de 10^{7.0} UFP/ml. A pesar de ello, se procedió a realizar la ultracentrifugación para ambos stocks. Cuando se analizan los resultados obtenidos tanto por cuantificación proteica como por SDS-Page para el VRI, se puede ver cómo la concentración proteica disminuye en función de la purificación ya que la fracción mayoritaria corresponde a albúmina presente en el medio de cultivo suplementado en el que se produjo la infección. La albúmina podemos ver que queda en el sobrenadante, mientras que partículas de VRI son pelleteadas. Según los resultados obtenidos en la cuantificación de proteínas se puede suponer que el MVA-RG no pudo ser pelleteado en estas condiciones. Esto correlaciona con la titulación de una alícuota del pellet, que arroja un valor inferior a la

sensibilidad del método. Por ese motivo, no se realizó el SDS-Page correspondiente al MVA-RG ya que no se había cumplido el objetivo de su concentración y purificación.

A partir de este punto, lamentablemente, se decidió trabajar sólo con el VRI en los ensayos in vivo, para minimizar la utilización de ratones, dados los resultados obtenidos in vitro con el MVA-RG.

En la potencia comparativa, se observa que que % de sobrevivientes en los animales inmunizados con el VRIcp diluido 1/5 y sin diluir es del 100%, comparado con la inmunización con VRI que produce 70 y 90%, respectivamente. Este resultado es esperable, ya que vimos por técnicas in vitro que se había producido una concentración del VRI, con lo cual el resultado correlaciona de alguna manera. Cabe destacar que las técnicas in vivo son poco reproducibles ya que dependen de muchas variables además de la calidad del inmunógeno como pueden ser el estado de salud de los ratones, quien es el encargado de realizar el ensayo, la temperatura, etc.

Finalmente, se realizó la potencia entre el stock de VRI sometidos a los procesos de UFT, por un lado, y ultracentrifugación por otro. Luego del procesamiento del bulk por ambos métodos, se observa un aumento de la potencia (Bulk 1,1 UI/ml; UFT 2,1 UFT/ml; UC 1,6/ml). El aumento es mayor en el producto ultrafiltrado, algo esperable en función del tipo de metodología propuesta, ya que los procesos de ultracentrifugación, más allá de permitir la purificación del VRI, conlleva a la pérdida de masa antigénica.

En cambio, la UFT permite eliminar medio y algunas impurezas, pero tiene poca pérdida de VRI.

Ambos métodos cumplen con el objetivo de concentrar y purificar el VRI. Para definir cuál es mejor, dependerá del volumen a procesar ya que la UFT permite trabajar con volúmenes mayores. A nivel productivo, es una cuestión clave para decidir qué proceso utilizar.

5. Nuevos interrogantes y líneas de investigación a futuro

Consignar si la investigación hizo surgir nuevos interrogantes o si emergieron potenciales líneas de investigación a desarrollarse en el futuro a partir de los hallazgos.

Este proyecto, como continuación de la optimización de procesos downstream de concentración y purificación específica de VRI, cumplió con los objetivos propuestos. Luego del análisis de los resultados y del grado de calidad requerido por la autoridad regulatoria para la producción de una vacuna de uso humano, podemos plantear que estas dos metodologías en serie, podrían ofrecer un producto de alta calidad y eficacia. Un paso de UFT en primera instancia, permitiría una concentración y reducción del volumen de producto, y luego, un paso de ultracentrifugación, lograría una purificación del VRI, con la consecuente eliminación de impurezas, para obtener un producto de alta calidad.

El trabajo con MVA-RG debe continuar ya que si bien no se obtuvieron los resultados esperados, sigue siendo un producto con mucho potencial como candidato vacunal dado su perfil de seguridad.

6. Bibliografía (min. 2 página- máx. 4 páginas)

Consignar los textos y fuentes utilizados en la redacción de los campos anteriores.

1. Rabies (Infection with rabies virus and other lissaviruses). Chapter 2.1.17, OIE Terrestrial Manual 2018.
2. Oubiñas J Carballal G Virología Médica
3. Jackson A. Rabies - 3rd Edition

4. Kaplan MM, Koprowski H, eds Laboratory techniques in rabies, 3rd ed, 1973 Geneva WHO1973 WHO Monograph Series No 23 299-302.
5. Gilbert SC. 2013. Clinical development of modified vaccinia virus ankara vaccines. Vaccine 31: 4241-4246.
6. Gómez CE, Nájera JL, Krupa M, Esteban M. 2008. The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. Curr Gene Ther. 8(2): 97-120.
7. Ferrer MF, Zanetti FA, Calamante G. 2007. Diseño y construcción de vectores de transferencia para la obtención de virus vaccinia Ankara modificado (MVA) recombinantes. Rev. Argent. Microbiol. 39: 138-142.
8. Zanetti F, Rudak L, Miccuci M, Conte Grand D, Luque A, Russo S, Taboga O, Perez O, Calamante G. 2012. Obtención y evaluación preliminar de un virus canarypox recombinante como candidato a vacuna antirrábica. Rev. Argent. Microbiol. 44: 75-84.
9. Garanzini D, Del Médico Zajac MP, Micucci M, Perez O, Calamante G. 2018. Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara expressing rabies glycoprotein induces protection against challenge in mice. XXIX Conferencia Internacional Rabies In The Americas (RITA-2018). CABA.
10. Manual de procedimientos en Rabia pasesiante. SENASA, 2011.
11. Guía para la prevención, vigilancia y control de la rabia en Argentina. 2018. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación.
12. Javier De Filippo. Producción pública de Vacuna antirrábica se segunda generación sobre microcarriers. Tesis de maestría, ANLIS-UNSAM. 2008

Parte II

Dimensiones de cumplimiento del Plan de Trabajo

1. Balance de cumplimiento del Plan de Trabajo

Describir el grado de cumplimiento de las actividades planeadas. Dificultades encontradas y qué reorientaciones o soluciones se adoptaron para desarrollar el plan de trabajo. Actividades no planificadas.

Actividades efectivamente realizadas: Por el contexto pandémico, se demoró la producción de los virus.

Tanto el MVA-RG como el VRI fueron producidos satisfactoriamente. Los procesos de ultracentrifugación requirieron de una logística especial, que dependía de la disponibilidad de las instalaciones del BSLIII donde estaba ubicado el equipamiento necesario. Dado la utilización del BSLIII para tareas relacionadas con la función de la ANLIS en lo que respecta al trabajo de diagnóstico y vigilancia del SARS-CoV-2, la autorización para el ingreso se retrasó, pero pudieron ser realizados.

Actividades no previstas: El VRI obtenido, dado su grado de pureza y concentración, fue utilizado en el desarrollo de un enzoinmunoensayo tipo ELISA para la detección de anticuerpos antirrábicos.

2. Consolidación del equipo de investigación