Desarrollo de un método para producir vacuna antirrábica en cultivo de células Vero

Rabies vaccine development in Vero cell culture

María Rosario Tubio1, Santiago Chiappini1, Analía López Díaz1, Analía De Nichilo1, Andrés Hernando Insúa1, Carlos Palacios1, Oscar P. Larghi y Alejandro Daniel. Parola1,2

1: Fundación Pablo Cassará, Saladillo 2452, Buenos Aires, Argentina; 2: Instituto de Ciencias y Tecnología Dr. César Milstein – CONICET. Saladillo 2468, Buenos Aires, Argentina.

aparola@fundacioncassara.com.ar

**Palabras Claves:** Rabia, vacuna antirrábica, células Vero

**INTRODUCCION**

La rabia es una enfermedad zoonótica aguda del sistema nervioso central, causada por virus del género *Lyssavirus*, que en es letal en casi el 100 % de los casos, luego de la aparición de signos clínicos. Este virus se encuentra difundido a nivel mundial, e infecta a mamíferos tanto domésticos como salvajes, incluyendo al ser humano. Anualmente más de 15 millones de personas reciben tratamiento con vacunas antirrábicas, sin embargo, 55 000 individuos mueren en el mundo por no recibir el tratamiento adecuado (1). Las necesidades de esta vacuna en Argentina son atendidas, en parte, por el Ministerio de Salud de la Nación. Sin embargo, en nuestro país aún se producen 140 000 dosis anuales de vacunas a partir de cerebro de ratón lactante y rata lactante, a pesar de que la OMS las desaconseja desde 1984. En Latinoamérica existen empresas de productos veterinarios que producen vacunas antirrábicas, pero ninguna de ellas ha abordado la producción de vacuna antirrábica para humanos. La única experiencia conocida es la del instituto Butanatán en Brasil cuya produción cubre necesidades internas. El objetivo de este trabajo fue producir vacuna antirrábica para humanos empleando virus cultivado en células Vero purificado por métodos cromatográficos e inactivado.

**MATERIALES Y METODOS**

El banco maestro de células se elaboró con la línea celular Vero provista por el American Type Cell Collection (ATCC-CCL81), y se controló de acuerdo con las recomendaciones de la Farmacopea Europea, de la OMS y las guías ICH. El banco viral se elaboró con la cepa PV-2061 y su título se estableció en células Vero (2). Para los cultivos celulares se empleó medio base M199 (Life Technologies), suplementado con L-glutamina 4 mM, gentamicina 50 ug/ml, fungizona 2.5 ug/ml y suero fetal bovino 10% (SFB; Internegocios). Para la infección, se utilizó medio base M199 con HEPES 25 mM y albúmina sérica bovina (ASB) 0.2%, sin SFB. Las células se cultivaron en botellas de 25 a 870 cm2 (Greiner Bio One) a 37 ˚C con 5% de CO2. Una vez alcanzado una confluencia de 70-90% las células se tripsinizaron y transfirieron a frascos *spinners* con 3-6 g/l de microesferas (Cytodex 1, General Electric), a una densidad inicial de 2.0 a 2.5 × 105 cel/ml. Cuando se alcanzó una densidad de 1 a 2 x106 cel/ml, se extrajo el medio de cultivo y las microesferas se lavaron tres veces con PBS. Las células se infectaron con multiplicidades de infección (MOI) de 0.1 a 1 dosis infectivas 50 por ml (DI50/ml), en medio de infección a 34 ˚C siguiendo una metodología de perfusión discontinua. Las cosechas se clarificaron por filtros de 0.45 μm (Millipore), se diafiltraron y concentraron por membranas de filtración tangencial (MFT). El concentrado se purificó por cromatografía de intercambio catiónico, seguido de cromatografía de exclusión molecular, luego se inactivó con beta propiolactona (1:3 500), se diafiltró por MFT de 10 kDa (Pellicon-Millipore) y finalmente se filtró por 0.22 μm (Millipore). Las cosechas, las etapas de purificación y el producto final se analizaron según correspondiera: glicoproteína viral (ELISA), ASB mediante ELISA (Bethyl Laboratories, Inc.), ADN residual (Qubit 2, Life Technologies), esterilidad, concentración de proteínas (Bradford) e integridad y pureza por SDS PAGE y *Western Blot*. El título y la presencia de virus infectivo residual se determinaron por Inmunofluoresencia.

**RESULTADOS**

La identidad de la línea celular Vero se corroboró por amplificación y secuenciación de un fragmento específico de DNA mitocondrial, de 301 pb (3). El control del banco aseguró la ausencia de bacterias, micoplasmas, hongos y virus adventicios. La identidad de las cepas virales se confirmó por secuenciación de la Glicoproteína viral. El título del banco de virus de la cepa PV fue de 3.3 x 109 DI50/ml. Las densidades celulares alcanzadas en frascos spinners en condiciones de perfusión discontinua fueron de 2 x106 cél./ml. El título máximo de las cosechas fue de 3.3 x 109 DI50/ml y se alcanzaron valores máximos de glicoproteína de 19 UI/ml. Se cosechó el virus hasta los 16 días de cultivo, siendo el rendimiento volumétrico de 53 UI de glicoproteína por ml de volumen inicial de trabajo. Los sistemas cromatográficos ensayados permitieron purificar el virus rábico con niveles de contaminantes menores con lo establecido por la Farmacopea Británica: ASB menor a 50 ng/dosis y ADN menor a 10 ng/dosis.

**DISCUSIÓN**

En el presente trabajo se desarrollaron métodos para la optimización de cultivos, infecciones, y controles de calidad de cada proceso, que permitieron producir altas cantidades de antígeno viral. La caracterización del banco de células aseguró que el mismo fuera apto para la producción de vacunas de acuerdo con estrictos requisitos regulatorios. El recambio de medio de cultivo permitió alcanzar densidades celulares altas. Las condiciones de infección resultaron en cinéticas de producción viral lentas que prolongaron la cosecha de virus durante más tiempo que los reportados por otros autores (4). El método de purificación basado en la combinación de diafiltración seguida de cromatografías de intercambio iónico y exclusión molecular no se ha reportado. La estrategia empleada permitió concentrar antígeno viral y mantener un nivel de impurezas por debajo de lo establecido en la Farmacopea Europea. Los métodos presentados aquí permiten la producción efectiva de vacuna antirrábica para humanos, de acuerdo con estándares internacionales.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Organización Mundial de la Salud. OMS | Rabia [Internet]. Nota descriptiva N° 99. World Health Organization; 2013 [cited 2014 Mar 25]. Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/es/
2. Smith JS, Yager PA, Baer GM. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. Bull World Health Organ. 1973 May;48(5):535–41.
3. Ono K, Satoh M, Yoshida T, Ozawa Y, Kohara A, Takeuchi M, et al. Species identification of animal cells by nested PCR targeted to mitochondrial DNA. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2007;43(5-6):168–75.
4. Rourou S, Van Der Ark A, Van Der Velden T. A microcarrier cell culture process for propagating rabies virus in Vero cells grown in a stirred bioreactor under fully animal component free conditions. 2007;25:3879–89.

**Palabras Claves:** Rabia, vacuna antirrábica, células Vero