

UNA VACUNA UNIVERSAL DE NUEVA GENERACIÓN CONTRA EL VIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO

Andrade, S. (1), Cid, R. (2), Infante, J.J. (1, 2)

(1) Máster Biotecnología Industrial, Ambiental y Alimentaria, Universidad Pablo de Olavide. Ctra. Utrera Km 1. 41013 Sevilla, España

(2) ADL Bionatur Solutions, S.A. Av. Desarrollo Tecnológico 11. 11591 Jerez de la Fra., España

El síndrome respiratorio-reproductivo porcino (PRRS) es devastador para la industria porcina mundial, ya que causa unas pérdidas económicas de más de 664 millones de dólares al año sólo en los EEUU y en la UE. PRRS lo causa un virus envuelto de cadena simple de ARN (PRRSV) de la familia Arteriviridae. El tratamiento y la cuarentena no son opciones viables para la industria porcina, por lo que las vacunas profilácticas son la mejor alternativa. Las vacunas comerciales actuales están fallando en proteger a los lechones. El uso de vacunas vivas atenuadas necesarias para una presentación antigénica completa preserva los mecanismos de evasión inmune del virus. Por otra parte, la alta divergencia entre los serotipos del virus evita la reactividad cruzada en la respuesta inmune entre cepas virales. Este proyecto tiene como objetivo desarrollar una nueva vacuna contra PRRSV capaz de crear una respuesta inmune completa en lechones que neutralice la infección en una fase temprana contra cualquier serotipo viral. Hemos producido un baculovirus recombinante para la acumulación del ingrediente activo de la vacuna en células de insecto, en forma de cuerpos proteicos estables formados usando la Tecnología Zera®. Los test de expresión en células de insecto confirmaron su viabilidad, obteniendo 13 mg/L de antígeno purificado. Los test preliminares de inmunogenicidad en modelo murino mostraron que la vacuna es inmunogénica y que podría ser fabricada formulando el producto final en formato liofilizado. Hemos llevado a cabo lotes experimentales de la vacuna y diseñamos una prueba experimental en lechones para probar la eficacia de nuestra vacuna comparándola con vacunas comerciales.

Figura 1: Estructura del candidato vacunal contra el virus PRRSV basado en la proteína recombinante BNT033.

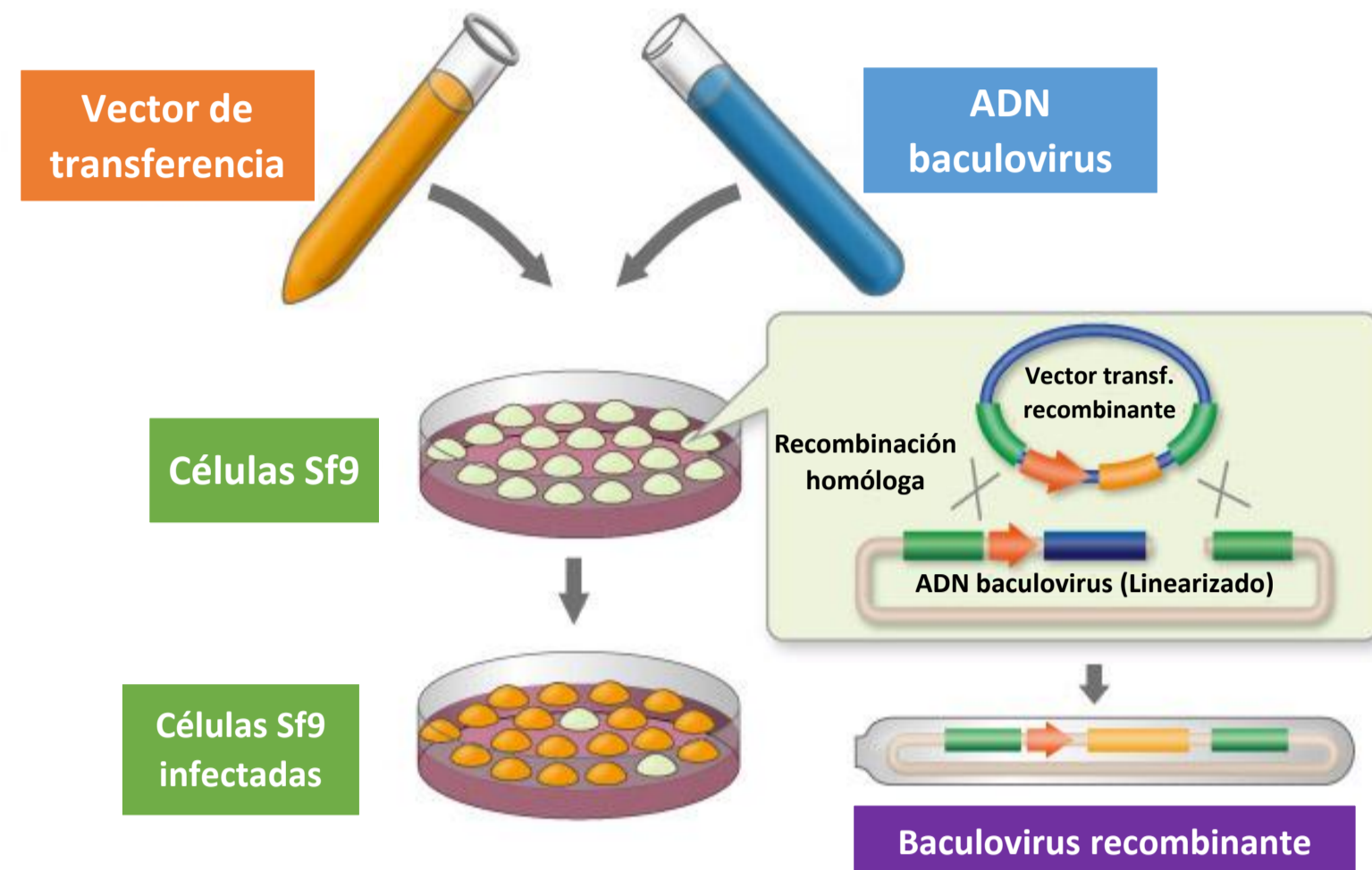
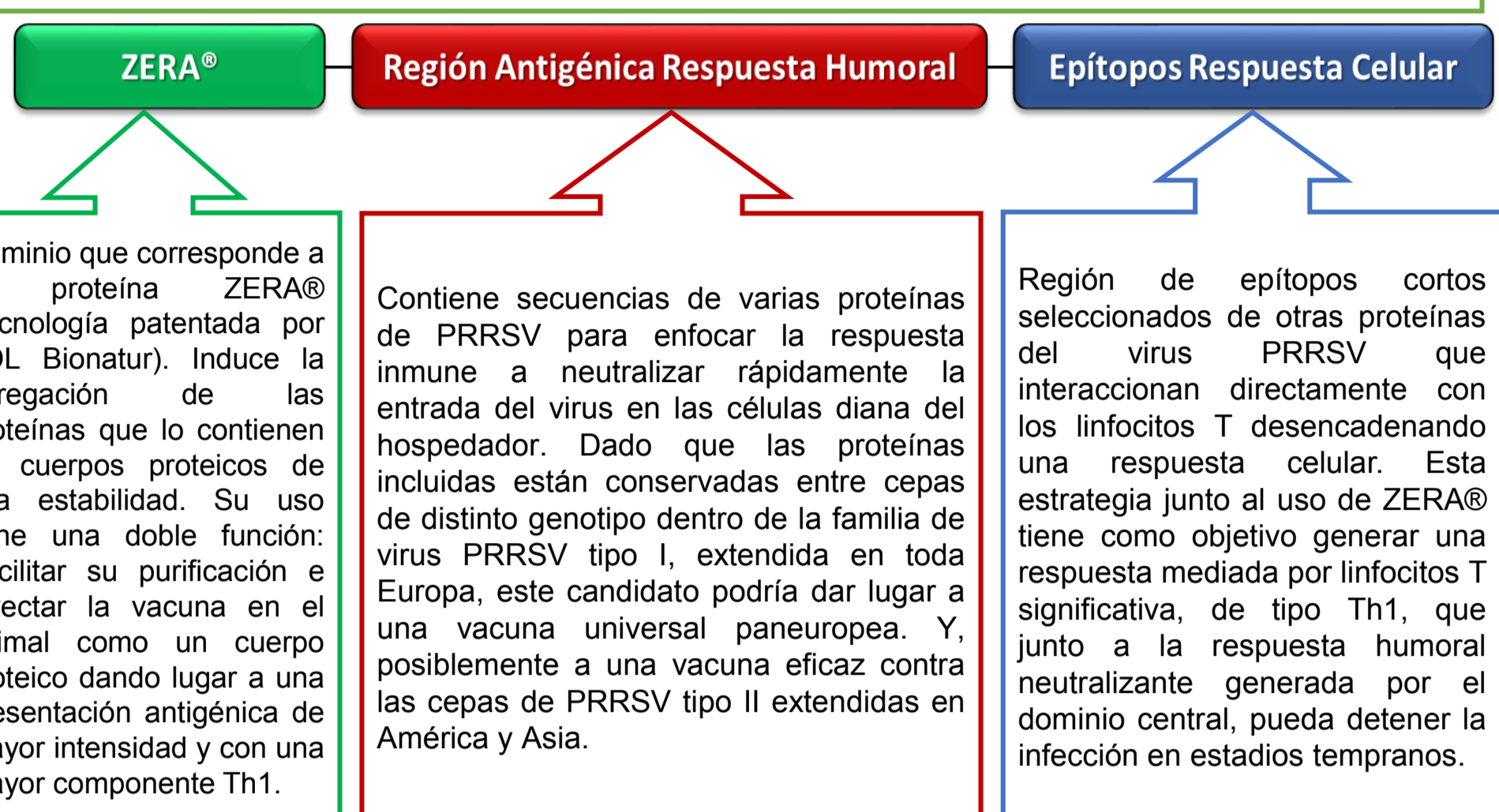


Figura 2: Producción de baculovirus recombinantes (stock P0) con el constructo de expresión de la proteína de interés BNT033. El proceso parte de dos tipos de secuencias génicas: El vector de transferencia y el ADN con el genoma completo del baculovirus AcMNPV, previamente linearizado por digestión con endonucleasas que inactiva el locus de la poliedrina y un gen esencial adyacente. En el vector de transferencia se encuentra el constructo de expresión BNT033, con el gen de interés aguas abajo del promotor poliedrina de AcMNPV. Se encuentra flanqueado por dos regiones homólogas al ADN baculovirico para su posterior recombinación, incluyendo una copia intacta del gen esencial previamente inactivado. Ambos tipos de ADN se mezclaron con lipofectina y se transfirieron células de ovario del lepidóptero *S. frugiperda*. Las células mediaron la recombinación homóloga dando como resultado viriones activos, obteniendo de esta manera el stock P0 tras 5 días de cultivo.

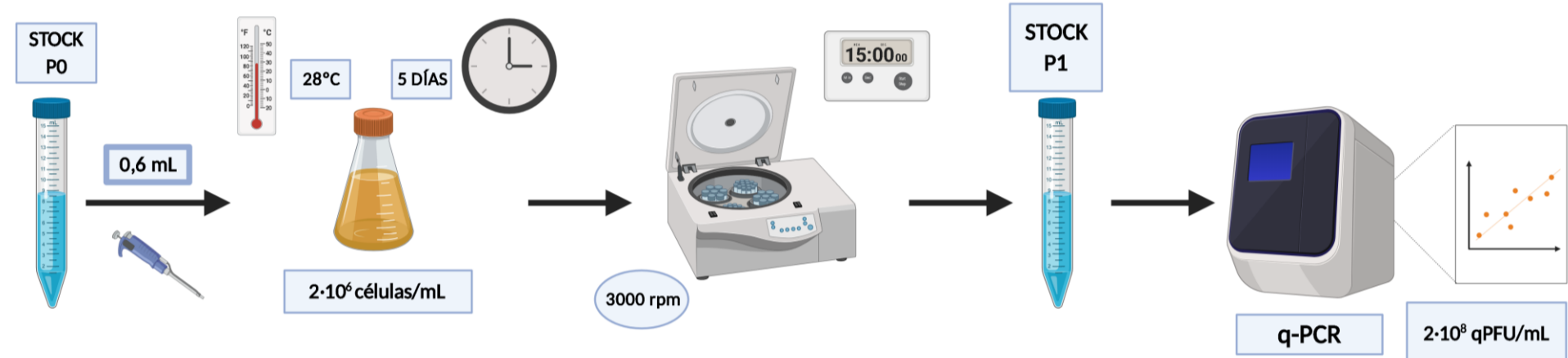


Figura 3: Amplificación del stock de baculovirus para obtener el banco viral de trabajo (Working Viral Bank o stock P1). El stock P0 fue sometido a control de calidad, consistente en analizar por PCR si contenían baculovirus sin inserto y titulación mediante PCR cuantitativa (qPCR). Tras conocer la titulación se usaron 0,6 mL de stock P0 para infectar 100mL de células Sf9 a multiplicidad de infección (MOI) 0,1, con el objeto de amplificar el volumen y la titulación del stock viral. El cultivo se mantuvo en agitación a 28°C durante 5 días. Tras eliminar las células por centrifugación suave obtuvimos el stock P1 o WVB. De nuevo se sometió a control de calidad para descartar la presencia de virus sin el constructo de expresión y comprobar que la titulación es superior a 10⁸ qPFU/mL. Tras el éxito en el control, se aprobó el WVB pendiente de realizar un test de expresión para comprobar que la proteína BNT033 se acumula en células de insecto infectadas. El test de expresión se utilizará de manera estandarizada como control de calidad de manera periódica del WVB.

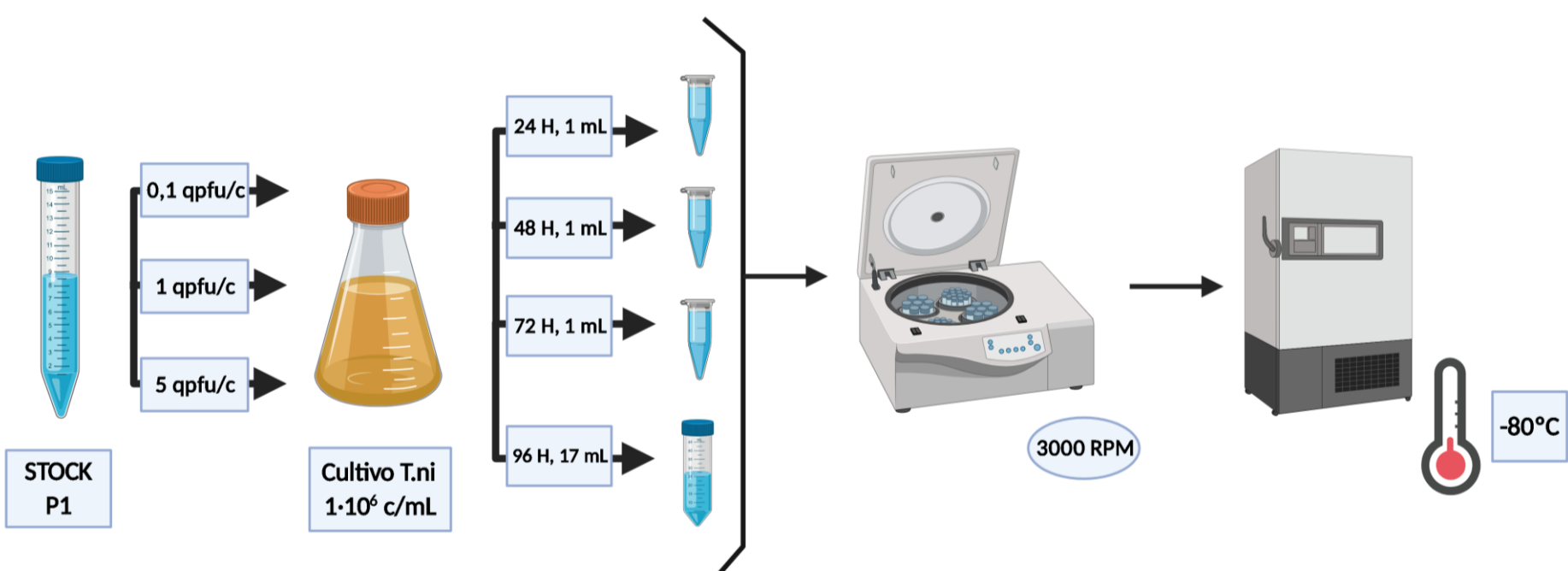


Figura 4: Prueba de concepto de la de expresión de BNT033 en células de insecto y selección de condiciones. A partir del stock P1 se infectaron tres cultivos de células de la línea High Five® de embrión del lepidóptero *T. ni*, cada cultivo a una MOI diferente (0,1, 1 y 5 qpfu/célula). Se tomaron muestras a diferentes tiempos: 24, 48 y 72 horas tras infección. El resto de los cultivos se mantuvieron hasta 96 horas después de la infección. De todas las muestras se separaron las células y el sobrenadante a 3000 rpm, 15 min a 4°C, conservándose las muestras congeladas a -80°C hasta el análisis (Figura 5).

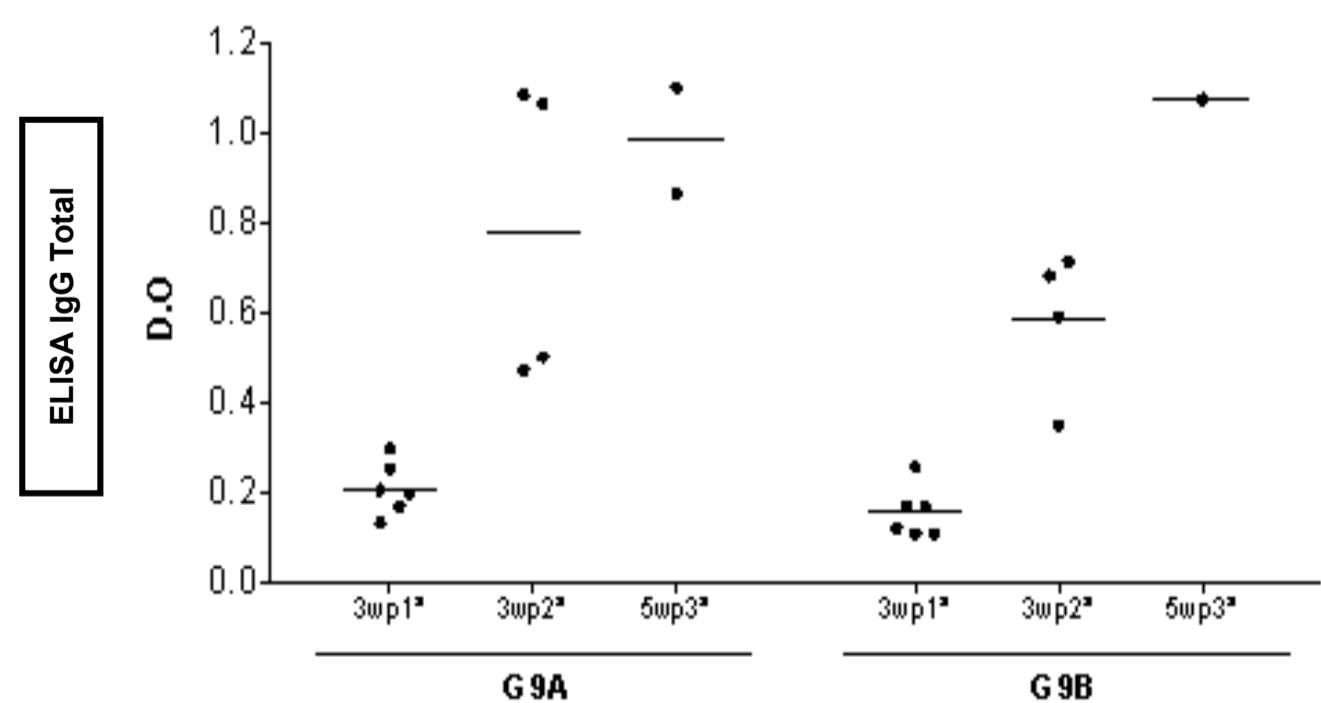


Figura 6: Prueba de concepto de inmunogenicidad en modelo murino y de viabilidad de liofilización para la formulación galénica final. Muestras del principio activo del candidato vacunal como suspensión líquida en PBS y liofilizada se enviaron al CSIC (Granada) para la inmunización de ratones C57bl/6 transgénicos con receptor del MHC-I humanizado. Se inmunizaron vía intra muscular con una dosis de 5 mcg de antígeno, 3 veces cada 3 semanas. En la gráfica se representan los resultados del análisis de seroconversión de los ratones mediante medida de IgG sérica total en un ensayo ELISA de reconocimiento del propio antígeno vacunal. Ambos tipos de formulaciones, líquida (G9A) y liofilizada (G9B) dieron lugar a seroconversión con la misma intensidad, abriendo la posibilidad de conservar liofilizado al candidato vacunal, una característica ventajosa que facilita su transporte, sin necesidad de respetar la cadena de frío.

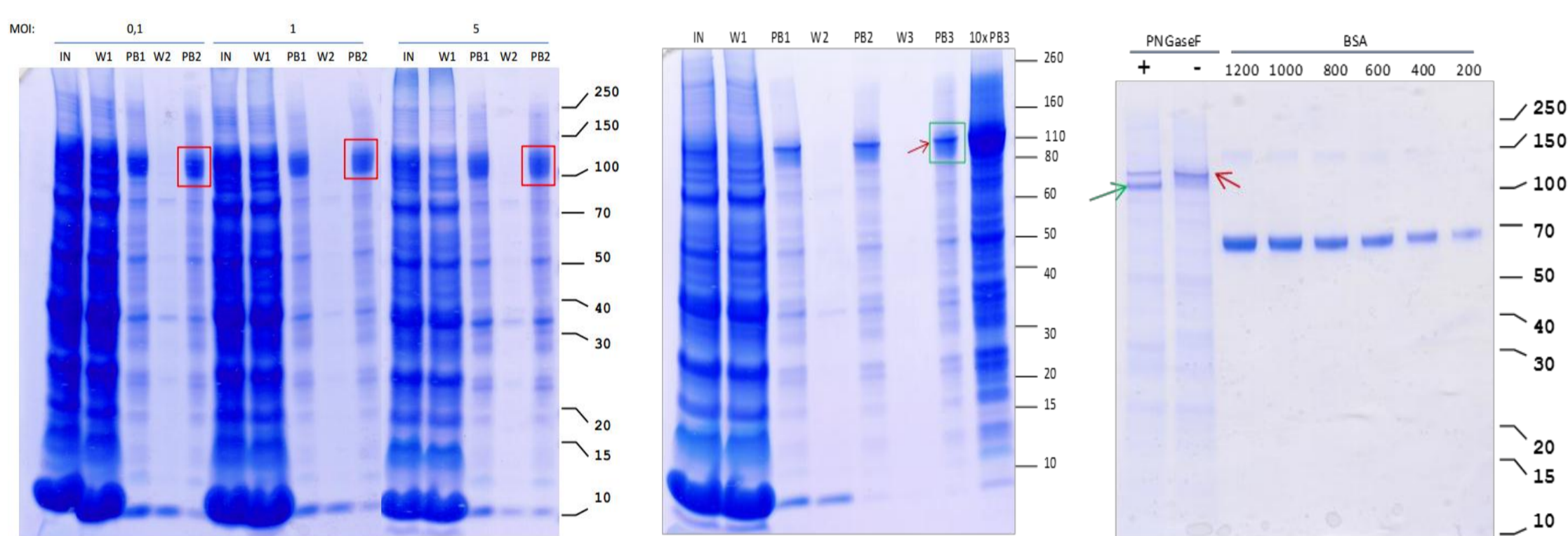


Figura 5: Análisis de la expresión de BNT033 en células HighFive®. Extractos crudos se analizaron mediante SDS-PAGE y comprobamos que la proteína de interés se queda retenida en las células (datos no mostrados). La acumulación máxima BNT033 fue a las 96 horas post-infección (hpi). En el gel de la izquierda aparecen las muestras obtenidas a 96 hpi a diferentes MOIs, usadas para purificar con un protocolo desarrollado para cuerpos proteicos (IN), el descarte del primer lavado (W1) y las muestras de BNT033 tras el mismo (PB1), el descarte del segundo lavado (W2) y las muestras de BNT033 tras el mismo. El polipéptido de interés tiene un tamaño esperado de aproximadamente 100 kDa. La banda difusa correspondiente se muestra en recuadros rojos. Es una banda difusa porque BNT033 es un producto altamente glicosilado. La cantidad de proteína se estimó mediante análisis de densidad de la banda con la ayuda de una recta patrón de BSA. No existían diferencias significativas entre muestras obtenidas a las diferentes MOIs. El rendimiento estimado de esta forma fue de 28 mg BNT033/ L de cultivo. En el gel central aparece el perfil proteico de las muestras obtenidas a partir de 1L de cultivo (96 hpi, MOI=1). Para estimar mejor la pureza de BNT033, sometimos la muestra purificada (PB3) a tratamiento con PNGasa F para eliminar las N-glicosilaciones. En el gel de la derecha se muestra el perfil proteico de la muestra antes y después del tratamiento. La banda de interés se resuelve en 2 bandas tras el tratamiento. Una inferior con el tamaño esperado para el polipéptido BNT033 y una superior que puede ser una proteína contaminante del mismo tamaño molecular. Utilizamos un patrón de BSA para estimar que la pureza obtenida de BNT033 es del 52%, lo que reduce el rendimiento estimado a 13 mg BNT033/ L cultivo. Esta pureza es aceptable en vacunas para cerdos. La dosis estimada para una vacunación es aproximadamente 300 mcg de antígeno BNT033, por lo que podríamos obtener con el protocolo establecido unas 43 dosis de vacuna/L de cultivo.

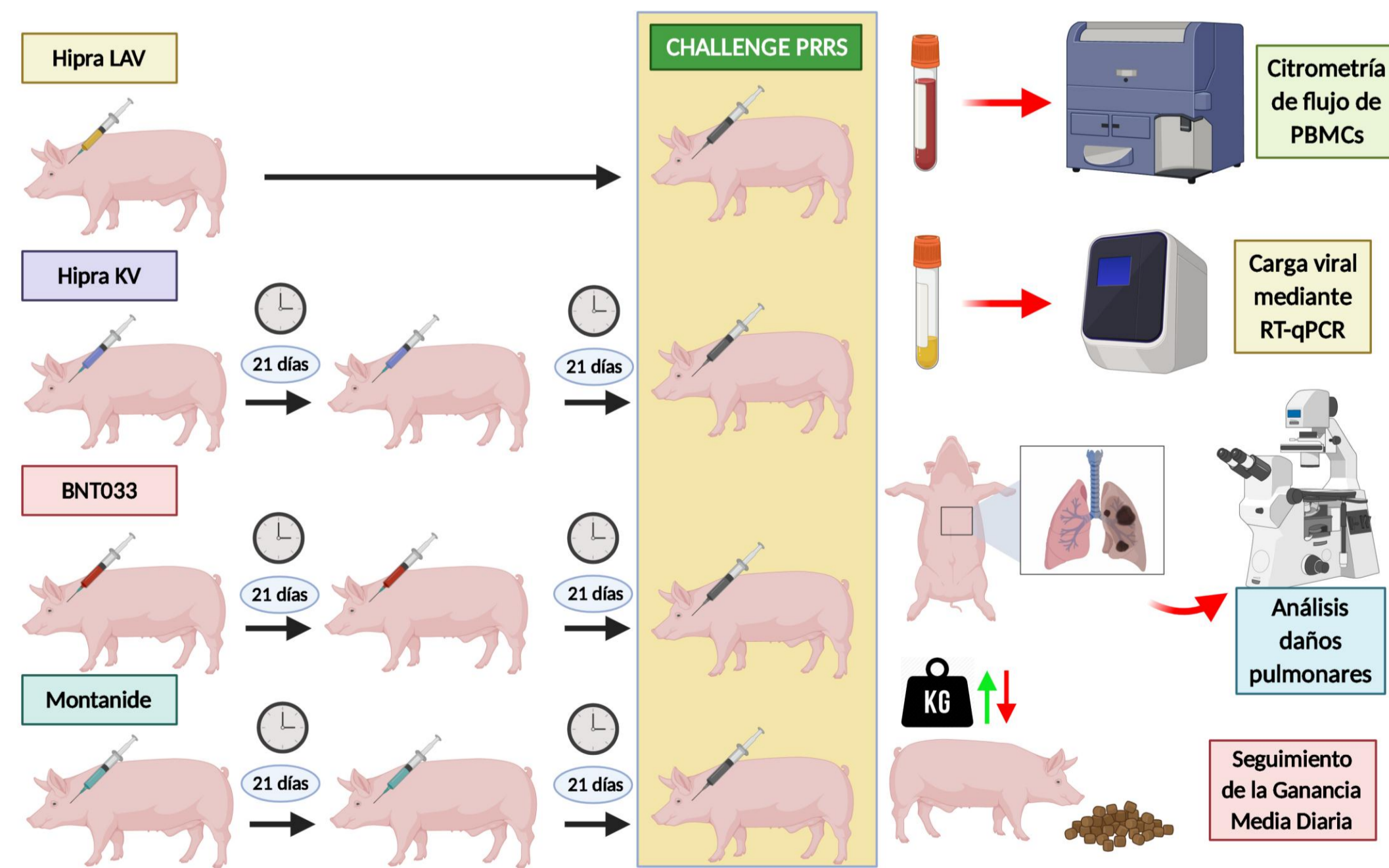


Figura 7: Ensayo de eficacia en lechones mediante desafío con una cepa europea de PRRS y comparación con vacunas comerciales. Diseño de un ensayo en curso para analizar la eficacia del candidato vacunal BNT033. Se está realizando en la empresa A.M. Animalia Bianya (Girona). Cinco grupos (N= 8 lechones) se inmunizarán con 2 vacunas comerciales, el candidato BNT033 formulado con un adyuvante tipo emulsión agua:aceite de la familia Montanide® y con solo el adyuvante. Grupo 1: vacuna comercial del tipo viva atenuada (1 dosis). Grupo 2: vacuna comercial del tipo virus inactivado (dosis y recuerdo). Grupo 3: BNT033 + adyuvante (dosis y recuerdo). Grupo 4: solo adyuvante (dosis y recuerdo). Habrá un grupo control negativo sin inmunizar (no representado). A los 42 días todos los cerdos serán infectados con una cepa virulenta de PRRSV tipo 1. Antes de la segunda inmunización, antes del desafío y cada semana a partir de éste, se llevarán a cabo muestreos periódicos de sangre y suero. A partir del suero se medirá la respuesta humoral mediante análisis de IgG por ELISA y carga viral por RT-qPCR. A partir de células mononucleares de la sangre (PBMCs) mediremos la respuesta mediada por linfocitos mediante estimulación de PBMCs con virus inactivado de PRRS y análisis de citoquinas Th1 y Th2 por citometría de flujo. Además, se llevará un seguimiento de la ganancia media diaria de peso de los cerdos y de la carga viral en tejido nasal y saliva, también por RT-qPCR. Tres semanas después de la infección se sacrificarán todos los animales y se observará en microscopio los daños tisulares y patologías celulares en el sistema respiratorio de los animales. Los resultados de este ensayo se analizarán e incluirán en el proyecto fin de máster. La comparación entre los grupos permitirá contrastar si BNT033 es capaz de generar una respuesta neutralizante rápida contra el virus PRRSV con alta componente celular.