

ENSAYO PRECLINICO DE LA VACUNA CANDID #1 PRODUCIDA EN ARGENTINA CONTRA LA FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA

ANA M. AMBROSIO, LAURA M. RIERA, MARÍA DEL CARMEN SAAVEDRA, MARÍA J. SOTTOSANTI†

*Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. J.I. Maiztegui
Pergamino, Provincia de Buenos Aires*

Resumen Se comparó en cobayos la seguridad, inmunogenicidad y eficacia protectora de un lote de vacuna Candid #1(C#1) fabricada en Estados Unidos de América (EE.UU.) y distintos lotes de la misma vacuna fabricados en Argentina (Arg). El lote TSI 5-1-92 (EE.UU.) y los lotes Exp N° 3, 7A y 8A (Arg) fueron inoculados (0.5 ml, IM) en cobayos de 250-400 g. Para cada ensayo diez animales recibieron solución fisiológica y sirvieron como control. Todos fueron desafiados con la cepa patógena P23790 de virus Junin. Se registró: a) temperatura rectal, b) peso corporal, c) presencia de anticuerpos neutralizantes (AcNT) pre y post-vacunación, d) respuesta al desafío. Todos los animales vacunados desarrollaron AcNT anti virus Junin (rango = 40- 81920 y sobrevivieron al desafío. En cada grupo control 8/10 animales murieron (día 23.3 ± 5.4 post-desafío). Los cobayos resultaron idénticamente protegidos de una descarga letal de virus Junin por la vacuna importada y los diferentes lotes de C#1 producidos en Argentina.

Palabras clave: fiebre hemorrágica argentina, vacuna argentina, ensayos preclínicos

Abstract *Preclinical assay of Candid #1 vaccine against Argentine Hemorrhagic Fever made in Argentina.*

Candid #1 vaccine against Argentine Hemorrhagic Fever produced in USA versus lots of the same vaccine made in Argentina were compared in guinea pigs regarding safety, immunogenicity and protective efficacy against a challenge with pathogenic Junin virus. Lots N° Exp 3, 7A and 8A of Argentine origin as well as lot TSI 5-1-92 from USA were inoculated in guinea pigs of 250-400 g in two consecutive assays. Ten animals inoculated with saline performed as normal controls in each experiment. Parameters studied were: a) temperature; b) body weight; c) neutralizing antibodies to Junin virus; d) response to viral challenge. Animals gained weight and remained normothermic up to the challenge. Guinea pigs that received Candid #1 from any manufacturer elicited neutralizing antibodies to Junin virus (titles from 40 to 81920) and survived to challenge whilst 8/10 animals died in each control group. Data presented demonstrated that Candid #1 vaccines from USA or Argentine manufacturers were equally safe, immunogenic and protective in guinea pigs.

Key words: Argentine Hemorrhagic Fever, Argentine vaccine, preclinical assays

La Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) es una enfermedad viral aguda y grave¹ que tiene como agente etiológico al virus Junin, perteneciente a la familia Arenaviridae constituida, hasta hoy, por 23 agentes que tienen a pequeños roedores como reservorios naturales².

Desde el descubrimiento del virus Junin se han producido brotes anuales de FHA sin interrupción, siendo un aspecto relevante la extensión progresiva del área endémica. La zona afectada, circunscripta en 1958 a cuatro partidos de la provincia de Buenos Aires, con una superficie de 16 000 km² y con una población a riesgo

estimada en 270 000 habitantes, abarca actualmente unos 150 000 km², con una población a riesgo estimada en 5 000 000 de habitantes (M.R. Feuillade, comunicación personal). Estas características epidemiológicas hacen que la FHA sea una enfermedad prevenible y no erradicable, consenso al que se arribó a mediados de los años 70 cuando se consolidaron diversas líneas de investigación tendientes a obtener una vacuna para prevenir la FHA³⁻¹¹.

La vacuna a virus Junin vivo atenuado Candid #1 (C #1) fue el resultado de un proyecto de colaboración internacional, que incluyó al gobierno de Argentina, al Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH), la Organización Panamericana de la Salud, el Programa de Desarrollo de las Naciones Unidas y el *United States Army Medical Research Institute for Infectious Diseases* de EE.UU. El desarrollo se inició en 1979 y entre 1985 y 1990 se demostró la seguridad, inmunogenicidad y efi-

Recibido: 5-VII-2005

Aceptado: 22-VII-2005

† Fallecida el 13-VII-2004

Dirección postal: Dra. Ana M. Ambrosio, Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. J.I. Maiztegui, Monteagudo 2510, 2700 Pergamino, Argentina
Fax: (02477) 433045/ 422020 e-mail: anaambrosio@yahoo.com.ar

cacia protectora (95.5%, intervalo de confianza 82%-99%, $p < 0.001$) de la vacuna C #1¹². Esta vacuna, destinada a una población limitada, es considerada un producto huérfano, por lo que en el proyecto de desarrollo ya se había previsto su producción en el INEVH de Argentina. Los laboratorios de la Unidad de Producción del INEVH fueron adaptados para reunir los requisitos actuales de las buenas prácticas de manufactura, y habilitados, en el 2001, como planta elaboradora de vacunas virales para uso humano por la autoridad regulatoria nacional (ANMAT). En ellos se han producido tres lotes experimentales de vacuna C #1 y varios lotes ampliados destinados al uso en humanos, cuyos procedimientos de producción, control y aseguramiento de la calidad han sido inspeccionados y aprobados por la ANMAT en el 2003. De estos lotes, el primero (7A) será probado en ensayos clínicos según protocolos ya aprobados por la ANMAT, requeridos para el registro de C #1 como nueva especialidad medicinal, a fin de continuar las campañas de vacunación con C #1 producida en Argentina. En este trabajo se presentan los estudios pre-clínicos realizados en cobayos para determinar la seguridad, inmunogenicidad y la eficacia protectora contra el desafío con una cepa virulenta de virus Junin, de lotes de la vacuna C #1 de origen Argentina, en comparación con un lote de C #1 de origen EE.UU., que ya ha sido utilizada en voluntarios durante campañas de vacunación selectiva en Argentina.

Se utilizaron cobayos cepa Hartley, de 250 a 400 g de peso, microbiológicamente monitoreados. Los animales fueron manipulados cumpliendo con las buenas prácticas en el tratamiento de animales de experimentación¹³.

Los lotes de vacuna C #1 estudiados fueron:

- Lote 5-1-92 (TSI), origen EE.UU., título 1.67×10^4 ufp/ml
- Lote experimental N°3 (INEVH), origen Argentina, título 4.8×10^4 ufp/ml
- Lote 7A (INEVH), origen Argentina, título 2.29×10^4 ufp/ml
- Lote 8A (INEVH), origen Argentina, título 3.13×10^4 ufp/ml

En todos los experimentos la administración de vacuna, en la dilución correspondiente, se realizó mediante una dosis de 0.5 ml por la vía IM en cada animal. La cepa patógena P23790 de virus Junin, aislada de un caso fatal de fiebre hemorrágica argentina, stock ST 274447-52, con título 3.83×10^8 ufp/ml, se utilizó para la descarga viral en todos los experimentos, inoculándose 1.5 ml IP conteniendo 760 y 1400 ufp del virus, previamente probada como una dosis letal 100%.

La titulación de anticuerpos neutralizantes en las muestras de suero obtenidas de los animales se realizó mediante una prueba de neutralización por reducción del 80% de ufp bajo agar en células Vero C76 (ATCC CRL 1587)¹⁴. Los experimentos fueron realizados por operadores inmunes para fiebre hemorrágica argentina, en un

entorno de nivel III de bioseguridad y se desarrollaron en dos etapas.

En la primera etapa, los lotes Experimental N° 3 (origen Argentina) y TSI 5-1-92 (origen EE.UU.) fueron inoculados sin diluir y en diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-3} en grupos de diez animales por dilución de cada vacuna. Otros diez cobayos fueron inoculados con el mismo volumen y por la misma vía con solución fisiológica para su utilización como control normal. Se determinó que todos los cobayos fueran libres de anticuerpos NT para virus Junin antes de su admisión en el estudio. Se tomó una muestra de suero de cada uno de los 90 cobayos (80 vacunados y 10 controles) en el día 70 p.i. para determinación de título de anticuerpos NT y en el día 95 p.i. todos los animales fueron desafiados con 766 ufp de la cepa letal P P23790 de virus Junin.

En la segunda etapa, los lotes de vacuna C #1 identificados como 7A y 8A (origen Argentina) fueron inoculados sin diluir en sendos grupos de 10 cobayos por lote de vacuna, con la dosis y vía ya descritas. Un grupo adicional de 10 animales fue inoculado con solución fisiológica para su utilización como control normal. Todos los animales, libres de anticuerpos NT para virus Junin antes de la vacunación, fueron sangrados en el día 30 p.i. para determinación de títulos de anticuerpos NT y desafiados con 1400 ufp de la cepa letal P23790 de virus Junin, en el día 39 p.i.

En ambos experimentos se realizaron determinaciones de peso y temperatura rectal dos veces por semana durante las dos primeras semanas p.i., continuándose con una determinación semanal hasta el día de la descarga viral. Luego de la descarga viral sólo se registraron signos/ síntomas de enfermedad y muerte.

Todos los animales presentaron normotermia y la ganancia de peso desde la inoculación de C #1 hasta el momento del desafío fue comparable a la de los cobayos control.

Todos los cobayos respondieron con la formación de anticuerpos NT a la inoculación con C# 1. En la Tabla 1 se presentan los títulos medios de anticuerpos correspondientes a cada grupo inoculado con los diferentes lotes de vacuna. No se encontraron diferencias significativas entre los títulos medios de anticuerpos generados por C #1 de origen EE.UU. y el lote experimental N°3 INEVH de origen argentino, inoculadas sin diluir ($p < 0.01$), ocurriendo lo mismo cuando se compararon los títulos medios de Ac generados por la inoculación sin diluir del lote importado TSI 5-1-92 vs el lote 8A, de origen nacional destinado a la población. La excepción fue el lote 7A (Arg), que generó un nivel de Ac significativamente superior al correspondiente a la vacuna importada ($p = 0.004$; Tabla 1). Todos los cobayos vacunados en ambas etapas sobrevivieron al desafío con una cepa letal de virus Junin. Los animales control de ambos experimentos (dos grupos de 10 cobayos), sin Ac NT previos al desafío,

TABLA 1.- Título medio de anticuerpos neutralizantes obtenidos para cada grupo de cobayos a los 30 y a los 70 días post inoculación con Candid #1

Lotes de Candid #1 inoculados	Diluciones inoculadas de cada lote			
	S/D	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
TSI N° 5 (EE.UU.)	7.240 [†] (70) [#]	4.777 (70)	7.240 (70)	1.810 (70)
Exper. N° 3 (Argentina)	15.520 (70)	6.303 (70)	3.151 (70)	2.388 (70)
INEVH 7 A (Argentina)	17.828 (30)	NH*	NH	NH
INEVH 8 A (Argentina)	13.511 (30)	NH	NH	NH

[†]: Inversa de la máxima dilución del suero que neutralizó 80% de ufp de virus Junin en células Vero.

[#]: (Día post-inoculación)

*: No hecho

mostraron signos y síntomas de enfermedad a partir del día 19 post-descarga y 8/10 murieron en cada experimento como consecuencia del desafío (día medio de muerte = 23.3 ± 5.4). Los animales control que sobrevivieron al desafío desarrollaron Ac NT anti-virus Junin en títulos ≥ 1:20 000.

Los datos presentados demuestran un desempeño notablemente comparable entre la vacuna C #1 de origen EE.UU. y los lotes de C #1 producidos en Argentina. Los títulos medios de anticuerpos neutralizantes anti- C # 1 de ambos orígenes no mostraron diferencias significativas, con excepción del lote 7A (Argentina) vs. lote TSI 5-1-92 (EE.UU.), donde el título de anticuerpos generados por la vacuna importada, significativamente menor, puede deberse al tiempo de almacenamiento a -30 °C (aproximadamente diez años) que esta última lleva en nuestro país. No obstante, la protección contra la descarga viral conferida por ambos lotes fue idéntica y todos los animales vacunados sobrevivieron. Esto puede interpretarse en base a los resultados obtenidos en la primera etapa de este trabajo (Tabla 1), donde los cobayos respondieron con variables títulos medios de Ac NT, pero fueron igualmente protegidos de la descarga viral por el lote experimental N°3 (Argentina) y el TSI 5-1-92 (EE.UU.) inoculados desde sin diluir hasta la dilución 1:1000. Esto significa que 17 a 48 ufp de la vacuna Candid #1 resultaron suficientes para proteger cobayos adultos de una descarga 80% letal de virus Junin silvestre. Los títulos medios de anticuerpos generados post-vacunación, que no mostraron diferencias significativas entre los diferentes lotes de vacuna de producción nacional (Tabla 1), así como la normal evolución del peso de los animales vacunados y la sobrevida al desafío demostraron la consistencia de los lotes de C #1 manufacturados en Argentina en cuanto a seguridad, inmunogenicidad y capacidad protectora en estos modelos experimentales. El lote 7A será utilizado próximamente en un ensayo clínico en voluntarios humanos sobre un pro-

toloco ya aprobado por la autoridad regulatoria nacional (ANMAT). Cumplida esta etapa, los lotes de vacuna Candid #1 presentados en este trabajo serán, en nuestro conocimiento, los primeros lotes de una vacuna a virus vivo atenuado, obtenida en cultivos celulares certificados y destinada a seres humanos, que se han producido íntegramente en Argentina.

Bibliografía

- Harrison L, Halsey NA, McKee KT, et al. Clinical case definitions for Argentine Hemorrhagic Fever. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 1091-4.
- Charrel RN, Lamballerie X. Arenaviruses other than Lassa Virus. *Antiviral Res* 2003; 57: 89- 100.
- Pirosky I, Martini P, Zuccarini J, et al. Virosis hemorrágica del noroeste bonaerense (endemo-epidémica, febril, exantemática y leucopénica): V, la vacuna específica y la vacunación. *Orientación Médica* 1959; 8: 743-4
- Barrera Oro JG, Girola RA, Frugone G. Estudios inmunológicos con virus Junin: II, inmunidad adquirida por cobayos inoculados con virus inactivado por formol. *Medicina (Buenos Aires)* 1967; 27: 279-82.
- Videla C, Carballal G, Remorini P, La Torre J. Formalin inactivated Junin virus: immunogenicity and protection assays. *J Med Virol* 1989; 29: 215-20.
- Parodi AS, Guerrero LB, Weissenbacher M. Fiebre hemorrágica argentina: vacunación con virus Junin inactivado. *Ciencia e Investigación* 1965; 21:132-3.
- Martínez Segovia ZM, Arguelles G, Tokman A. Capacidad antigénica del virus Junin inactivado mediante oxidación fotodinámica. *Medicina (Buenos Aires)* 1980; 40: 156-60.
- Carballal G, Videla C, Oubiña JR, Frigerio MJ. Antígenos inactivados de virus Junin. *Medicina (Buenos Aires)* 1985; 45: 153-8.
- Parodi AS, Coto CE. Inmunización de cobayos contra el virus Junin por inoculación del virus Tacaribe. *Medicina (Buenos Aires)* 1964; 24: 151- 3.
- Weissenbacher M, de Guerrero LB, Help G, Parodi AS. Inmunización contra la fiebre hemorrágica argentina con una cepa atenuada de virus Junin:III, reacciones serológicas en voluntarios. *Medicina (Buenos Aires)* 1969; 29: 88-92.

11. Barrera Oro JG, McKee KT. Hacia una vacuna contra la fiebre hemorrágica argentina. *Bol Of Sanit Panam* 1992; 112: 296-305.
12. Maiztegui JI, McKee KT, Barrera Oro JG, et al. Protective efficacy of a live attenuated vaccine against Argentine hemorrhagic fever. *JID* 1998; 177: 277-83.
13. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences. National Research Council, 1996. National Academy Press. Washington, D.C.
14. Webb P, Johnson K, Mackensie R. The measurement of specific antibodies in Bolivian hemorrhagic fever by neutralization of virus plaques. *Proc Soc Exp Biol Med* 1969; 130: 1013-19.

At the same time we (the scientists) must never forget what we can do best. In our searching for ways to understand better the world around us, we are a vital, if not the vital, key for ensuring that the various civilizations of men long prevail over the inherent chaos of the physical world about us. Thus, we have as much to lose from false humility as from elitist arrogance. In working toward the reconstruction of our societies, we must never forget that ideas are not only beautiful, but necessary.

Al mismo tiempo nosotros (los científicos) no debemos nunca olvidar lo que mejor sabemos hacer. En nuestro afán de encontrar medios para conocer mejor el mundo que nos rodea, somos una clave, sino *la* clave, para asegurar que las varias civilizaciones de hombres prevalezcan sobre el inherente caos del mundo físico alrededor nuestro. Así, tenemos tanto que perder con la falsa humildad como con la arrogancia elitista. Al trabajar hacia la reconstrucción de nuestras sociedades, no debemos nunca olvidar que las ideas son no sólo bellas, sino necesarias.

James D. Watson

A Passion for DNA. Genes, Genomes and Society. Cold Spring Harbor.
New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000 p 116