

## ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE DE SUEROS DE MACACOS INMUNIZADOS CON EL CANDIDATO VACUNAL CUBANO: TAB9

Leonor Navea,<sup>1</sup> Leonor Lobaina,<sup>1</sup> Marta Dubed,<sup>1</sup> Giselle Alvarez,<sup>1</sup>  
Carmen Gómez<sup>2</sup> y Carlos Duarte<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigaciones del SIDA, AP 23031, Marianao 14,  
Ciudad de La Habana, Cuba, Fax: (53-7) 241682

<sup>2</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, Cuba.

### Introducción

Existen diversos puntos de vista sobre la utilidad de los modelos animales para los ensayos de efectividad de los candidatos vacunales contra el VIH-1, no obstante chimpancés, gibones, macacos, ratones y conejos se utilizan con estos fines (1, 2)

Los más usados han sido los primates, aunque se reconoce como desventaja que no desarrollan la enfermedad, se ha demostrado protección en los chimpancés inmunizados con gp120 o combinaciones de diferentes inmunógenos (1-3).

En este trabajo se determina la presencia de anticuerpos neutralizantes (AN) en el suero de macacos *Macaca fascicularis* inmunizados con TAB9 polipeptido multiantigénico (PMA), candidato vacunal cubano, contra cuatro cepas de referencia de VIH-1.

### Materiales y Métodos

Los sueros hiperinmunes se obtuvieron después de inocular los macacos con un PMA constituido por regiones V3 de 6 aislamientos de VIH-1 (LR150, JY1, RF, MN, BRVA y IIB) (4). Cuatro animales se inocularon con 1 mg del TAB9 (sueros 1-4) y 4 con 200 µg (sueros 5-8), los animales 9 y 10 se utilizaron

como controles. El ensayo de neutralización se realizó en placas de 96 pozos, mezclando en cada uno 50 µL de 100 TCID<sub>50</sub> de las cepas virales (MN, JY1, IIB y LAI), con 50 µL de una serie de diluciones de los sueros (1:20-1:320), se incubaron 1 h a 37 °C y posteriormente se adicionaron 100 µL de medio RPMI 1640 con 1 x 10<sup>5</sup> células MT4. Al séptimo día los sobrenadantes se cosecharon y se midió el grado de multiplicidad viral mediante un ELISA de captura de antígeno p24 (DAVIHLAB). El título de AN se estableció como el inverso de la mayor dilución del suero donde se produjo una inhibición de 50 y 90 % del antígeno p24.

### Resultados y Discusión

Se obtuvieron anticuerpos con actividad neutralizante en el 100 % de los sueros de los macacos después de inmunizados con la tercera dosis del TAB9, frente a las cepas de referencia LAI, IIB y MN; sin embargo solo dos sueros (25 % uno de cada grupo) reaccionaron frente a la cepa JY1. Los sueros de los macacos inoculados solo con adyuvante no presentaron AN (Tabla)

Tabla. Inverso de la dilución del suero con AN frente a cepas de referencia del VIH-1. Un mes después de la tercera dosis.

Dosis TAB9	Suero	LAI		IIB		MN		JY1	
		50 %	90 %	50 %	90 %	50 %	90 %	50 %	90 %
1 mg	1	320	20	160	80	80	20	N	N
	2	320	40	320	20	80	20	N	N
	3	320	20	80	20	40	20	N	N
	4	20	20	160	20	20	-	N	N
200 µg	5	320	20	320	20	N	320	160	20
	6	320	20	20	-	20	-	N	N
	7	160	20	160	40	320	80	80	40
	8	20	-	20	-	40+	20	N	N
Adyuvante	9	N	N	N	N	N	N	N	N
	10	N	N	N	N	N	N	N	N

N: no neutralizó.

1. Girard M, Kieny MP, Pinter A, Barre-Sinoussi F, Nara P, Kolbe H, et al. Immunization of chimpanzees confers protection against challenge with human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:542-546.

2. Berman PW, Gregory TJ, Riddle L, Nakamura G, Champe M, Porter J, et al. Protection of chimpanzees from infection by HIV-1 after vaccination with recombinant glycoprotein gp120 but not gp160. *Nature* 1990;345:622-625.

3. Gómez C, Perdomo W, Duarte C. The reactivity of sera from rabbits and macaques immunized with HIV-1 multi-epitopic polypeptides against BSA coupled synthetic peptides representing the V3 region from Cuban HIV-1 isolates. *Conf. on AIDS sexuality and AIDS in Cuba, Latinoamerican and Caribbean. Cuba* 1997;p40.

4. Durda AJ, Bachelier L, Clapman P, Jenoski AM, Leace B, Mathews TJ et al. HIV-1 neutralizing monoclonal antibodies induced by synthetic peptide. *AIDS Res Human Retrov* 1990;6:1115-1123.

Las concentraciones indujeron AN en la mayoría de los animales frente a cepas del grupo B (LAI, IIIB y MN) todas representadas en el PMA. La poca respuesta frente a la cepa JY1 utilizada se podría explicar por las diferencias genéticas entre ésta y los epítopes de la incluida en el TAB9.

Otros autores coinciden en la presencia de una actividad neutralizante, cepa específica frente a cepas homólogas (4, 5). Se confirmó que TAB9 posee actividad inmunogénica en macacos, aún cuando no se ha evaluado la respuesta después de la cuarta dosis.

5. Goudsmit J, Debauck C, Melaen RH, Smit L, Bakker M, Asher DM et al. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:4478.

## T CELL RESPONSES INDUCED IN HUMANS BY NASAL IMMUNIZATION WITH MENINGOCOCCAL OUTER MEMBRANE VESICLES AND WHOLE CELL *Bordetella pertussis*

F Oftung,<sup>1</sup> AKH Berstad,<sup>1</sup> L Meyer Næss,<sup>1</sup> L Wetzler,<sup>3</sup> GE Korsvold,<sup>1</sup> IL Haugen,<sup>1</sup> LO Frøholm,<sup>2</sup> A Aase,<sup>1</sup> R Dalseg,<sup>1</sup> J Holst,<sup>1</sup> T Michaelsen<sup>1</sup> and B Haneberg<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Vaccinology and <sup>2</sup>Bacteriology, National Institute of Public Health, PO Box 4404, N-0403 Oslo, Norway

<sup>3</sup>Maxwell Finland Laboratory for Infectious Diseases, Boston Medical Center, Boston University School of Medicine, Boston, MA, USA.

### Introduction

Mucosal administration of vaccines may induce local mucosal as well as systemic immune responses (1). In this work we have studied the ability of non-living particulate complex bacterial vaccine antigens to induce cellular immune responses in humans when administered nasally without any mucosal adjuvant.

### Materials and Methods

Normal healthy volunteers were given meningococcal serogroup B (B:15:P1.7,16:L3,7,9) outer membrane vesicles (OMV) (n = 12) (250 µg protein) or formalin inactivated whole cell *B. pertussis* (n = 6) (250 µg protein) as nasal drops, or spray, once a week for 4 weeks. Peripheral blood mononuclear cells were assayed at several intervals for proliferative responses by the thymidine incorporation method against the primary vaccine antigens (OMV and *B. pertussis*) as well as purified antigens: OMV class 1 and 3 proteins, *B. pertussis* filamentous hemeagglutinin (FHA), and pertussis toxoid (Ptd). IgA antibody levels against OMV and *B. pertussis* in nasal secretions were measured by ELISA (1, 2).

### Results

After nasal immunization with OMV, 5 and 11 of 12 vaccinees showed a vaccine induced proliferative T cell response to OMV and the OMV class I antigen,

respectively. No vaccine induced response to the OMV class 3 antigen was detected. Nasal immunization with whole cell *B. pertussis* resulted in elevation of the T cell response to the whole cell antigen in all 6 vaccinees. In addition, most of these vaccinees also showed significant responses to FHA and Ptd. Both when meningococcal OMV and *B. pertussis* were used as mucosal immunogens, we could demonstrate a positive correlation between antigen specific T cell responses and IgA antibody levels in nasal secretions (1, 2).

### Discussion

The potential of mucosal immunization to induce effective immunity is now explored for several pathogens, but the mucosal adjuvants necessary to promote and enhance the relevant immune responses are still a matter of debate (1). We have in this work demonstrated that non-proliferating particulate antigens, like meningococcal OMV and *B. pertussis*, can induce antigen specific T cell responses in humans when administered nasally without adjuvant. With respect to the humoral response, both of these vaccine antigens also induced nasal IgA antibody production (1, 2) which is putatively regulated by T helper cells. In conclusion, the bacterial non-replicating particulate antigens studied here may have the intrinsic capacity to function alone as mucosal vaccines.

1. Haneberg B, Dalseg R, Wedege E, Høiby A, Haugen IL, Oftung F, Næss LM, Aase A, Michaelsen T, Holst J. Intranasal administration in humans of a meningococcal outer membrane vesicle vaccine induces lasting local mucosal antibodies as well as serum antibodies with strong bactericidal activity. Submitted *Infect Immun*. 1997.

2. Berstad AKH, Holst J, Frøholm LO, Haugen IL, Trettenes E, Haneberg B. Systemic and mucosal antibody response in humans given a whole cell pertussis vaccine nasally. Vaccine Submitted 1997.