

## La gD2 coadministrada con el AFCo1 por vía intranasal induce inmunidad protectora contra virus de herpes simple tipo 2 en ratones

Osmir Cabrera,<sup>1\*</sup> Maribel Cuello,<sup>1</sup> Karolina Thörn,<sup>2</sup> Josefine Peerson,<sup>2</sup> Madelene Lindqvist,<sup>2</sup> Miriam Lastre,<sup>1</sup> Elizabeth González,<sup>1</sup> Caridad Zayas,<sup>1</sup> Julio Balboa,<sup>1</sup> Belkis Romeo,<sup>1</sup> Ali Sarandi,<sup>2</sup> Oliver Pérez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Inmunología, Vicepresidencia de Investigaciones, Instituto Finlay. Calle 17 e/ 198 y 200, Reparto Atabey, Playa, La Habana, Cuba. A.P. 16017.

<sup>2</sup> Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad de Gotemburgo, Suecia.

**email:** ocabrera@finlay.edu.cu

La infección por virus herpes simple tipo 2 (VHS-2) continúa siendo un problema de salud mundial. Esta infección es transmitida sexualmente y es la principal causa de úlceras genitales. La prevención de esta enfermedad requiere de la utilización de vacunas mucosales, pues las vacunas parenterales no han sido exitosas. Por otra parte, no existen adyuvantes mucosales, por lo que el desarrollo de estos es esencial para la estrategia de estas vacunas. La administración intranasal (IN) de la glicoproteína D del VHS-2 (gD2), coadministrada con el cocleato (AFCo1 + gD2) sería igualmente efectiva con la gD2 incluida (AFCo1-gD2). Se inocularon ratones hembras C57BL/6 por la vía IN con gD2, contenida dentro del cocleato, coadministrada con el cocleato o gD2 sola. Se determinaron los niveles de IgG anti gD2 en suero y lavado vaginal, así como las subclases de IgG anti gD2 por ELISA. Se determinó la respuesta linfoproliferativa en células de bazo, el perfil de citoquinas Th1/Th2, los signos de la enfermedad y la protección frente al reto viral. Se observaron altos títulos de IgG e IgG2c anti gD2 en el suero de los animales inoculados con la gD2 y el AFCo1 como adyuvante. No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los grupos que recibieron AFCo1 + gD2 y los que recibieron AFCo1-gD2. Se observó un perfil de citoquinas tipo Th1 y un 100% de sobrevida en los grupos que recibieron el AFCo1 como adyuvante de la gD2, mientras que en el grupo que recibió la gD2 sola no se observó protección. Estos resultados indican que la gD2 puede ser utilizada coadministrada con AFCo1 por vía IN como un potencial candidato vacunal contra VHS-2.

**Palabras clave:** Herpes, VHS, AFCo1, gD2, adyuvantes, inmunización intranasal.

### Introducción

La infección con virus herpes simple (VHS) en humanos produce una enfermedad oral cuando es producido por el tipo 1 (VHS-1) o vaginal cuando es del tipo 2 (VHS-2). VHS-2 es transmitido por contacto con la superficie de la mucosa genital, lo cual conlleva al establecimiento de latencia en los ganglios sacros y su incidencia y prevalencia continúa incrementándose en el mundo (1, 2). La superficie mucosal es usada como puerta de entrada o sitio de establecimiento por muchos agentes infecciosos que causan enfermedades en el hombre.

La replicación viral de VHS-2 comienza localmente en el epitelio genital y posteriormente asciende por los nervios sensoriales hasta el ganglio sacro, donde se establece como latente. Mientras algunos individuos experimentan infecciones esporádicas en ocasiones frecuentes y erupciones ulcerativas, otros presentan síntomas menos severos y erupciones menos frecuentes con eventual control de los síntomas asociados con el desarrollo de la inmunidad adaptativa específica contra VHS, en particular una respuesta tipo Th1 mediada por células (3). Varios candidatos vacunales que utilizan la vía intramuscular han llegado a ensayos clínicos en humanos, mostrando resultados con una protección

limitada (3, 5). En estos se han utilizado virus inactivados, atenuados, péptidos y proteínas, siendo las glicoproteínas B (gB) y D, (gD) las de resultados más promisorios. En ellos se utilizaron como adyuvantes la alúmina más el MPL o el MF59 solo (3-5).

Los adyuvantes son sustancias que incrementan la respuesta inmune específica contra los antígenos, estimulando la inmunidad innata. Estos son decisivos en la formulación vacunal, ya que disminuyen las dosis requeridas; polarizan el patrón de la respuesta inmune; incrementan la velocidad y memoria de la respuesta inmune; aumentan la efectividad de las vacunas en edades extremas y en sujetos inmunocomprometidos y funcionan cuando son administrados por diferentes vías (6).

El AFCo1 es una micropartícula obtenida a partir del proteoliposoma (PL) de *Neisseria meningitidis* serogrupo B, por medio de la interacción de los lípidos aniónicos presentes en el PL con cationes  $Ca^{2+}$  (7). En trabajos previos se demostró las potencialidades del AFCo1 como adyuvante mucosal de antígenos heterólogos incluidos en la estructura coclear y la capacidad de este adyuvante de inducir una potente respuesta inmune tipo Th1 y CTL (8,9).

\* Lic. en Química. DrC Químicas. Investigador Auxiliar.

El objetivo de este trabajo fue demostrar que el AFCo1 puede ser un adyuvante efectivo cuando es coadministrado con la gD del VHS-2 (gD2) y aplicado por vía intranasal (IN) como candidato vacunal contra el VHS-2.

## Materiales y Métodos

**Animales.** Se utilizaron 28 ratones hembras C57Bl/6, de 9-12 semanas de nacidos (Taconic M&B, Denmark). Los animales se pusieron en microaisladores bajo condiciones específicas, libres de patógenos en el vivario de la academia de Sahlgrenska, Universidad de Gotemburgo, Suecia. Todos los experimentos contaron con la aprobación del Comité de Ética para Animales de Laboratorio en Gotemburgo, Suecia y se duplicaron.

**Obtención del AFCo1 y AFCo1 con la gD2 incorporada.** La obtención del AFCo1 y la incorporación de la gD2 se llevaron a cabo en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad de Gotemburgo, Suecia, según del Campo, et al. (9). El PL (1 mg/mL) se resuspendió en tampón amortiguador de Tris-EDTA-DOC a 30 mM, 10 mM y 1,5%, respectivamente.

El AFCo1 se obtuvo mediante un proceso de diálisis rotacional, intercambiándose DOC por  $\text{Ca}^{2+}$ , utilizando como tampón amortiguador una solución que contenía Tris-NaCl- $\text{CaCl}_2$  30 mM, 100 mM y 5 mM, respectivamente, con un pH 7,4. Para la incorporación de la gD2 en la estructura del AFCo1, esta se adicionó a la solución inicial de PL a una concentración de 0,5 mg/mL y la mezcla se procesó igual que para la obtención del AFCo1.

La incorporación de gD2 en el AFCo1 fue verificada por SDS-PAGE con la presencia de la banda proteica, característica de esta proteína. La eficiencia del proceso de incorporación se determinó calculando la concentración de gD2 en el sobrenadante y en el cocleato por el método de determinación de proteínas de Lowry. Para los experimentos de gD2 coadministrada se mezclaron la gD2 y el AFCo1 en el momento de la inoculación.

**Inmunización y toma de muestra.** Se inocularon tres grupos de siete ratones hembras C57Bl/6 por vía IN con AFCo1-gD2 (gD2 incorporada), AFCo1+gD2 (gD2 coadministrada) o gD2 sola, en un volumen total de 25  $\mu\text{L}$  (12,5 por fosa nasal). La gD2 y el AFCo1 se utilizaron a una concentración de 5 y 15  $\mu\text{g}$  de proteínas por dosis por ratón, respectivamente. Se emplearon tres dosis espaciadas en siete días.

Se colectaron muestras de sangre de la vena de la cola de los ratones a los 21 días después de la última dosis. Se utilizó como control un grupo de siete ratones que no fueron inoculados. Para la toma de muestras de lavado vaginal se anestesiaron los animales con isoflourano (Baxter Medical AB) 22 días después de la última inoculación y se realizaron

tres lavados de la cavidad vaginal con 50  $\mu\text{L}$  de solución salina tamponada con fosfato (SSTF). Toda las muestras se alicuotaron y guardaron a -20 °C hasta su uso.

**Detección de IgG anti gD2 por ELISA.** Los anticuerpos se midieron en un ELISA de captura en placas de 96 pocillos (Maxisorp Nunc Immuno plate, Nunc, Roskilde, Denmark), usando kits de BD (Pharmingen, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se adicionaron a cada pocillo de la placa 100  $\mu\text{L}$  de gD2 (3 mg/mL) en 0,05 M de tampón carbonato con un pH 9,6. Se incubó 4 h a una temperatura ambiente y posteriormente se dejó a 4 °C toda la noche. Al día siguiente las placas se bloquearon con BSA al 2% en solución tamponada con fosfato (SSTF), 30 min a 37 °C.

Las muestras se adicionaron a la placa en diluciones seriadas, comenzando con una dilución de 1/100 y se incubaron por 1 h a 37 °C. Después de lavar con 0,05% de Tween-20 en SSTF, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del conjugado anti IgG, anti IgG1 o anti IgG2c en cada pocillo y se incubó la placa 1 h a 37 °C. Posteriormente, las placas se lavaron con 0,05% de Tween-20 en SSTF y se adicionó a cada pozo 100  $\mu\text{L}$  de 1,2-Fenilendiamina (1 mg/mL) en tampón citrato 0,1 M, pH 4,5 en presencia de 0,04% de peróxido de hidrógeno. La absorbancia se leyó a 450 nm y los títulos de IgG se definieron como la mayor dilución de la muestra con la que se obtuvo una densidad óptica (DO) = 0,4 sobre el valor del fondo de la placa. Los resultados de anticuerpos IgG y subclases de anticuerpos IgG1 e IgG2c en lavados vaginales se expresaron como DO de las muestras diluidas 1/50.

**Proliferación celular.** Tres semanas después de la última inmunización se sacrificaron dos animales por cada grupo mediante dislocación cervical, se obtuvieron los bazos y se purificaron las células. Se maceraron los órganos con SSTF sobre un filtro y se centrifugó a 1600 g. El macerado se lavó tres veces con SSTF frío y se resuspendió en medio completo de Iscove (Biochrom). Se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer y se determinó la viabilidad mediante tinción de exclusión con Tripán azul. Las células aisladas se ajustaron a  $2 \times 10^6$  células/mL. En una placa estéril de 96 pocillos (Nunc) se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular ( $2 \times 10^6$  células) más 100  $\mu\text{L}$  de gD2 (2 mg/mL) por pozo y se completó el pozo hasta 250  $\mu\text{L}$  con SSTF. Para medir la proliferación de los linfocitos, después de las 96 h, se adicionó a cada pozo 1mCi de timidina tritiada [ $^3\text{H}$ ] (Amersham, Pharmacia), diluida en medio completo de ISCOVE y las mismas se incubaron durante 6 h. Las células se cosecharon sobre filtro de fibras de cristal y se evaluaron por conteo con líquido de centelleo en un equipo cosechador de células con lector acoplado (Harvester 96<sup>®</sup> Mach III, TOMTEC). Los resultados se expresaron como conteo por min (cpm) (10).

**Determinación del perfil de citoquinas Th1/Th2.** Se utilizaron células  $\text{CD4}^+$ , purificadas previamente del bazo de dos animales por grupo y fueron estimuladas *in vitro* con

gD2. Se determinó TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-5 e IL-4 por citometría de flujo utilizando el kit CBA de inflamación de ratón (Cytometric Bead Array de BD Biosciences), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, mediante el software CBA. Los datos obtenidos del citómetro se analizaron con el programa BD CBA y las concentraciones de las citoquinas se calcularon según la base de datos de este programa.

**Virus.** La cepa 333 del VHS-2 (11, 12) se sembró y tituló por monocapas en células de riñón de monos verdes (GMK-AH1) y preparado por ciclos de congelación y descongelación, seguido de una centrifugación y desechando el precipitado celular.

**Reto vaginal con VHS-2.** Las ratonas hembras C57BL/6 en estudio se inocularon por vía subcutánea 24 días después de la última dosis, con 3 mg de Depo-Provera (DP) (Pharmacia) en SSTF para sincronizar el ciclo menstrual. Seis días después los animales se anestesiaron con isoflourano (Baxter Medical AB) y se retaron con  $9 \times 10^4$  unidades formadoras de colonias del virus por vía intravaginal, en 10  $\mu$ L de solución de medio Hanks balanceado (9).

**Inflamación y enfermedad.** Los ratones se examinaron diariamente después de la infección con el virus, observando signos de inflamación vaginal, enfermedad neurológica y muerte. La severidad de la enfermedad se clasificó como sanos (0), eritema genital (1), inflamación genital moderada (2), lesión genital severa y purulenta (3) y necesidad de sacrificio debido a parálisis de la extremidades traseras (4). Los ratones se mantuvieron bajo supervisión durante 15 días después del reto viral (9).

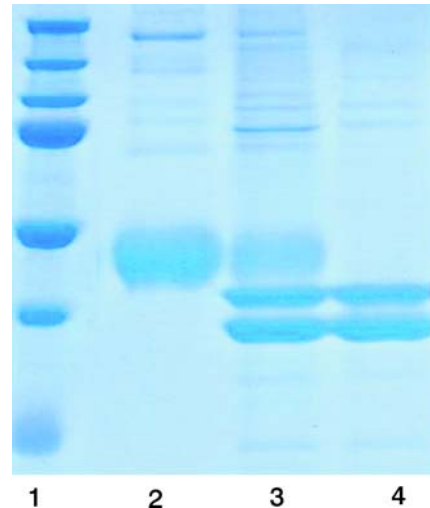
**Replicación viral vaginal.** Tres días posteriores al reto vaginal con el virus los animales se anestesiaron con isoflourano (Baxter Medical AB) y se colectaron los fluidos vaginales mediante pipeteo de 40  $\mu$ L de medio Hanks balanceado, dentro y fuera de la vagina, hasta que se obtuvo una discreta masa de mucus. Los lavados se centrifugaron para clarificarlos y se guardaron a -70 °C hasta su uso. Los títulos de VHS-2 se determinaron por un ensayo de placas en células de monocapa GMK-AH1 (9).

**Análisis estadístico.** La comparación estadística de las medias entre los grupos en estudio fue evaluada aplicando ANOVA de un factor seguido de un estudio de comparaciones múltiples, usando la prueba de Tukey. La prueba de Bartlett se empleó para evaluar homogeneidad de varianza. Se utilizó el programa GraphPad Prism 4 (CA, USA). Se consideró diferencia significativa para valores de  $p < 0,05$ . Los resultados mostrados son representativos de dos experimentos realizados en días diferentes.

## Resultados

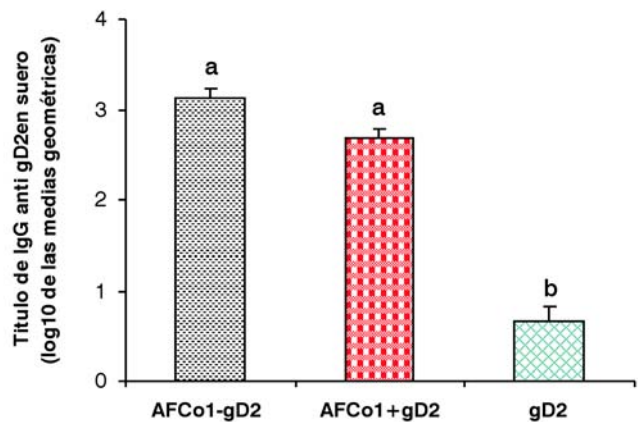
### Determinación del por ciento de incorporación de gD2 en el AFCo1

En la Figura 1 se muestra el SDS PAGE, donde se pudo detectar la presencia de la gD2 en la estructura coclear (columna 3). Por el método de determinación de proteínas descrito por Lowry se determinó un 85% de incorporación de la gD2 en el AFCo1.



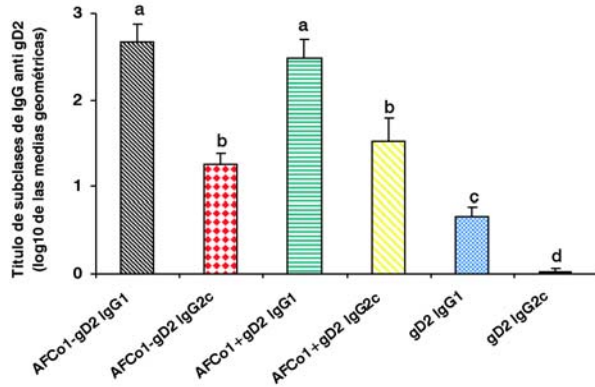
**Fig. 1.** SDS PAGE muestra la incorporación de la gD2 dentro de la estructura coclear. 1: Patrón de peso molecular; 2: gD2 nativa; 3: AFCo1-gD2 y 4: AFCo1.

**IgG anti gD2 en sueros.** Veintinueve días después de la última dosis se observaron altos títulos de IgG anti gD2 en el suero de los animales inoculados con la gD2 y el AFCo1 como adyuvante, no observándose diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los grupos que recibieron AFCo1+gD2 y los



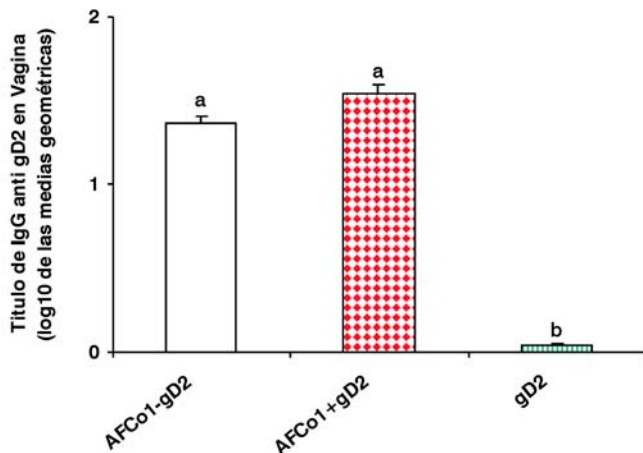
**Fig. 2.** Títulos de IgG anti gD2 determinados por ELISA, 21 días después de la última dosis (día 35) en suero de ratonas hembras C57BL/6, inoculadas por vía IN con gD2; incluida dentro de la estructura del AFCo1 (AFCo1-gD2), coadministrada con el AFCo1 (AFCo1+gD2) o sola. Letras diferentes significan que hay diferencias significativas entre los grupos.

que recibieron AFCo1-gD2. En los sueros de los animales inmunizados con gD2 sola los títulos obtenidos fueron muy bajos, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) con respecto al resto de los grupos (Fig. 2). En general, se indujo una buena y similar respuesta en las formulaciones que contenían el AFCo1.



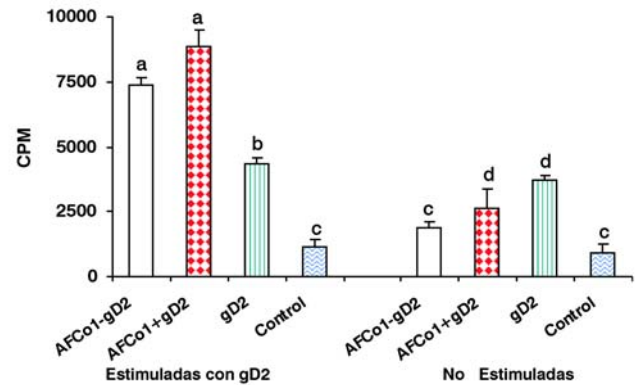
**Fig. 3.** Títulos de IgG1 e IgG2c anti gD2 determinados por ELISA, 21 días después de la última dosis (día 35) en suero de ratones hembras C57BL/6, inoculados por vía IN con gD2; incluida dentro de la estructural del AFCo1 (AFCo1-gD2), coadministrada con el AFCo1 (AFCo1+gD2) o sola. Letras diferentes significan que hay diferencias significativas entre los grupos.

**Subclases de IgG anti gD2.** Las formulaciones adyuvadas con AFCo1 fueron significativamente superiores ( $p < 0,001$ ) a la gD2 sola. Solo las primeras indujeron IgG2c anti gD2, subclase orientadora de respuesta celular, Th1 (Fig. 3). En general la respuesta de subclases específicas en las formulaciones adyuvadas fue superior a la gD sin adyugar y similar entre ellas.



**Fig. 4.** Títulos de IgG anti gD2 determinados por ELISA, 21 días después de la última dosis (día 35) en muestras de lavados vaginales de ratones hembras C57BL/6 inoculados por vía IN con gD2; incluida dentro de la estructural del AFCo1 (AFCo1-gD2), coadministrada con el AFCo1 (AFCo1+gD2) o sola. Letras diferentes significan que hay diferencias significativas entre los grupos.

**IgG anti gD2 en lavado vaginal.** Al determinar la presencia de IgG anti gD2 en las muestras de lavado vaginal 22 días después de la última dosis obtuvimos elevados títulos de IgG anti gD2 en las muestras de los animales inoculados con AFCo1-gD2 o con AFCo1+gD2, no observándose diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre estos dos grupos. En los animales inoculados con la gD2 sola los títulos de IgG en vagina fueron muy bajos, mostrando diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) con respecto a los otros dos grupos de animales (Fig. 4). En general, las formulaciones adyuvadas indujeron respuesta específica y similar en el lavado vaginal.



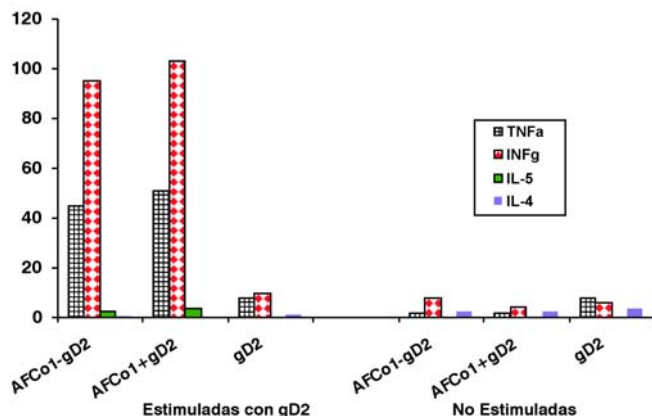
**Fig. 5.** Proliferación celular en células obtenidas de bazo de ratones hembras C57BL/6, inoculados con AFCo1-gD2, AFCo1+gD2 o gD2, y de animales controles no inoculados por vía IN. Las células se estimularon o no con gD2 *in vitro*. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre los grupos.

**Proliferación celular.** Se observó proliferación celular anti gD2 en las células del bazo de los animales inoculados tanto con el adyuvante AFCo1 como en los animales inoculados con la gD2 sola, siendo significativamente superiores ( $p < 0,001$ ) los valores de proliferación obtenidos en las células que fueron estimuladas con la gD2 *in vitro*, comparado con las células controles que no fueron estimuladas con la gD2.

Los mayores valores de proliferación se observaron en los grupos que recibieron el AFCo1.

No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los animales que recibieron el AFCo1-gD2 y los que recibieron el AFCo1+gD2, mientras que sí se observaron diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre los grupos que recibieron el AFCo1 y la gD2 sola (Fig. 5).

**Determinación del patrón de citoquinas.** Al analizar las células CD4<sup>+</sup> purificadas de bazo de los animales inoculados con la gD2, incluida o coadministrada con el AFCo1 y estimuladas *in vitro* con la gD2, se observó claramente un patrón de citoquinas tipo Th1, representado por altos valores de concentración de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , mientras que los títulos de IL-5 e IL-4, representativos de un patrón Th2, fueron muy bajos.



**Fig. 6.** Patrón de citoquinas determinado en células CD4+ purificadas de bazo de ratones hembras C57BL/6, inoculados con AFCo1-gD2, AFCo1+gD2 o gD2 sola por vía IN. Las células fueron estimuladas o no *in vitro* con gD2. La determinación fue realizada por citometría de flujo utilizando el kit CBA de inflamación de ratón y los resultados son expresados en pg/mL.

En las células CD4+ de los animales inoculados con la gD2 sola, así como las células CD4+ que no fueron estimuladas con gD2, los títulos de las citoquinas que se obtuvieron fueron significativamente inferiores ( $p < 0,001$ ) a los títulos obtenidos en las células CD4+ de los animales inoculados con AFCo1-gD2 o con el AFCo1+gD2 y que fueron estimuladas *in vitro* con la gD2 (Fig. 6).

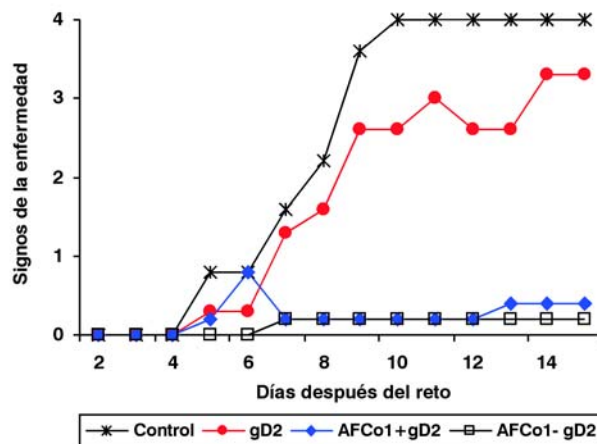
En general las formulaciones adyuvadas polarizaron la respuesta hacia un patrón Th1.

**Signos de la enfermedad viral después del reto.** Los animales inmunizados con AFCo1-gD2 o AFCo1+gD2 no manifestaron signos de la enfermedad; mientras que en los animales del grupo inoculado con gD2 sola y en los del grupo control se observaron signos severos de la enfermedad viral, llegando a alcanzar los valores más elevados en los animales del grupo control (Fig. 7).

**Protección frente al reto Vaginal con VHS-2.** Se observó protección en el 100% de los animales inmunizados con AFCo1-gD2 o con AFCo1+gD2 y solo de un 30% en los animales inoculados con la gD2 sola, mientras que en el grupo control (ratones no inoculados) no se observó ningún sobreviviente (Fig. 8). En general, se obtuvo protección total en las formulaciones adyuvadas; se confirmó las evidencias a nivel de signos de la enfermedad.

## Discusión

Los resultados obtenidos demostraron similares respuestas de IgG e IgG2c anti gD2 cuando se utilizó la gD2 coadministrada con el AFCo1 o cuando se utilizó la gD2 incorporada en la estructura del adyuvante. La administración simple de antígenos en los sitios de la mucosa ha demostrado ser ineficiente para la estimulación del sistema inmunológico



**Fig. 7.** Signos de la enfermedad en animales retados con la cepa 333 de VHS-2 e inoculados previamente con gD2, AFCo1-gD2 o AFCo1+gD2 por vía IN: 0, sanos; 1, eritema genital; 2, inflamación genital moderada; 3, lesión genital severa y purulenta y 4, parálisis de las extremidades traseras.

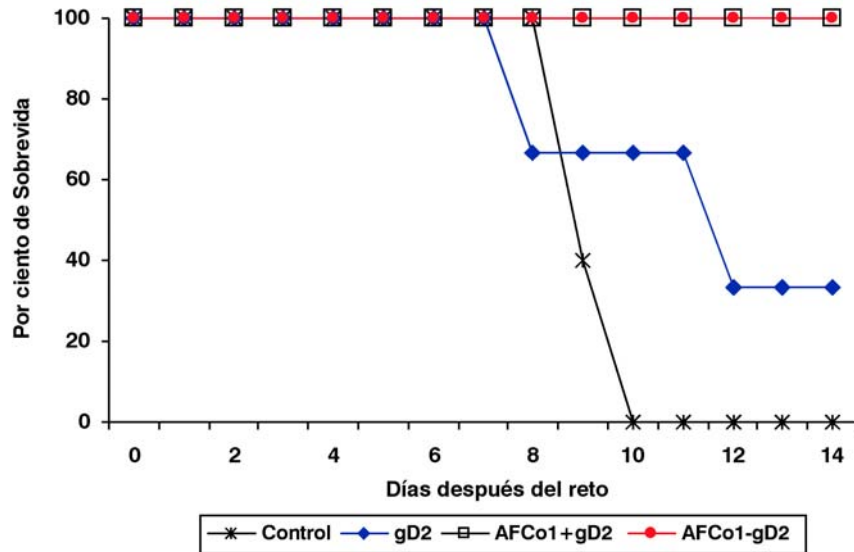
por su poca inmunogenicidad. Los adyuvantes mucosales pueden superar este problema y pueden mejorar su respuesta inmune. Sin embargo, en la actualidad pocos adyuvantes están licenciados para el uso de vacunas y ninguno está disponible para su aplicación en humanos.

Está reportado que el adyuvante en una formulación vacunal es un elemento clave para la inducción de una respuesta protectora (5). En estudios publicados recientemente (9, 13) quedó demostrada la posibilidad de obtener una formulación vacunal, con la que se podía generar elevados títulos de IgG (en suero y lavado vaginal) y subclases de IgG2c anti gD2, cuando esta glicoproteína era incorporada a la estructura del AFCo1 y administrada por vía IN en ratones.

También encontramos que la inmunización IN de ratones con la gD2 coadministrada con el AFCo1 genera una fuerte inmunidad mediada por células T antígeno-específica. Este tipo de respuesta quedó evidenciada en una potente respuesta proliferativa antígeno-específica, así como el claro patrón de respuesta tipo Th1, representado por la presencia de altos títulos de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en células T CD4+, purificadas del bazo de los animales inmunizados y estimuladas con gD2.

En esta respuesta Th1 tampoco se observaron diferencias cuando se utilizó la gD2 coadministrada o incorporada en el AFCo1. Además, se observó un 100% de protección en los animales que recibieron la gD2 coadministrada o incorporada, no siendo así en los animales que recibieron la gD2 sola.

Estos resultados están en concordancia con trabajos publicados por otros autores, donde se plantea que para lograr una protección contra el VHS-2 es clave obtener una respuesta inmune celular (5, 14); así como la importancia de



**Fig. 8.** Protección de animales inoculados por vía IN con gD2, AFCo1-gD2 o AFCo1+gD2 o animales no inoculados y retados con la cepa 333 de VHS-2.

inducir una respuesta de IFN- $\gamma$  en la protección contra infecciones con herpes genital (15-17).

Resultados de protección y respuesta celular similares a los nuestros son los obtenidos por Lindqvist M, et al (18), quienes observaron una respuesta celular caracterizada por un patrón de citoquinas tipo Th1, altos títulos de IgG e IgG2c, así como 100% de protección contra el reto con VHS-2, utilizando el  $\alpha$ -Galactosylceramide como adyuvante de la gD2.

Otro aspecto a tener en cuenta son las ventajas que implicaría tener una formulación de gD2 que no necesite ser incluida en la estructura del AFCo1 para ser igualmente efectiva. Estas ventajas pueden resumirse en: el proceso de obtención de la formulación vacunal es más sencillo con la gD2 coadministrada que con la gD2 incluida en el AFCo1, ya que en el primer caso solo hay que mezclar el AFCo1 con la gD2 y en el otro hay que incorporar la gD2 en la estructura del cocleato.

La analítica de un producto coadministrado es más sencilla que la de un antígeno incluido en la estructura coclear, ya que cuando se incluye la gD2 en la estructura del AFCo1 hay que evaluar el porcentaje de inclusión y garantizar que este sea elevado, que el proceso de inclusión sea consistente, eficiente y que la formulación AFCo1-gD2 sea estable; lo que no se requiere cuando la gD2 es coadministrada, ya que conociendo la estabilidad del AFCo1 como adyuvante solo queda conocer la estabilidad de la gD2.

En el presente trabajo se concluye que al emplear el AFCo1 como adyuvante coadministrado con la gD2 se pueden obtener altos títulos de IgG e IgG2c y una respuesta celular de tipo Th1, con un 100% de protección de los animales retados con el VHS2, por lo que quedó demostrado que el

AFCo1+gD2 puede ser utilizado por vía IN como un potencial candidato vacunal contra VHS-2.

## Referencias

- McCluskie MJ, Cartier JLM, Patrick AJ, Sajic D, Weeratna RD, Rosenthal KL, et al. Treatment of intravaginal HSV-2 infection in mice: A comparison of CpG oligodeoxynucleotides and resiquimod (R-848). *Antiviral Research* 2006;69:77-85.
- O'Farrell N. Increasing prevalence of genital herpes in developing countries: implications for heterosexual HIV transmission and STI control programmers. *Sex Transm Infect* 1999;75:377-84.
- Koelle DM, Corey L. Recent progress in herpes simplex virus immunobiology and vaccine research. *Clin Microbiol* 2003;16(1):96-113.
- Roizman B, Knipe DM. Herpes simplex viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2001. p. 2399-2459.
- Stanberry LR. Clinical trials of prophylactic and therapeutic Herpes Simplex Virus vaccine. *HERPES* 2004;11(Supp 3):161A-169A.
- Pérez O, Lastre M, Cabrera O, del Campo J, Bracho G, Cuello M, et al. New Vaccines Require Potent Adjuvants like AFPL1 and AFCo1. *Scandinavian Journal of Immunology* 2007;66:271-7.
- Pérez O, Lastre M, Bracho G, del Campo J, Zayas C, Acevedo R, et al. Natural Neisseria derive proteoliposome and cocleate as potent vaccine adjuvants. *Pharmacology Online* 2006;3:762-4.
- Pérez O, Lastre M, Cabrera O, del Campo J, Bracho G, Cuello M, et al. New vaccines require potent adjuvants like AFPL1 and AFCo1. *Scand J Immunol* 2007;66(2-3):271-7.

9. Del Campo J, Lindqvist M, Cuello M, Bäckström M, Cabrera O, Persson J, et al. Intranasal immunization with a proteoliposome-derived cochleate containing recombinant gD protein confers protective immunity against genital herpes in mice. *Vaccine* 2010;28:1193-1200.
10. Harandi AM, Eriksson K, Holmgren J. A protective role of locally administered immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide in a mouse model of genital herpes infection. *J Virol* 2003;77:953-62.
11. Tengvall S, Josefsson A, Holmgren J, Harandi AM. CpG oligodeoxynucleotide augments HSV-2 glycoprotein D DNA vaccine efficacy to generate T helper 1 response and subsequent protection against primary genital herpes infection in mice. *Journal of Reproductive Immunology* 2005;68:53-69.
12. Tengvall S, Lundqvist A, Eisenberg RJ, Cohen GH, and Harandi AM. Mucosal Administration of CpG Oligodeoxynucleotide Elicits Strong CC and CXC Chemokine Responses in the Vagina and Serves as a Potent Th1-Tilting Adjuvant for Recombinant gD2 Protein Vaccination against Genital Herpes. *Journal of Virology* 2006;80:5283-91.
13. Cabrera O, Cuello M, Thörn K, Lindqvist M, Lastre M, González E, et al. Influencia de las vías de inmunización mucosales sobre la protección contra Herpes Simple tipo 2 con el AFCo1 como adyuvante. *VacciMonitor* 2011;20(3):14-20.
14. Cattamanichi A, Posavad CM, Wald A, Baine Y, Moses J, Higgins TJ, et al. Phase I Study of a Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2) DNA vaccine administered to healthy, HSV-2-seronegative adults by a needle-free injection system. *Clinical and Vaccine Immunology* 2008;15:1638-43.
15. Harandi AM, Svennerholm B, Holmgren J, Eriksson K. Differential roles of B cells and IFN-gamma-secreting CD4(+) T cells in innate and adaptive immune control of genital herpes simplex virus type 2 infection in mice. *J Gen Virol* 2001;82:845-53.
16. Parr MB, Parr EL. The role of gamma interferon in immune resistance to vaginal infection by herpes simplex virus type 2 in mice. *Virology* 1999;258(2):282-94.
17. Milligan GN, Bernstein DI. Interferon-gamma enhances resolution of herpes simplex virus type 2 infection of the murine genital tract. *Virology* 1997;229(1):259-68.
18. Lindqvist M, Persson J, Thorn K, and Harandi AM. The Mucosal Adjuvant Effect of  $\alpha$ -Galactosylceramide for Induction of Protective Immunity to Sexually Transmitted Viral Infection. *J Immunol* 2009;182:6435-43.

---

## **gD2 coadministered with AFCo1 by intranasal route induces protective immunity against Virus Herpes Simplex type 2 in mice**

### **Abstract**

Sexually transmitted infections by Herpes Simplex Virus type 2 (HSV-2) are the leading cause of genital ulcers and a major public health problem worldwide. This requires the use of mucosal vaccines, because parenteral vaccines have not been successful. Presently, there are not mucosal adjuvants, for this reason the development of adjuvants is essential for mucosal vaccine strategies. The intranasal (IN) immunizations using HSV-2 glycoprotein D (gD2), coadministered with cochleate (AFCo1+gD2), would be an efficient candidate for future vaccines against HSV2, similar to the gD2 incorporated into AFCo1 (AFCo1-gD2). Female C57Bl/6 mice were inoculated with AFCo1-gD2, AFCo1+gD2 or gD2 alone by IN route. The anti gD2 IgG in sera and vaginal fluids and IgG subclasses were measured by ELISA. The lymphoproliferative response in spleen cells, the Th1/Th2 cytokine profile, the protection and the signs of disease against viral challenge were measured. High titers of IgG and IgG2c subclasses were observed in sera of mice that received the gD2 and AFCo1 as adjuvant. No significant differences ( $p > 0.005$ ) were observed in the animals that received AFCo1+gD2 or AFCo1-gD2. A preferential Th1 cytokine profile and 100% of survival after challenge were observed in both groups that received the gD2 and AFCo1, while no survival was observed in the group that only received the gD2. These results showed that the gD2 can be used coadministered with AFCo1 by IN route as a potential vaccine candidate against HSV-2.

**Keywords:** Herpes, HSV, gD2, AFCo1, intranasal immunization, adjuvant.

---