

RESEÑA

SINTESIS QUIMICA DE PEPTIDOS PARA EL INMUNODIAGNOSTICO DEL HTLV Y HIV

Lic. Milenen Hernández Marín, Investigador Auxiliar.

Departamento Síntesis de Péptidos, Centro de Inmunoensayo, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

8 de julio del 2004.

TRABAJO PRESENTADO EN OPCION AL GRADO CIENTIFICO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS.

El desarrollo de la proteómica y la genómica ha permitido la búsqueda de péptidos potencialmente útiles como reactivos biológicos y de considerable importancia en las investigaciones en el área de las ciencias médicas y naturales. A raíz de ello, la síntesis de péptidos se ha aplicado actualmente para la identificación y caracterización de determinantes antigénicos en las proteínas, para el desarrollo de vacunas obtenidas por métodos no convencionales, así como antígenos específicos en ensayos de diagnóstico para la detección de anticuerpos contra determinados agentes etiológicos.

En 1963 Robert B Merrifield revolucionó la síntesis de péptidos mediante el desarrollo de la síntesis en fase sólida lo que permitió que se incrementara la obtención de péptidos en el mundo entero de forma vertiginosa para su empleo en las ciencias biomédicas fundamentalmente.

Una de las aplicaciones más importantes de los péptidos es como antígenos en el desarrollo de ensayos diagnósticos. El procedimiento más empleado para localizar los determinantes antigénicos en las proteínas es mediante inmunoensayos heterogéneos de tipo indirecto, que requieren la adsorción de los péptidos sintéticos a una fase sólida. Sin embargo, la mezcla de dos o más antígenos en esta, puede afectar la sensibilidad y especificidad de los ensayos, debido a la competencia por la adsorción a la fase sólida y por los cambios que se presentan en la distribución espacial de los determinantes antigénicos en los péptidos adsorbidos. Por tal motivo, hoy día existe la tendencia al uso de péptidos sintéticos quiméricos, moléculas que presentan en su composición, varios epítomos inmunodominantes, lo que garantiza que el péptido adquiera una estructura espacial semejante a la nativa y se garantice una eficiente adsorción a la fase sólida.

Los péptidos sintéticos son ampliamente utilizados en pruebas diagnósticas para la detección de anticuerpos al virus de la inmunodeficiencia humana (*Human Immunodeficiency Virus, HIV*) y al virus linfotrópico de las células T humanas (*Human T-cell Lymphotropic Virus, HTLV*), lo que permite el incremento de la sensibilidad de los ensayos sin afectar la especificidad.

El objetivo fundamental del trabajo fue, obtener mediante síntesis química, en fase sólida, péptidos quiméricos, no descritos, correspondientes a secuencias antigénicas de las proteínas del núcleo, de la transmembrana y de la envoltura del *HIV* 1 y 2 y *HTLV-I/II* y llevar a cabo la evaluación inmunológica, de los péptidos sintetizados para ser utilizados, posteriormente, como antígenos en ensayos para la detección de anticuerpos específicos a estos agentes etiológicos, en la certificación de la sangre de donantes y en la vigilancia epidemiológica.

Para alcanzar este objetivo general fue necesario cumplir los objetivos específicos siguientes: seleccionar, sintetizar y evaluar péptidos monoméricos de las regiones inmunodominantes del núcleo, de la transmembrana y de la envoltura de los virus del *HTLV-I/II* y del *HIV* 1 y 2; diseñar, sintetizar, caracterizar y evaluar péptidos quiméricos, no descritos, que presentan dos regiones inmunodominantes, de comprobada reactividad, para la detección de los virus de *HTLV-I/II* y *HIV* 1 y 2; estudiar la influencia que ejerce el orden de ubicación de los epítomos en los péptidos quiméricos sobre su antigenicidad. Por último, proponer una formulación de antígenos peptídicos sintéticos para la detección del virus del *HTLV-I/II*.

En el trabajo, se sintetizaron péptidos correspondientes a diferentes proteínas de los virus *HIV* 1 y 2 y *HTLV* I y II. Para el *HIV* se obtuvieron los péptidos monoméricos siguientes: proteína p24 (C-14 y C-15), proteína gp41 (A y H-18) y proteína gp120 [gp120 (3) y C-12] del *HIV*-1 y de la proteína gp36 (gp36 (5)) del *HIV*-2.

Además, se sintetizaron péptidos quiméricos que comprendían dos regiones muy antigénicas del virus: péptido quimérico de la proteína p24 (PQ1 y PQ2), péptidos quiméricos de las proteínas gp41 y gp120 [Q (C-1), Q(C-1-1), Q (C-15), Q (C-15-1), Q (C-16), Q(C-16-1)].

Para el *HTLV*-I y II se sintetizaron los péptidos monoméricos siguientes: proteína p19 [p19 (G) y p19 (3)], proteína gp46 (gp46 (D-4), gp46 (D-5), gp46 (D-16-1), gp46 (D-17-1), gp46 (H)) y proteína gp21 [gp21 (13), gp21 (M-1) y gp21 (M-2)]. También se sintetizaron péptidos quiméricos que combinaban dos secuencias antigénicas de dos regiones del virus: de las proteínas p19 y gp46 (*HTLV*-I) (Q-1, Q-2, Q-3[®], Q-4[®], Q-5, Q-6, Q-7[®] y Q-8[®]) y de las proteínas p19 y gp46 (*HTLV*-II) (Qm1 y Qm2), de las proteínas gp21 y gp46 (*HTLV*-I) (QQ3 y QQ4) y de las proteínas gp21 y gp46 (*HTLV*-II) (QQ5 y QQ6).

Todos los péptidos se purificaron por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), con lo que se obtuvo más de un 90 % de pureza para cada péptido. Posteriormente, los péptidos se caracterizaron por espectrometría de masas con ionización por *electrospray* (ESI-MS) y con desorción e ionización por láser auxiliado por matriz (MALDI-Tof) y se encontró que las masas moleculares registradas en los espectros se correspondieron con las calculadas teóricamente.

Se empleó la prueba exacta de Fisher para valorar las diferencias de reactividad de cada péptido dentro del conjunto de suero control utilizado. Todos los resultados fueron procesados con el paquete estadístico *Statística* 6.0 para Windows.

La detección del virus de *HIV* se realizó mediante la mezcla de diferentes regiones inmunodominantes del virus con el objetivo de incrementar el espectro de identificación de los anticuerpos.

Se conoce que la antigenicidad de un péptido sintético se puede incrementar si se combinan dos o más zonas inmunodominantes de la proteína natural, para formar lo que es llamado *péptido quimérico*.

Uno de los objetivos del trabajo fue la síntesis de péptidos quiméricos de *HIV* de la proteína p24 y de secuencias combinadas de las glicoproteínas gp41-120.

Con el objetivo de obtener epítomos conformacionales de la proteína p24 se decidió sintetizar péptidos quiméricos aún no descritos.

La reactividad de los péptidos quiméricos y monoméricos independientes y de la mezcla de los últimos, se evaluó frente a muestras positivas al *HIV-1* procedentes de un Sanatorio y se empleó como control la proteína recombinante p24 (Heber Biotec, Ciudad de La Habana).

Los resultados de la evaluación de los péptidos no fueron satisfactorios. Esto se pudo deber, posiblemente, a que los péptidos son débilmente adsorbidos a la fase sólida, y(o) los péptidos quiméricos no logran simular la conformación espacial de los epítomos cuando se unen a la fase sólida.

Teniendo en cuenta la carga de los péptidos y con el objetivo de dilucidar cuál es el factor que afecta los resultados de su evaluación, se decidió cambiar la fase sólida de las placas ELISA por placas de poliestireno recubiertas con poli-L-lisina. Debido a que la adsorción de los péptidos a las placas debe ser mayor, ya que la carga positiva que confiere el policatión de poli-L-lisina a la superficie de la fase sólida debía aumentar la participación de las interacciones electrostáticas en la adsorción de los péptidos cargados negativamente durante la etapa de recubrimiento en las placas *ELISA*.

En este caso, la reactividad de los péptidos quiméricos, de los monoméricos y de la mezcla de estos aumentó significativamente ($p < 0,01$), cuando se utilizó como fase sólida placas de poliestireno recubiertas con poli-L-lisina en comparación con las placas *UMELISA*.

Si bien, la adsorción de los péptidos se incrementó al emplear poli-L-lisina, la antigenicidad de los péptidos quiméricos no resultó superior que la de los péptidos monoméricos que la originan (igual nivel de significación).

Resulta de sumo interés en el diagnóstico, la síntesis de péptidos quiméricos que reúnan en sus secuencias regiones inmunodominantes de las proteínas gp41 y gp120 debido a las características inmunológicas de cada proteína *per se*.

Teniendo en cuenta este interés se diseñaron y sintetizaron seis péptidos quiméricos, no descritos que combinaban las secuencias de las regiones 585-613 y 589-623 de la proteína gp41, reportadas como zonas de gran inmunodominancia, con diferentes secuencias antigénicas de la proteína gp120 de la envoltura del *HIV-1*.

La antigenicidad de los péptidos quiméricos y monoméricos independientes, de la mezcla de estos últimos y de las proteínas recombinantes gp 41 y gp 120, se probó en un ensayo *UMELISA* mediante el empleo de muestras positivas al *HIV-1*, procedentes de los paneles PRB-106, PRB-952 y muestras positivas al *HIV-1/2* del panel combinado PRZ-204 (*Boston Biomedica Inc, BBI*).

Los péptidos quiméricos resultan, de manera general, más antigénicos que los péptidos monoméricos que los conforman y que las mezclas de ellos. El péptido quimérico Q(C-15), resultó la quimera de mayor antigenicidad ($p < 0,01$).

Otro de los objetivos de este trabajo fue seleccionar una secuencia inmunodominante de la región *N*-terminal de la proteína gp36 del *HIV-2*.

La antigenicidad del péptido gp36 se evaluó, mediante el empleo de muestras positivas al *HIV-2* del panel combinado *HIV-1/2* PRZ-204 (*BBI*) y cinco muestras positivas al *HIV-2* procedentes del Centro de Investigaciones del SIDA (LISIDA). El péptido presentó una elevada reactividad frente a las muestras positivas evaluadas y un 100 % de especificidad frente a muestras positivas al *HIV-1*.

El virus *HTLV* presenta proteínas de las regiones del núcleo, la transmembrana y la envoltura, con diferente grado de antigenicidad. Las proteínas p19 del núcleo y gp46 de la envoltura son antígenos virales predominantes que estimulan la producción de anticuerpos en los individuos infectados con *HTLV-III*. Con el objetivo de obtener un péptido que contuviera dos representaciones inmunodominantes de las proteínas p19 y gp46 para la detección del virus del *HTLV-I* y *HTLV-II* se sintetizaron 10 péptidos quiméricos, no descritos, (ocho para *HTLV-I* y dos para *HTLV-II*), en los cuales se alternaron el orden de los epítomos seleccionados. Se conocen reportes de la obtención de anticuerpos contra aislamientos del *HTLV-I*, en los que en la posición 192 de la proteína gp46 está presente el aminoácido prolina (P) por serina (S) en la proteína. En el trabajo se tuvo en cuenta esta sustitución con el objetivo de estudiar el efecto del cambio del aminoácido P (no polar), por el aminoácido S (polar) sobre la antigenicidad de los péptidos frente a las muestras evaluadoras.

La actividad biológica de los péptidos quiméricos y monoméricos independientes y de la mezcla de estos últimos, se evaluó con muestras del panel PRP-205 (*BBI*) y siete muestras positivas al *HTLV-I* del LISIDA.

Los péptidos quiméricos más antigénicos para el *HTLV-I* fueron el Q-1 y el Q-2. Al comparar los resultados entre ellos, se observó que en el caso del péptido Q-2, se presenta una mayor reactividad contra las muestras del *HTLV-II* que el péptido quimérico Q-1 (aunque no se encontraron diferencias significativas).

Al analizar los resultados obtenidos en la evaluación de los péptidos Q-3[®] y Q-4[®], que contienen el A.a. serina (polar) por el A.a. prolina (no polar) en la posición 192 de la secuencia de la proteína gp46, se observó que presenta una menor reactividad que sus homólogas Q-1 y Q-2 que contienen el aminoácido P, pero estadísticamente no hay diferencias significativas.

Con el objetivo de incrementar la sensibilidad de los ensayos, se aumentó el número de aminoácidos en la secuencia de la proteína gp46 de los péptidos Q-1 y Q-2, lo que dio origen a sus homólogos Q-5 y Q-6. Estos péptidos, aumentados en 13 A.a., conservaron la zona inmunodominante de la secuencia de la proteína gp46. Contrario a lo esperado, la antigenicidad de los péptidos Q-5 y Q-6 disminuyó significativamente ($p < 0,05$) con respecto a Q-1 y Q-2. Este resultado sugiere que los péptidos Q-1 y Q-2 se encuentran unidos adecuadamente a la fase sólida y que al incrementarse el número de residuos de aminoácidos la conformación espacial de la molécula debe cambiar y los determinantes antigénicos pueden quedar ocluidos, dificultándose su reconocimiento por los anticuerpos. De manera similar que los péptidos Q-3[®] y Q-4[®], en los péptidos Q-7[®] y Q-8[®], homólogos de los péptidos Q-5 y Q-6, se sustituyó el aminoácido P por el aminoácido S en la posición 192 del péptido gp46. Los resultados entre ellos no fueron significativamente diferentes.

En el caso del par quimérico correspondiente al *HTLV-II* (Qm-1 y Qm-2), el péptido de mayor antigenicidad fue el Qm-2, aunque estadísticamente, no se observaron diferencias significativas. Con el objetivo de tratar de unir dos zonas inmunodominantes representativas de la proteína precursora de la envoltura se sintetizaron cuatro péptidos quiméricos, aún no descritos, formados por secuencias antigénicas, de las proteínas gp21 y gp46. Se obtuvieron dos péptidos de secuencias del virus tipo I (QQ3 y QQ4) y dos del virus del tipo II (QQ5 y QQ6). Las quimeras sintetizadas, en cada caso, fueron obtenidas con su homóloga inversa. Los péptidos quiméricos QQ3, QQ4, QQ5 y QQ6 se evaluaron frente a las muestras positivas del panel PRP-205 (*BB1*) y con muestras positivas al *HTLV-I* (*LISIDA*).

Al comparar los resultados obtenidos entre las quimeras y los péptidos monoméricos que las conforman para el tipo I, la antigenicidad de la quimera QQ3 resultó significativamente superior. Entre las quimeras QQ3 y QQ4 no hubo diferencias significativas ($p = 0,07 \cong 0,05$) a pesar que QQ3 presenta una mayor antigenicidad (94 y 67 %, respectivamente).

En el par QQ5/QQ6 para la detección del *HTLV-II*, el péptido QQ5 es el más reactivo, aunque su nivel de significación es insuficiente ($p = 0,192$).

En el trabajo se corroboró, mediante los ensayos de evaluación de la antigenicidad de los péptidos monoméricos (C-14 y C-15) y quiméricos (PQ1 y PQ2) y la proteína recombinante p24 del *HIV-1* en placas de poliestireno irradiada con rayos g y recubiertas con poli-L-lisina, mediante los ensayos UMELISA®, que la antigenicidad de la proteína p24 del virus *HIV-1* es dependiente de la conformación espacial.

Mediante los ensayos UMELISA®, se demostró que el péptido quimérico Q(C-15) constituido por regiones inmunodominantes de las proteínas gp41 y gp120 del virus de *HIV-1*, es significativamente antigénico que los péptidos monoméricos que los conforman.

Se determinó mediante los ensayos UMELISA® que el factor que significativamente influye sobre la antigenicidad en los péptidos quiméricos Q-1/Q-2 y Q-5/Q-6 contra Q-3*/Q-4* y Q-7*/Q-8*, formados por secuencias de las proteínas p19 y gp46 del virus tipo I, es el incremento del número de aminoácidos (de 18 a.a a 31 a.a, en la secuencia de la gp46) entre los pares de los péptidos y no el cambio de aminoácido prolina (A.a. no polar, en la secuencia de la gp 46,) por el aminoácido serina (A.a. polar). En el estudio de antigenicidad de los péptidos monoméricos y quiméricos del *HIV-1*, *HIV-2*, *HTLV-I* y *HTLV-II*, se encontró que las mezclas antigénicas formadas por los péptidos sintéticos: quimérico Q-2 (gp46-p19, *HTLV-I*), quimérico QQ-5 (gp21-gp46) (*HTLV-II*) y gp21(13) (*HTLV-I*) y la mezcla de los péptidos: quimérico Q(C-15) (gp41-gp120, *HIV-1*), gp36 (*HIV-2*) y la proteína recombinante p24 (*HIV-1*) son significativamente sensibles y específicos para la detección de los anticuerpos al *HTLV-I/II* y *HIV-1/2*, respectivamente.

La tesis doctoral está dividida en Introducción, y tres capítulos dedicados a: Revisión Bibliográfica, Materiales y Métodos y Resultados y Discusión, seguido de las Conclusiones y Recomendaciones. Cuenta con un total de 44 tablas, 21 figuras, 254 referencias bibliográficas y 9 anexos. Cada uno de ellos, describe después de una introducción, los aspectos siguientes: virus de la inmunodeficiencia humana (estructura del virus, homología entre los virus *HIV1* y 2; virus linfotrópico de las células T humanas (estructura del virus, homología entre los virus *HTLV I* y *II*), detección de los virus *HIV* y *HTLV*; los ensayos *ELISA* y los factores que influyen en la eficiencia (fase sólida en los ensayos *ELISA*, tipos de fase sólida; biomoléculas (péptidos sintéticos del *HIV* y *HTLV*); péptidos quiméricos y multiantígenos (MAP) empleados en los ensayos biológicos. Los materiales y métodos incluyen la descripción detallada de la síntesis química de los péptidos en fase sólida, así como la purificación de estos por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) y la caracterización por espectrometría de masas con ionización por *electrospray* (ESI-MS) y MALDI-Tof de los péptidos sintetizados. Además, se describe la herramienta estadística usada. En los resultados se plantean los péptidos con mayor reactividad frente a las muestras positivas caracterizadas.

En la tesis se presentan 11 publicaciones de la autora relacionadas con los resultados presentados en la tesis, ocho de ellas, publicadas en revistas de alto factor de impacto. Un registro de diagnosticador. Los resultados de este trabajo han sido presentados en dos foros nacionales y en 9 internacionales.

La Oficina Cubana de la Propiedad Industrial otorgó dos patentes relacionadas con el tema de la tesis y otra más, está solicitada.

Parte de los resultados fueron sometidos en 2002 a un Comité de Expertos de la Academia de Ciencias de Cuba, el cual les otorgó el Premio Anual de la Academia de Ciencias de ese año.

La novedad científica del trabajo radica en que se sintetizan péptidos quiméricos aún no descritos que permiten detectar anticuerpos contra ambos virus, por lo que pueden ser utilizados como antígenos para el diagnóstico y estudios asociados a las patologías que provocan.

La importancia práctica del trabajo radica en que estableció la metodología de síntesis de péptidos quiméricos a utilizar como antígenos en el diagnóstico inequívoco y reproducible de los virus de *HTLV-I/II* y *HIV 1* y 2. Lo anterior condujo a un importante abaratamiento de los estuches de diagnóstico a utilizar con la Tecnología SUMA que para estos fines desarrolla el Centro de Inmunoensayo. Como es conocido por medio de esta tecnología se realiza el pesquisaje masivo de diferentes agentes etiológicos de enfermedades infecciosas.