

# Péptidos sintéticos para el inmunodiagnóstico de retrovirus humanos

Milenen Hernández Marin,<sup>1</sup> María Elena Selles León,<sup>1</sup>  
Yadaris Márquez Bocalandro,<sup>1</sup> Lilliam Pozo Peña,<sup>1</sup> René Vázquez Vallejo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Inmunoensayo. Calle 134 y Ave. 25, Cubanacán, Playa. AP 6653,  
Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: iqpeptidos@cie.sld.cu

<sup>2</sup>Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba.

## RESUMEN

El virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y el virus Linfotrópico de las Células T Humanas (HTLV) son retrovirus humanos; el VIH pertenece a la subfamilia *Lentivirinae* y el HTLV a la subfamilia *Oncovirinae*. Las proteínas antigénicas, obtenidas por la tecnología del ADN recombinante y por síntesis química, son muy utilizadas en el diagnóstico del VIH y el HTLV. En este sentido, los péptidos sintéticos se aplican en estos ensayos por la elevada sensibilidad y especificidad que aportan a los mismos. En el presente trabajo se obtuvieron mediante síntesis química en fase sólida péptidos monoméricos de las regiones del núcleo, transmembrana y la envoltura del VIH-1 y 2 y el HTLV-I/II y nuevos péptidos quiméricos que combinan las secuencias más antigénicas de diferentes regiones de los virus, separadas por dos glicinas como brazo espaciador. La antigenicidad de los péptidos del VIH, se evaluó frente a muestras positivas procedentes de Paneles de Seroconversión, Mixto y de bajo título (Boston Biomedica Inc) y muestras de seropositivos cubanos al VIH-1, y la antigenicidad de los péptidos del HTLV frente al Panel PRP-205 (Boston Biomedica Inc) y muestras de seropositivos cubanos al HTLV-I. La especificidad de todos los péptidos fue del 100%. Se demostró que los péptidos quiméricos pueden ser utilizados como antígenos para detectar anticuerpos contra más de una proteína simultáneamente y que la eficiencia de la detección es dependiente del orden de las secuencias en el péptido. Los resultados obtenidos demostraron la antigenicidad de los péptidos sintetizados, siendo mayor en los péptidos quiméricos, y su utilidad como antígenos en el desarrollo de ensayos de diagnóstico para la detección de anticuerpos al HTLV-I/II y al VIH-1 y 2.

## Introducción

Los retrovirus [1] se clasifican en tres subfamilias *Oncovirinae*, *Lentivirinae* y *Spumavirinae*. Dentro de la subfamilia *Oncovirinae* encontramos el Virus Linfotrópico de las Células T humanas tipo I (HTLV-I), cuyos integrantes suelen provocar proliferación celular, este fue el primer retrovirus linfotrópico humano identificado, aislado en 1978 de un paciente con un linfoma cutáneo de células T e informado en 1980 por el Dr Robert Gallo y colaboradores [2, 3]. El HTLV-II se aisló por primera vez de un paciente con una variante de Leucemia de células pilosas y se publicó en 1982 [4].

El genoma de los virus HTLV-I/II está compuesto al menos por tres genes estructurales y dos genes reguladores, más las terminales largas repetidas.

Los genes estructurales están representados por el gen gag (antígeno de grupo), que codifica la proteína p55 precursora de las proteínas p19, p24 y p15 que son las proteínas que constituyen el núcleo, el gen pol (polimerasa) que codifica las enzimas necesarias para la replicación viral y el gen env (envoltura) que codifica la proteína gp 62 precursora de las proteínas gp46 y gp21, siendo la primera una proteína de superficie y la segunda una proteína de transmembrana [5].

Perteneciente a la subfamilia *Lentivirinae* se encuentra el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) [6], agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA), es un lentivirus cuya estructura genética está formada, al igual que el resto de los retrovirus, por genes estructurales (gag, pol, env) y genes reguladores (nef, tat, rev, vpr, vpu, vif).

El gen gag codifica la síntesis de las proteínas del núcleo p17 y p24, que constituyen la estructura cen-

tral del virus y el gen env codifica la síntesis de las proteínas de la envoltura del virus a través de un precursor, la glicoproteína gp160, que no es un componente estructural, sino que se produce durante la infección, pero luego se degrada para formar las glicoproteínas estructurales de la envoltura gp41 [7] y gp120 [8]. La proteína gp 36 es la más utilizada para el diagnóstico del VIH-2.

La presencia de anticuerpos contra los antígenos de la envoltura es sumamente importante para el diagnóstico de la infección por VIH y por lo menos un componente de esta región debe ser detectado para confirmar la infección.

La síntesis de péptidos en fase sólida reportada por Robert Bruce Merrifield en el año 1963 [9], ha sido aplicada en un gran número de laboratorios y su uso se ha extendido a numerosas áreas de las ciencias médicas y naturales. Estos péptidos son ampliamente utilizados en la actualidad para la identificación y caracterización de determinantes antigénicos en las proteínas, para la obtención de anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra secuencias de proteínas específicas, para el desarrollo de vacunas obtenidas por métodos no convencionales, así como antígenos específicos en ensayos de diagnóstico para la detección de anticuerpos contra determinado agente etiológico [10].

Los inmunoensayos heterogéneos de tipo indirecto son los más empleados para localizar los determinantes antigénicos en las proteínas y requieren la adsorción de péptidos sintéticos a una fase sólida. Sin embargo la mezcla de dos o más antígenos en esta fase, puede afectar la sensibilidad y especificidad de

1.- Wain-Hobson S. Retroviruses. Science, 282, 55, 1998.

2.- Poesz BJ, Ruscetti F, Gasdar AF, Bunn PA, Hinna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci USA, 77,7415,1980.

3.- Gallo RC. The first human retrovirus. Sci Am,234,88, 1986.

4.- Kalyanaramon VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associate with T a cell variant of hairy cell leukemia. Science, 218, 571, 1982.

5.- Delamarre L, Pique C, Pham D, Tursz J, and Dokhelar MC. Identification of functional regions in the human T-cell leukemia virus type I SU glycoprotein. J Virol, 68, 3544, 1994.

6.- Barre Sinoussi F, Chermann J.C., Rey F, Nugeyre M.T., Chamaret S., Gruest J., et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Science, 220, 868, 1983

7.- Calarota S., Jansson M., Levi M., Broliden K., Libonatti O., Wigzell H., et al. Immunodominant glycoprotein 41 epitope identified by seroreactivity in HIV type-1 infected individuals. AIDS-Res-Hum-Retroviruses, 8, 705, 1996.

8.- Wyatt R., Kwong PD., Desjardins E., Sweet R.W., Robinson J., Hendrickson W.A. and Sodroski J.G. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. Nature, 393, 705, 1998.

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 en la actualidad se ha incrementado el uso de péptidos sintéticos quiméricos [11], moléculas que presentan en su composición, por ejemplo, dos o más secuencias de proteínas de dos virus diferentes o de proteínas diferentes de un mismo virus, lo que garantiza que el péptido adquiera una estructura espacial semejante a la natural y al mismo tiempo se logre una eficiente adsorción a la fase sólida.

El objetivo del presente trabajo consiste en la obtención mediante síntesis química en fase sólida de péptidos monoméricos y nuevos péptidos quiméricos correspondientes a secuencias antigénicas de las proteínas del núcleo, transmembrana y la envoltura del VIH-1 y 2 y HTLV I/II para ser utilizados 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.

## Materiales y Métodos

Todos los péptidos fueron obtenidos mediante síntesis química en fase sólida, empleando la estrategia Boc en bolsas de polipropileno. Las reacciones de acoplamiento se realizaron por activación del grupo carboxilo de cada aminoácido por el método de la carboxiimida y fueron verificadas por el ensayo cualitativo de la ninhidrina. El grupo *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) fue eliminado con ácido trifluoroacético (TFA) al 37,5% en Diclorometano (DCM) y se neutralizó la sal del TFA con dietilisopropilamina (DIEA) al 5% en DCM.

La desprotección final de todos los péptidos se realizó mediante el procedimiento conocido como "Low-High HF", utilizando ácido fluorhídrico, para eliminar los grupos protectores de las cadenas laterales y la ruptura del enlace péptido-resina. Posteriormente, las bolsas se lavaron con éter dietílico y se secaron al vacío. Se extrajeron los péptidos de la resina con ácido acético al 30% en agua destilada. El extracto final se diluyó con agua y se liofilizó. Los péptidos se purificaron por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-Fase Reversa) [12] y se caracterizaron mediante Espectrometría de Masas con ionización por Electrospray (ESI-MS) [13].

La actividad biológica de los péptidos se determinó mediante un ensayo UltramicroELISA (UMELISA) de tipo indirecto, para la detección de anticuerpos a los virus VIH y HTLV. Se utilizaron muestras positivas caracterizadas de Paneles de la Boston Biomedica Inc y de seropositivos cubanos al VIH-1 y HTLV-1.

Para el estudio de especificidad de los péptidos sintetizados se utilizó un total de 1021 muestras de donantes de sangre pertenecientes al Banco de Sangre de Marianao.

## Resultados y Discusión

Se obtuvieron péptidos sintéticos monoméricos correspondientes a regiones antigénicas del núcleo (p24) (C-14 y C-15), de la región de transmembrana (gp41) (H-18 y A) [14] y de la envoltura (gp120) (P-3, Lazo

V3 y C-12) del VIH-1. Los péptidos resultaron antigénicos en la prueba por separado pero no detectaron algunas muestras por lo que se decidió sintetizar péptidos quiméricos que contenían en una misma secuencia dos de estos péptidos monoméricos, en dos posibles ordenes y separados por dos Glicinas (G) como brazo espaciador. Se obtuvieron diez péptidos quiméricos: PQ-1 (C-14-GG-C15), PQ-2 (C-15-GG-C-14) [15], Q-1(A-GG-P-3), Q-2(P-3-GG-A), C-15(H-18-GG-P-3), C-15-1(P-3-GG-H-18) [16], C-16 (H-18-GG-C-12), C-16-1(C-12-GG-H-18), C-17 (H-18-GG-LazoV3), C-18 (LazoV3-GG-H-18). El péptido quimérico C-15 resultó el más antigénico frente a todas las muestras positivas, como se observa en la Figura 1.

Se sintetizó un péptido monomérico perteneciente a la región de transmembrana gp 36 del VIH-2, el cual demostró ser altamente sensible y específico a todas las muestras del Panel de Boston Biomédica Mixto de tipo II. Este resultado es de gran importancia debido a que se ha reportado homología entre las secuencias de las proteínas de la envoltura del VIH-1 y 2 por lo que este péptido facilitaría la diferenciación entre los dos tipos del VIH.

Se sintetizaron seis péptidos monoméricos correspondientes a regiones antigénicas del HTLV (M1, M2, M3, M4, M5 y M6), donde M1 se corresponde con la proteína p19 del HTLV-1, M2 corresponde con la proteína p19 del HTLV-II, M3 con la proteína gp46 del HTLV-I, M4 proteína gp46 del HTLV-II, M-5 proteína gp21 del HTLV-I y M-6 proteína gp21 HTLV-II, además se obtuvieron 13 péptidos de la región de transmembrana (gp21) del HTLV-I, resultando el más reactivo el péptido gp21(13). También se obtuvieron ocho péptidos quiméricos: Q1(M1-GG-M3), Q2(M3-GG-M1) [17, 18], Qm-1 (M2-GG-M4), Qm-2 (M4-M2) [19], Q3 (M5-GG-M3), Q4 (M3-GG-M5) [20], Q5 (M6-GG-M4), Q6 (M4-GG-M6) [21] (Figura 2).

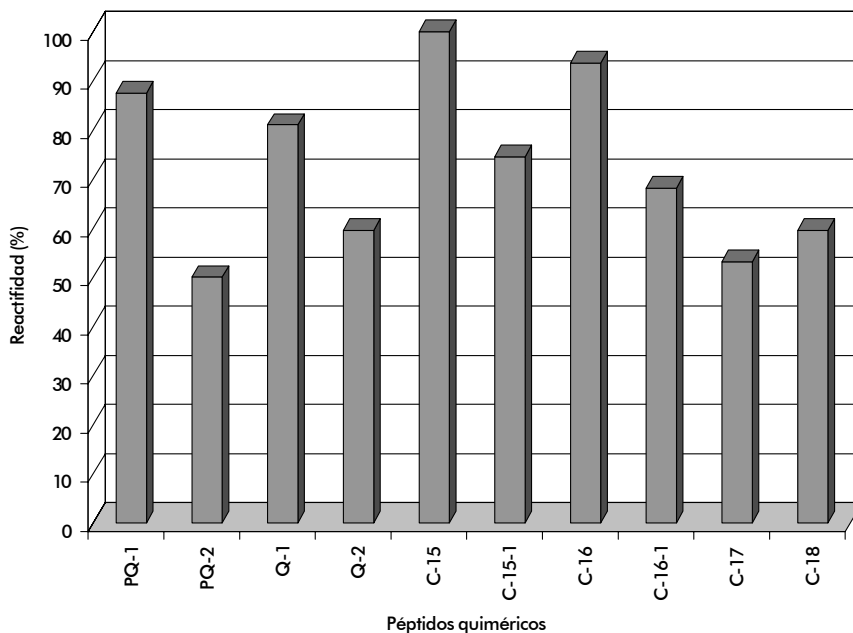


Figura 1. Comportamiento de los péptidos quiméricos del VIH-1 frente a muestras positivas al VIH-1.

9.- Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis: The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc*, 85, 2149, 1963.

10.- Washitani Y, Kuroda N, Shiraki Y, Itoyama Y, Sato H, Ohshima K et al. Linear antigenic regions of the structural proteins of human T-cell lymphotropic virus type I detected by enzyme-linked immunosorbent assays using synthetic peptides as antigens. *J Clin Microbiol*, 30, 287, 1992.

11.- Shah S, Davis C, Wilson J and Panekh. Chimeric synthetic peptides as antigens for detection of antibodies to HIV-1 and HIV-2. *East African Medical Journal*, 73, 63, 1996.

12.- Mant CT and Hodges RS, editors. High-Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation, Analysis, and Conformation. FL: CRC Press Boca Raton; 1991.

13.- Bakhtiar R, Hofstadler S, Smith R. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Part II: Applications in Characterization of Peptides and Proteins. *J Chem Edu*, 73, A118, 1996.

14.- Antigenicidad de dos péptidos sintéticos de la región de transmembrana (gp41) del VIH-1 y su utilidad en el inmunodiagnóstico. *Revista CNIC Ciencias Biológicas* 2001 Vol 32 (2)

15.- Hernández, M., Rodríguez, I., Pozo, L., Rivero, J. Chimeric synthetic peptides from the nucleocapsid p24 protein of Human Immunodeficiency Virus type-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 282, 1, 2001.

16.- Hernández, M., Pozo, L., Gómez, I., Melchor, A. Chimeric synthetic peptide as antigen for immunodiagnosis of HIV-1 infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 272, 259, 2000.

Los péptidos quiméricos Q-2, Q-5 y el péptido monomérico gp21(13) son utilizados como antígenos en un nuevo ensayo de diagnóstico para la detección de anticuerpos al HTLV-I/II.

La especificidad de estos péptidos se obtuvo un 100%.

## Conclusiones

Se obtuvieron péptidos monoméricos y nuevos péptidos quiméricos de los retrovirus humanos: VIH-1 (proteína del núcleo (p24) y de transmembrana (gp41) y la envoltura (gp120)) y del VIH-2 (proteína de transmembrana (gp 36)), además de la (proteína del núcleo (p19) (I), de transmembrana (gp21) y la envoltura (gp46) del HTLV-I/II. Se demostró que los péptidos quiméricos pueden ser utilizados como antígenos para detectar anticuerpos contra más de una proteína simultáneamente y que la eficiencia de la detección es dependiente del orden de las secuencias en el péptido, lo que puede estar relacionado con la adsorción del péptido a la fase sólida y la accesibilidad de los epítopos para el reconocimiento por los anticuerpos. Todos los péptidos fueron específicos frente a muestras negativas. Los resultados obtenidos demostraron la antigenicidad de los péptidos sintetizados, siendo mayor en los péptidos quiméricos, y su gran utilidad como antígenos en el desarrollo de ensayos de diagnóstico del HTLV-I/II y VIH-1 y 2. Los péptidos sintéticos: Q1 (p19-gp46) (HTLV-I) y M4 (gp46) (HTLV-II) y una proteína recombinante gp21, son los antígenos utilizados en el estuche UMELISA HTLV-I/II que se encuentra registrado, y respecto a VIH se utiliza un péptido sintético de la proteína p24 del núcleo como uno de los antígenos del estuche diagnóstico UMELISA HIV 1+2 Recombinant, único estuche que se utiliza en nuestro país para la certificación de la sangre y sus derivados, y consti-

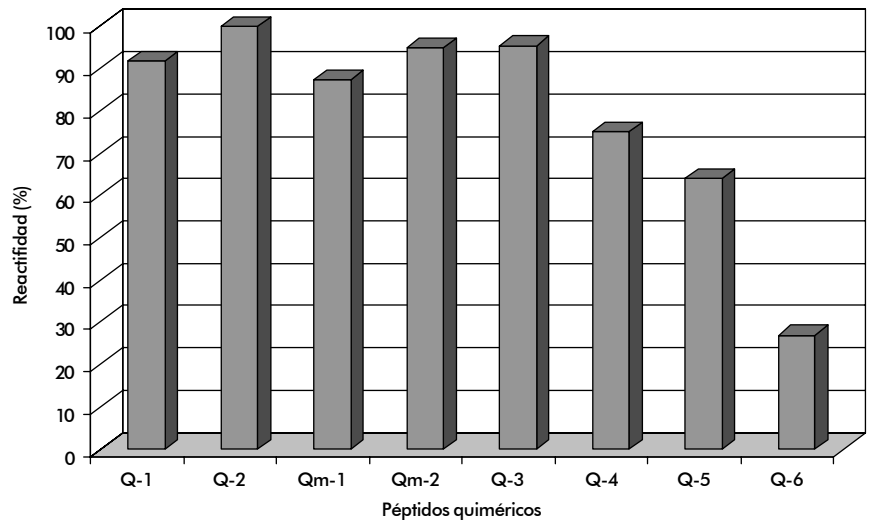


Figura 2. Comportamiento de los péptidos quiméricos del HTLV-I/II frente a muestras positivas al HTLV-I/II.

tuye el primer paso previo a la confirmación de un individuo VIH positivo como parte del sistema de vigilancia epidemiológica. Los péptidos Q-5(gp21-gp46) (HTLV-II), 0,2 (gp 46-p19) (HTLV-I) y gp21 (13) (HTLV-I) son los antígenos que forman parte de la fase sólida de un nuevo ensayo diagnóstico para la detección de anticuerpos al HTLV-I/II.

## Colaboradores

Carlos Silva León, Ivonne Gómez Cordero, Rosa Lidia Solís Rodríguez, Antonio Melchor Rodríguez, Marta Amat Arenas, Chryslaine Rodríguez Tanty, David Higginson Clarke, Eladio Silva Cabrera, María Teresa Pérez Guevara, Otto Cruz Sui.

17.- Hernández, M., Selles, M.E., Pozo, L., Gómez, I., Melchor, A. Antigenicity of chimeric synthetic peptides based on HTLV-I antigens and the impact of epitope orientation Biochem. Biophys. Res. Commun, 276, 1085, 20

18.- Péptido quimérico del HTLV-I y su aplicación en inmunoensayos. Patente solicitada a la OCPI, No de Solicitud 139/99. Fecha de Solicitud: 17/9/1999.

19.- Péptido sintético quimérico de la proteína del núcleo (p19) y la proteína de la envoltura (gp46) y su aplicación en el inmunodiagnóstico del HTLV-II. Patente solicitada a la OCPI, No de Solicitud 2002-0116. Fecha de solicitud: 13/6/2002.

20.- Hernández M, Castellanos P, Bocalandro Y, Pozo L, Díaz Y, González LJ. Chimeric synthetic peptides containing two immunodominant epitopes from the envelope gp46 and

the transmembrane gp21 glycoproteins of HTLV-I virus Biochem. Biophys. Res. Commun, 289, 1, 2001.

21.- Hernández M, Castellanos P, Bocalandro Y, Pozo L, Díaz Y, González LJ Chimeric synthetic peptides from envelope (gp46) and transmembrane (gp21) glycoproteins for the detection of antibodies to Human T-cell Leukemia virus type II Biochem. Biophys. Res. Commun, 289, 7, 2001.