

Universidad de Barcelona
Facultad de Farmacia
Departamento de Fisicoquímica

Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales de Barcelona
Departamento de Química de Péptidos y Proteínas

Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer
Hospital Clínico de Barcelona
Servicio de Inmunología

Programa de doctorado "Medicaments, alimentació i salut"
Bienio: 2000-2002

Diseño y síntesis de péptidos para el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis G (GBV-C/HGV)

Memoria presentada por M^a Teresa Pérez Escoda para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona

Directores:

Dra. Isabel Haro Villar
Investigador Científico
Dept. Química de Péptidos y Proteínas
IIQAB - CSIC

Dra. Guadalupe Ercilla González
Consultor
Servicio de Inmunología
IDIBAPS - Hospital Clínico

Tutor:

Dra. Montserrat Muñoz
Profesora asociada
Departamento de Fisicoquímica
Facultad de Farmacia
Universidad de Barcelona

M^a Teresa Pérez Escoda
Barcelona, marzo 2007

CAPÍTULO 5

Estudio de la capacidad inmunogénica de construcciones peptídicas

5.1 Introducción. Utilización de los péptidos sintéticos como inmunógenos

El desarrollo de vacunas sintéticas contra enfermedades infecciosas ha alcanzado un notable éxito en las ciencias médicas. Durante la década pasada, se desarrollaron nuevas estrategias de vacunación, lo que devolvió el optimismo de que un control efectivo de los agentes patógenos mediante la vacunación podría ser posible. Sin embargo, las vacunas para muchos patógenos extendidos por todo el mundo, incluyendo el HIV, el virus de hepatitis, la malaria y la tuberculosis, son a día de hoy todavía inefectivas.

El arsenal de inmunización tradicional incluye vacunas que utilizan virus vivos atenuados, organismos inactivados, proteínas enteras de los agentes infecciosos y más recientemente, ADN. Las vacunas basadas en péptidos sintéticos ofrecen varias ventajas respecto al uso de proteínas enteras en términos de pureza, consistencia entre distintos lotes, coste de la producción y una alta especificidad en la respuesta inmune inducida. Sin embargo, los péptidos sintéticos, por si solos no son suficientemente inmunogénicos. Por este motivo, deben ir asociados a una proteína transportadora (BSA, KLH, HBsAg) o a liposomas, cuya función es la de proporcionar una ayuda a las células T para poder incrementar la respuesta inmunológica y los anticuerpos específicos. La caracterización de estos conjugados y la estimación de péptido unido a la proteína transportadora o la cantidad de péptido incorporado a los liposomas es una tarea laboriosa, y requiere procesos de purificación de los conjugados para eliminar la fracción de proteína no conjugada. Recientemente, autores como Gras-Masse [205,206,207] y BenMohamed [208,209,210], describen la utilización de lipopéptidos para inmunizar animales de experimentación sin necesidad de incorporar los péptidos sintéticos en liposomas [211,212], proteosomas [213] o complejos inmunoestimulantes [214], o la conjugación a proteínas transportadoras virales [215] o bacterianas [216].

La utilización de vacunas sintéticas formadas de péptidos y lípidos fue ya descrita a principios de los años 80. Hopp *et al.* [217] encontraron que se podía obtener una mejora significativa en la respuesta antígeno-anticuerpo cuando se utilizaban péptidos sintetizados químicamente, conteniendo epítomos del virus de la hepatitis B conjugados a dos cadenas de ácido palmítico. La estrategia más simple de vacunas lipopeptídicas consiste pues, en unir los péptidos sintéticos que contienen los epítomos de interés a dos cadenas de ácido graso.

Por otro lado, cabría esperar que la respuesta inmunológica fuese inducida por proteínas de envoltura o estructurales más que por proteínas no estructurales ya que las primeras son las que parecen estar más accesibles y ser susceptibles de generar anticuerpos. Sin embargo, la aparición de anticuerpos dirigidos contra proteínas no estructurales ha sido estudiada dado que son un potente marcador del estado de infección del organismo. Trabajos recientes relacionan la aparición de anticuerpos dirigidos contra las proteínas no estructurales con la eliminación del virus del organismo y consecuente recuperación de la enfermedad [218,219,220,221].

Con estos antecedentes, se planteó la idea de estudiar el carácter inmunogénico de las construcciones sintéticas pertenecientes a las proteínas no estructurales NS4b y NS5a, así como sus correspondientes péptidos quiméricos, Qm1 y Qm2. También se estudió la capacidad inmunogénica de un péptido perteneciente a la proteína de envoltura E2 con la finalidad de comparar las respuestas obtenidas por péptidos de proteínas de envoltura y péptidos de proteínas no estructurales.

5.2 Obtención de los derivados hidrófobos

Los péptidos pueden ser modificados fácilmente con dos cadenas de ácido palmítico utilizando un protocolo estándar de síntesis de péptidos en fase sólida. Como se muestra en la Figura 5.1 para incorporar al péptido dos grupos palmíticos se elonga la cadena con un residuo de lisina protegido de manera ortogonal con el resto de los aminoácidos presentes en la secuencia peptídica. La eliminación selectiva de este grupo protector de la lisina va seguida de la acilación con el éster activado del ácido palmítico. Posteriormente, el péptido se desprotege y se procede a su obtención de la misma manera que para un péptido no modificado.

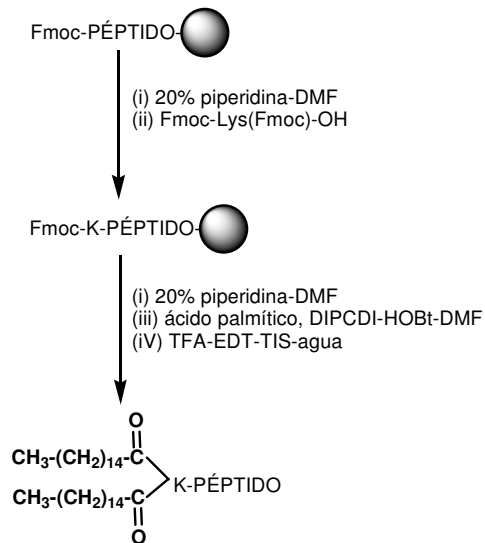


Figura 5.1. Representación esquemática de la derivatización hidrófoba de los péptidos con ácido palmítico.

5.2.1 Derivatización hidrófoba de los péptidos NS4b(8-22), NS5a(112-126), Qm1, Qm2 y E2(99-118)

Para la obtención de los derivados di-palmitoilados se partió de los péptidos a derivatizar con las cadenas laterales de los aminoácidos protegidas y todavía unidos a la resina. El protocolo seguido se encuentra detallado en el apartado 7.5 de esta memoria.

Se partió en todos los casos de aproximadamente 50 mg de peptidil-resina. Tras la eliminación del grupo Fmoc que protegía el grupo N^α-terminal, se añadió el derivado Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, en el cual tanto el α-amino como el ε-amino se encuentran protegidos con el grupo Fmoc, lábil a piperidina y ortogonal respecto al resto de grupos protectores de la secuencia. Para la incorporación de este residuo se emplearon excesos triples tanto del aminoácido como de los reactivos de condensación más habituales, DIPCDI y HOBt, disueltos en DMF.

Una vez comprobada la correcta incorporación de este residuo mediante un test de ninhidrina, se procedió a eliminar los dos grupos Fmoc y a la incorporación de 2 equivalentes de ácido palmítico empleando los reactivos habituales también en exceso triple. El test de ninhidrina permitió comprobar la ausencia de grupos amina libres.

Las etapas siguientes de eliminación de las cadenas laterales y escisión del enlace con la resina se realizaron tal y como están descritas en los apartados 7.3.7 y 7.3.8.

Los crudos peptídicos obtenidos fueron caracterizados por espectrometría de masas (MALDI-TOF), que confirmó la presencia de los productos deseados. A modo de ejemplo, en la Figura 5.2 se muestra el espectro de masas obtenido para el derivado Palm₂-K-Qm2 (teórico: 3974.54 Da, experimental: 3975.75 Da).

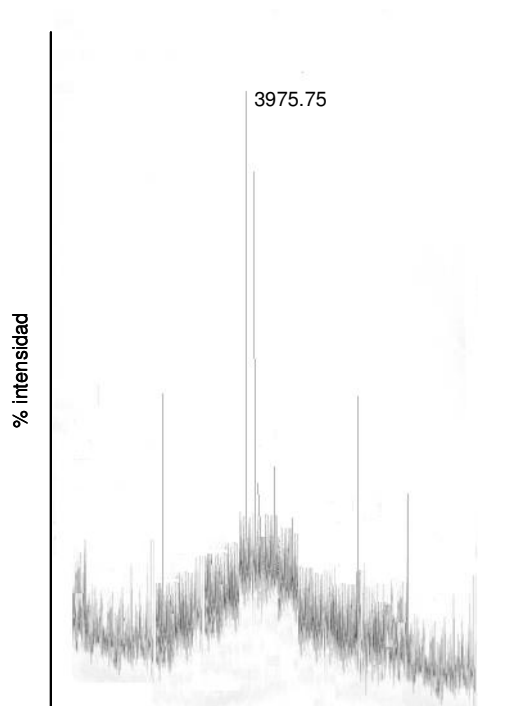


Figura 5.2. Espectro de masas por MALDI-TOF del crudo peptídico obtenido para el lipopéptido Palm₂-K-Qm2.

5.3 Análisis de la respuesta humoral secundaria mediante el ensayo de ELISA

Los lipopéptidos sintetizados fueron inoculados en ratones de experimentación siguiendo la pauta de inmunización descrita en el apartado 11.1. Se inmunizaron cinco ratones hembra Balb/c con cada péptido y dos ratones sin inmunizar se utilizaron como control preinmune. El proceso de inmunización duró un total de 84 días, obteniéndose muestras de sangre a los 35 días del inicio de la inmunización y al final del estudio.

Las IgG son las inmunoglobulinas que aparecen en la respuesta humoral secundaria, una vez se ha producido el proceso de maduración de la respuesta inmunitaria. Para estudiar si los ratones habían desarrollado o no anticuerpos anti-lipopéptido, se realizó un análisis de la respuesta mediante la técnica de ELISA. Se utilizaron como antígenos los lipopéptidos que fueron adsorbidos a las microplacas de ELISA (Maxisorp, Nunc) a una concentración de 10 µg ml⁻¹. Posteriormente, se enfrentaron a cada péptido las muestras de suero correspondientes. En la Figura 5.3 se muestran los resultados obtenidos. Se estudiaron distintas diluciones de suero para establecer el límite de detección de anticuerpos por parte de los lipopéptidos.

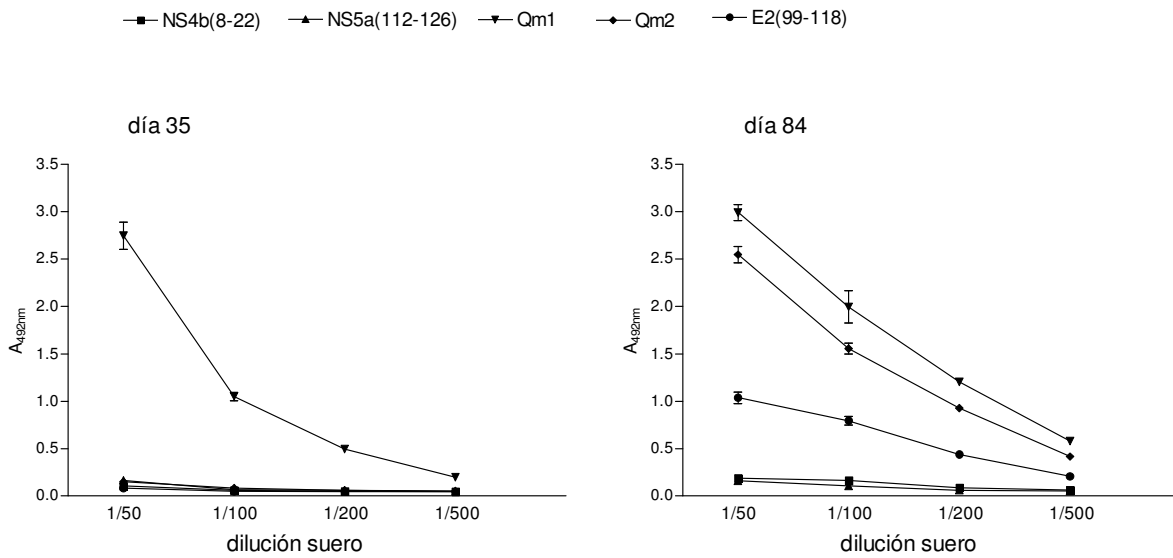


Figura 5.3. Perfiles de respuesta humoral secundaria de los ratones inoculados con los lipopéptidos a las diluciones de suero 1/50, 1/100, 1/200 y 1/500.

Como puede observarse en la Figura 5.3, los péptidos $\text{Palm}_2\text{-K-NS4b(8-22)}$ y $\text{Palm}_2\text{-K-NS5a(112-126)}$ no mostraron ninguna capacidad de generar anticuerpos anti-péptido, ya que ni a los 35 días después de la inmunización ni al final del ensayo se pudo observar un incremento en la absorbancia. Este resultado negativo en la detección de anticuerpos podría deberse también a que el título de anticuerpos generados por estos péptidos es inferior al umbral de detección por parte de los péptidos. Por el contrario, los dos péptidos quiméricos, $\text{Palm}_2\text{-K-Qm1}$ y $\text{Palm}_2\text{-K-Qm2}$, sí mostraron una capacidad para producir anticuerpos e incluso a la dilución de suero más alta de las estudiadas, 1/500, siendo el título de anticuerpos detectable después de seis inmunizaciones. Sin embargo, el comportamiento inmunogénico de los péptidos fue distinto, ya que como puede observarse, el péptido quimérico $\text{Palm}_2\text{-K-Qm1}$ fue capaz de producir una respuesta inmune detectable mucho antes que el péptido $\text{Palm}_2\text{-K-Qm2}$. Después de la tercera inoculación de péptido presenta una respuesta detectable, incluso a diluciones altas, mientras que el péptido $\text{Palm}_2\text{-K-Qm2}$ precisa de más cantidad de péptido y de más inoculaciones para alcanzar una buena respuesta inmune.

Las diferencias observadas entre los péptidos quiméricos en comparación con los péptidos que los componen, NS4b(8-22) y NS5a(112-126), podrían deberse, principalmente, al tamaño de los inmunógenos, siendo los derivados monoepitópicos de un tamaño quizá demasiado pequeño para generar estimulación del sistema inmunitario.

El comportamiento del péptido procedente de la proteína de envoltura E2, $\text{Palm}_2\text{-K-E2(99-118)}$, es ligeramente distinto al presentado por sus homólogos de las proteínas no estructurales. En

este caso, si bien tras la tercera inoculación de péptido no puede observarse una respuesta humoral apreciable, ésta aumentó hasta niveles detectables tras la sexta inoculación de péptido.

Estos resultados sugieren una mayor capacidad de generar una activación del sistema inmunitario por parte de las proteínas de envoltura que de las proteínas no estructurales, en caso de tratarse de epítomos de tamaño muy pequeño. Sin embargo, al aumentar el tamaño del epítomo inoculado, este es capaz de activar una respuesta humoral detectable, aún perteneciendo a las proteínas no estructurales.

Para determinar la especificidad de los anticuerpos detectados, los sueros obtenidos se enfrentaron, además de a su inmunógeno correspondiente a los demás antígenos con los que se realizaron las inmunizaciones. Debido a la escasa respuesta obtenida por los sueros del día 35 post-inmunización, este ensayo se realizó únicamente con las muestras del día 84, extraídas tras seis inoculaciones. En la Figura 5.4 se muestran los resultados obtenidos para cada suero.

Como puede observarse, ninguna de las construcciones peptídicas fue capaz de reconocer los anticuerpos presentes en las muestras de suero procedentes de las inoculaciones realizadas con NS4b(8-22) y NS5a(112-126). Por otro lado, el suero Qm1 además de ser reconocido por su propio antígeno fue reconocido, aunque en menor grado, tanto por el péptido quimérico Qm2 como por los epítomos que lo componen, NS4b(8-22) y NS5a(112-126). Distintos fueron los resultados obtenidos para el suero Qm2. En este caso, además de reconocer su propio antígeno, reconoció tanto al quimérico Qm1, como a los epítomos NS4b(8-22) y NS5a(112-126). El suero procedente de las inoculaciones realizadas con E2(99-118) como era de esperar, reconoció únicamente a su antígeno sin mostrar ninguna reactividad con los péptidos pertenecientes a las proteínas no estructurales.

Los distintos resultados obtenidos por los péptidos quiméricos Qm1 y Qm2, sugieren que la orientación de los antígenos dentro de la molécula desempeña un papel importante a la hora de desencadenar la respuesta inmunitaria tal y como han descrito otros autores [88]. En el caso del péptido Qm1, que mostró una baja capacidad para reconocer tanto a su homólogo, el péptido Qm2, como a los epítomos que lo componen, los anticuerpos generados reconocerían únicamente un epítomo conformacional, es decir, la estructura tridimensional que adopta el péptido en el espacio. Sin embargo, los ratones inmunizados con el péptido Qm2 produjeron anticuerpos específicos tanto contra los monómeros como con ambos péptidos quiméricos, independientemente de la orientación que ocupen estos en la molécula dimerica. Esto sugiere que en el caso del péptido Qm2, el reconocimiento por los anticuerpos está más ligado a la estructura primaria del epítomo que a la estructura que éste pueda adoptar en el espacio. Estos resultados ponen de manifiesto que el orden secuencial de los epítomos en el péptido afecta a la antigenicidad pero no a la inmunogenicidad, ya que si bien ambas secuencias fueron capaces de estimular el sistema inmunitario, el posterior reconocimiento por los antígenos fue diferente. Este fenómeno estaría relacionado con la diferente conformación que los epítomos adoptan en el péptido Qm1 frente a la que adoptan en el péptido Qm2.

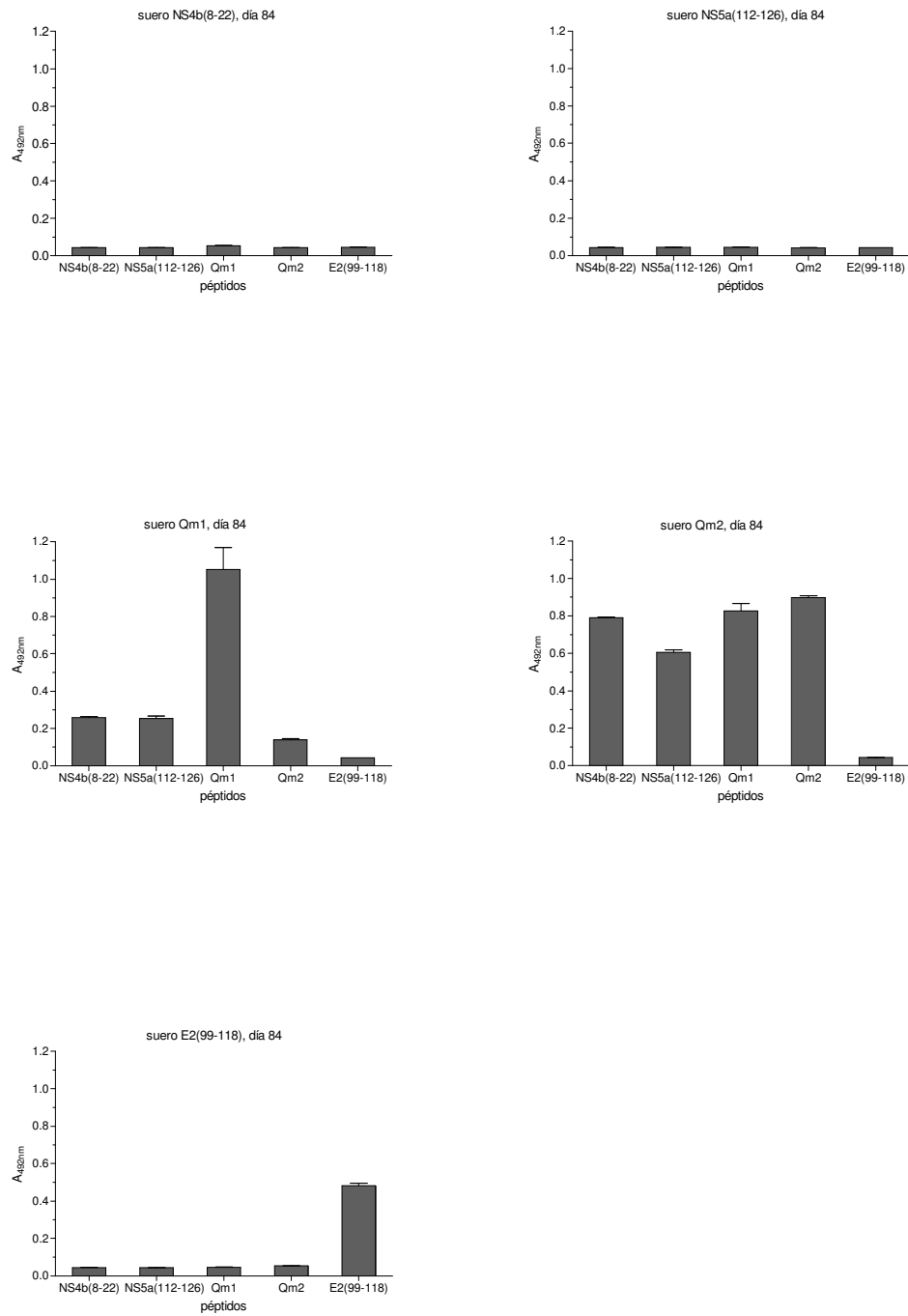


Figura 5.4. Reactividad en ELISA de los sueros tras la sexta inmunización con los antígenos Palm₂-K-NS4b(8-22), Palm₂-K-NS5a(112-126), Palm₂-K-Qm1, Palm₂-K-Qm2, Palm₂-K-E2(99-118).

Finalmente, los resultados obtenidos por ELISA están en concordancia con trabajos publicados [220,219,218] en los que se demuestra la capacidad inmunogénica de las proteínas no estructurales. Asimismo, estos resultados, corroboran los trabajos de BenMohamed y Gras-Masse que apuestan por la utilización de inmunógenos peptídicos modificados únicamente por la adición de cadenas de ácido palmítico [208,207].

5.4 Análisis de la respuesta humoral secundaria mediante la técnica de la resonancia de plasmón de superficie

Una vez estudiada la respuesta de los anticuerpos mediante la técnica de ELISA, se decidió evaluar los anticuerpos de los sueros obtenidos en ratones mediante la técnica de la resonancia del plasmón de superficie.

Para hacer el ensayo más comparativo al ELISA desarrollado, se diseñó un método de análisis en que los antígenos, en este caso los péptidos derivatizados con cadenas de ácido palmítico, pudieran ser unidos a los chips sensores del instrumento.

Los chips más ampliamente utilizados son los CM5 (ver capítulo 4), en el que las biomoléculas se unen de manera covalente a la superficie del chip mediante la formación de un enlace amida entre los grupos amino de la biomolécula y los grupos carboxilo que se encuentran en la superficie sensora. En este caso, esta aproximación podría resultar inviable, debido a que los lipopéptidos tienen su extremo amino ocupado con cadenas de ácido palmítico.

Por todo ello, se consideró la posibilidad de adsorber los lipopéptidos en el chip sensor en lugar de unirlos de forma covalente. Para poder llevar a cabo esta idea, la superficie sensora debía tener unas propiedades que permitieran la adsorción de moléculas hidrófobas. Los chips HPA, cuya superficie está recubierta de cadenas de alcanos que hacen que la superficie posea una gran hidrofobicidad.

Se encuentra descrito en la literatura la utilización de este tipo de chips para llevar a cabo estudios de interacción con modelos de membrana. Estos estudios consisten en formar una monocapa lipídica, generalmente por inyección de liposomas. Una vez se ha formado una monocapa estable, se inyectan las moléculas a estudiar con la finalidad de analizar si se produce una alteración o no de la monocapa formada [188,222,223].

En nuestro caso, el ensayo consistió en adsorber los lipopéptidos a la superficie del chip sensor y posteriormente, hacer circular sobre esta superficie los sueros de ratón que contienen anticuerpos y evaluar si los cambios producidos en la señal de resonancia se podían atribuir a la interacción producida entre los péptidos y los anticuerpos.

Existen estudios descritos similares al planteado [224,225]. En ellos, sin embargo, el ligando es una proteína. Hasta el momento no se ha descrito en ningún caso la utilización de lipopéptidos sobre esta superficie y posterior análisis de interacción con anticuerpos.

Las etapas para el desarrollo del ensayo se muestran en la Figura 5.4. En primer lugar, sobre la superficie del chip HPA se hizo circular el lipopéptido con la finalidad de formar una monocapa. Debido a la presencia de las dos cadenas de ácido palmítico, la orientación de las moléculas sería en cierto modo dirigida, ya que serían estas cadenas las que con mayor afinidad se depositarían sobre la superficie, dejando el péptido hacia el interior del canal, en un ambiente más hidrofílico. Seguidamente, tras comprobar la correcta formación de la monocapa, así como su estabilidad, se procedió a inyectar las muestras de suero diluidas en el tampón de flujo del sistema. Se observó un cambio en la señal de resonancia debido a la interacción antígeno-anticuerpo. Por último, como consecuencia de la fuerte asociación entre el antígeno y el anticuerpo, resultó difícil eliminar los anticuerpos sin alterar la monocapa de lipopéptido. Por este motivo, se hizo circular una disolución limpiadora que eliminó tanto los anticuerpos como el lipopéptido, dejando la superficie sensora intacta y lista para un nuevo análisis. Así pues, cada ciclo completo de análisis empleando este procedimiento consiste en la formación de la monocapa (Figura 5.5 B) y posterior inyección de la muestra de suero a analizar (Figura 5.5 D).

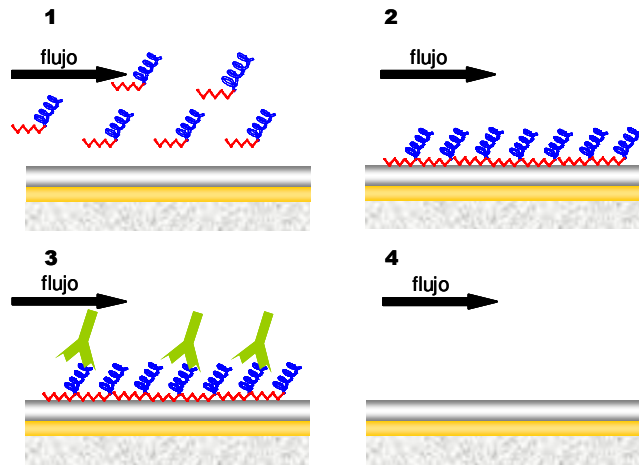


Figura 5.4. Esquema ilustrativo de un ciclo de análisis de la interacción antígeno anticuerpo sobre chips HPA. El proceso consiste en la inyección del lipopéptido (1) y formación de la monocapa (2). Posteriormente, se inyecta la muestra que contiene los anticuerpos (3) y se analiza el cambio en la señal de resonancia. Finalmente se lava la superficie para eliminar el complejo antígeno-anticuerpo formado y se deja la superficie lista para un nuevo ensayo (4).

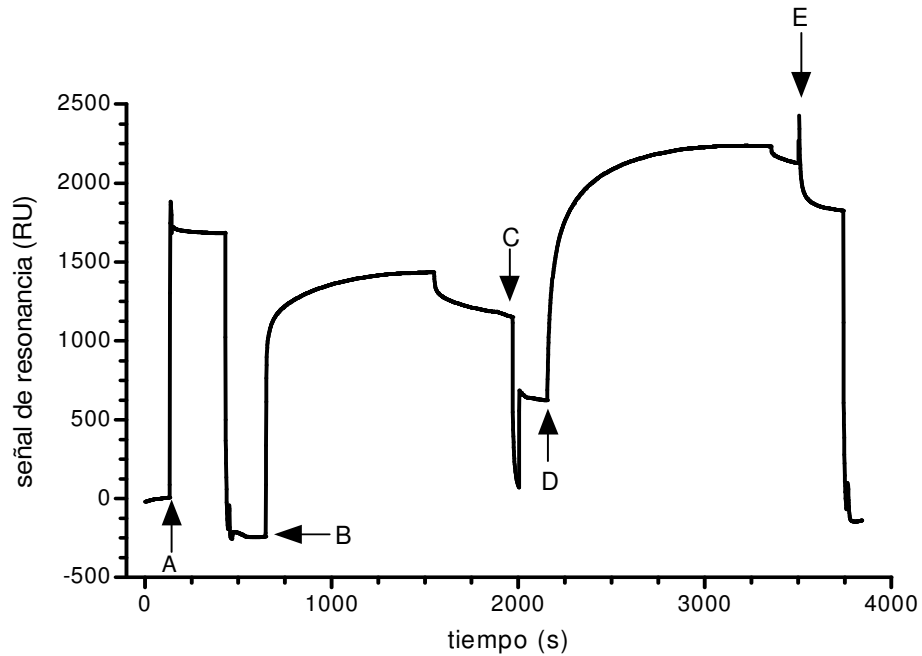


Figura 5.5. Sensorgrama correspondiente a un ciclo de análisis. A) inyección n-octil-β-glucopiranosido. B) inyección de lipopéptido. C) inyección de NaOH para eliminar multicapas de péptido y estabilizar la línea de base. D) inyección de la muestra que contiene los anticuerpos. E) regeneración y recuperación de la línea de base inicial.

5.4.1 Formación de las monocapas de los lipopéptidos Palm₂-K-Qm1 y Palm₂-K-Qm2

Este ensayo se llevó a cabo únicamente con los derivados di-palmitoilados de los péptidos quiméricos Qm1 y Qm2 que habían demostrado poseer capacidad inmunogénica en ratones.

Previamente, antes de iniciar la inyección del lipopéptido era necesario asegurarse que la superficie del chip se encontraba totalmente limpia, para ello se inyectaron 25 μ l de una disolución de n-octil- β -glucopiranosido 40 mM en agua a un flujo de 5 μ l min⁻¹.

Los lipopéptidos se suspendieron en tampón fosfato 20 mM a una concentración de 200 μ g ml⁻¹. Como control negativo, se utilizó BSA, también diluida en tampón fosfato. Tanto las suspensiones de lipopéptidos como la disolución de BSA, se hicieron circular por la superficie del chip a un flujo lento (2 μ l min⁻¹), para asegurar la correcta formación de la monocapa. Durante la inyección de los lipopéptidos, la señal de resonancia mostró un rápido aumento, llegando a estabilizarse alrededor de 1600-1800 RU, lo que demostraba la inmovilización de las moléculas.

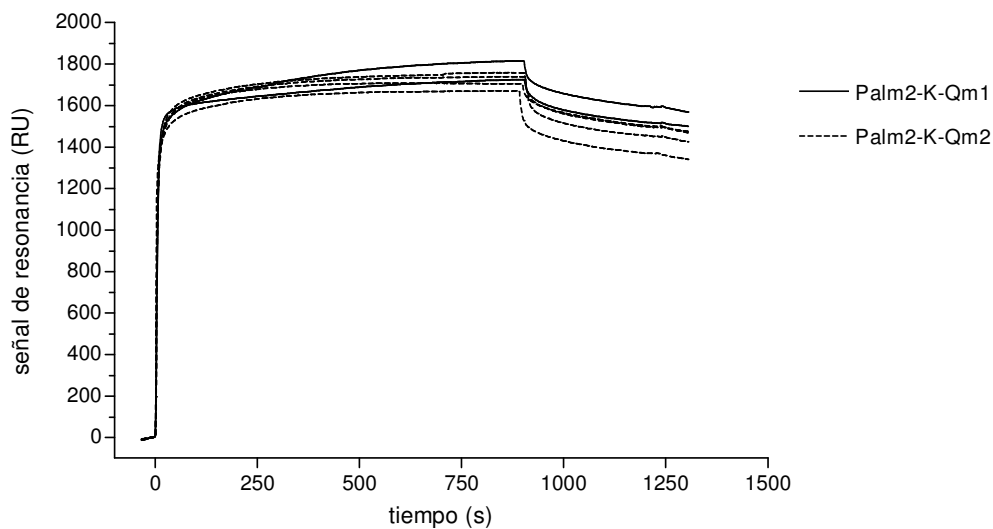


Figura 5.6. Sensorgramas obtenidos durante la formación de las monocapas de los péptidos Palm₂-K-Qm1 y Palm₂-K-Qm2.

Como puede observarse en la Figura 5.6, la formación de las monocapas mostró una gran reproducibilidad y en todos los casos se llegó, en pocos segundos, a un estado de saturación. Una vez finalizada la inyección de lipopéptido, la señal de resonancia fue disminuyendo con el tiempo, probablemente debido a la formación de multicapas de péptido sobre la superficie. Para eliminarlas y estabilizar la línea de base, se inyectó NaOH, lo que hizo disminuir hasta 800-1000 la señal de resonancia.

La superficie del chip HPA tiene una fuerte tendencia a unir proteínas de manera no específica. Para comprobar que toda la superficie del chip HPA se encontraba ocupada por péptido, se inyectó una disolución de BSA 0.1 mg ml⁻¹ en tampón fosfato. El incremento de RU tras esa inyección no superó en ningún caso las 100 RU, lo que demostró la saturación de la superficie.

5.4.2 Análisis de las muestras de sueros

Una vez formada la monocapa, la siguiente etapa consistió en hacer circular sobre ésta los sueros problema. Se hicieron circular los sueros a distintas diluciones con el fin de establecer la dilución máxima que permitiera apreciar diferencias entre el suero inmune, que contenía los anticuerpos y el suero control. Las muestras de suero se diluyeron 200, 500, 1000 y 2000 veces en el tampón de flujo del sistema y se hicieron circular a un flujo de 10 µl min⁻¹ durante 10 minutos. Una concentración mayor de anticuerpo, está relacionada con una mayor señal de resonancia, independientemente del tipo de suero analizado.

Además, la respuesta producida por los sueros inmunes, que son los que contienen anticuerpos anti-péptido, fue superior a la obtenida por el suero del ratón no inmunizado. Esta diferencia entre los sueros no se observó para la dilución más alta, con lo que se desestimó para el resto de los ensayos. En la Figura 5.7 se muestran los sensorgramas obtenidos por el suero inmune y el suero control al hacerlos circular sobre la monocapa de Palm₂-K-Qm1 a distintas diluciones.

Una respuesta similar se obtuvo al analizar la respuesta del suero inmune Qm2 al hacerlo circular sobre la monocapa de péptido Palm₂-K-Qm2.

Finalizada la inyección del suero y antes de proceder a iniciar un nuevo ciclo, fue necesario eliminar de la superficie del chip cualquier resto de péptido y de suero para evitar señales alteradas. Para ello, se inyectaron 20 µl de la disolución de n-octil-β-glucopiranosido a un flujo de 50 µl min⁻¹. La regeneración mantuvo intactas las propiedades de la superficie sensora permitiendo así repetir la inmovilización de los lipopéptidos sin que se produjera ninguna modificación en la línea de base a la vez que se alcanzaron en cada ciclo niveles muy similares de inmovilización.

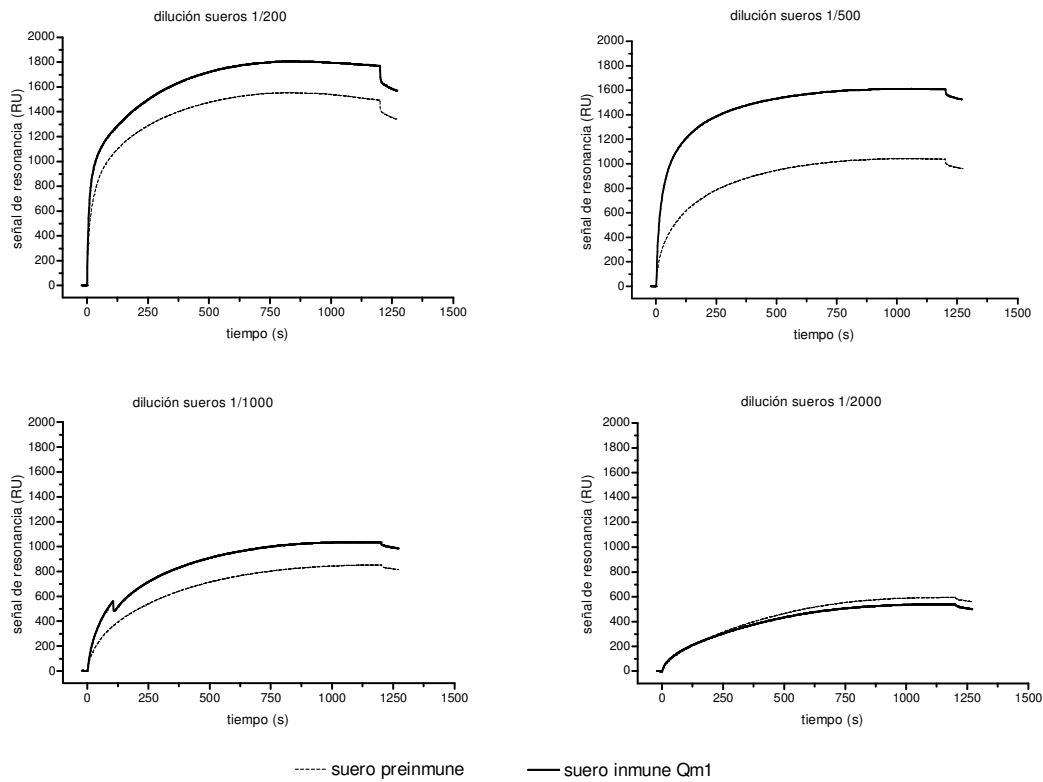


Figura 5.7. Sensorgramas obtenidos para el suero inmune y el suero control al circular sobre la monocapa de Palm₂-K-Qm1 a las diluciones de 1/200, 1/500, 1/1000 y 1/2000.

Los resultados obtenidos confirmaron la posibilidad de realizar un gran número de ciclos completos: inmovilización, inyección de la muestra y regeneración, sin obtener señales degradadas.

La originalidad de este método consiste en realizar una inmovilización reproducible de moléculas hidrófobas sobre la superficie de los chips HPA que permite analizar de manera sensible la interacción antígeno-anticuerpo. Esta metodología resulta útil cuando otras estrategias de inmovilización no son posibles o cuando la inmovilización covalente conlleva cambios conformacionales de las moléculas que provocan la pérdida de su actividad biológica.

5.5 Recapitulación

En este capítulo se ha estudiado la capacidad de los lipopéptidos sintéticos para estimular el sistema inmunitario de animales de experimentación. Los resultados obtenidos al analizar la presencia de anticuerpos anti-péptido, permiten extraer dos conclusiones principales.

En primer lugar, la inoculación de péptidos pertenecientes a proteínas no estructurales produce una activación del sistema inmunológico y niveles detectables de IgG. Sin embargo, el tamaño del inmunógeno juega un papel determinante, ya que únicamente se ha observado respuesta para las secuencias quiméricas, mientras que los péptidos monoepitópicos, de menor tamaño, no generaron una respuesta detectable por ELISA. Cabe destacar la mayor capacidad inmunogénica que mostró el péptido E2(99-118) perteneciente a la proteína de envoltura E2.

En segundo lugar, los resultados obtenidos demuestran la utilidad de la derivatización de péptidos con cadenas de ácido palmítico para provocar una respuesta inmunitaria sin necesidad de conjugar los péptidos a proteínas transportadoras.

Por otro lado, se ha puesto a punto una nueva metodología que permite estudiar la interacción antígeno-anticuerpo mediante la técnica de SPR en la que los lipopéptidos se adsorben directamente a la superficie sensora hidrófoba. Los resultados muestran una buena estabilidad de las monocapas de péptido formadas lo que permite un estudio de interacción entre péptidos y otras biomoléculas.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados expuestos en este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1) Se han sintetizado satisfactoriamente en fase sólida, tanto por síntesis manual como semiautomática, péptidos que pertenecen a proteínas de envoltura y a proteínas no estructurales del virus GBV-C/HGV.
- 2) Se han utilizado las secuencias peptídicas sintetizadas como antígenos para detectar la presencia de anticuerpos anti-GBV-C/HGV en muestras de sueros procedentes tanto de la población general como de grupos con un alto riesgo de haber estado en contacto con el virus GBV-C/HGV.
- 3) Se han ensayado distintas estrategias de unión de las moléculas peptídicas a la fase sólida para desarrollar un ensayo de ELISA. La unión covalente a través de los grupos amino de los péptidos es estrategia que ha proporcionado una mayor sensibilidad para la detección de anticuerpos específicos.
- 4) Los resultados obtenidos por ELISA permiten concluir que la combinación de más de un epítipo en la misma molécula mejora tanto la especificidad como la sensibilidad del ensayo. Los mejores resultados en este aspecto han sido los obtenidos por la construcción ramificada tetramérica MAP₄ E2-NS5a, constituida por cuatro copias de dos epítopos distintos, uno de ellos perteneciente a una proteína de envoltura y el otro procedente de una proteína no estructural.
- 5) La restricción de la movilidad mediante ciclaciones intramoleculares mejora la capacidad antigénica de las secuencias sintéticas.
- 6) Los estudios conformacionales realizados corroboran que la estructura secundaria de un péptido influye en la capacidad de éste para reconocer anticuerpos específicos. Los resultados obtenidos demuestran que un mayor grado de estructuración va ligado con un mejor rendimiento diagnóstico.
- 7) La técnica de resonancia del plasmón de superficie es útil en los estudios de interacción antígeno-anticuerpo empleando secuencias lineales, si bien no se han alcanzado los buenos resultados obtenidos por la técnica del inmunoensayo cuando se ha utilizado como antígeno la construcción ramificada.
- 8) Se ha demostrado que las construcciones lineales derivatizadas con cadenas de ácidos grasos son capaces de producir anticuerpos tras la inmunización de animales de experimentación. La respuesta inmunitaria se ha podido detectar sin necesidad de asociar los péptidos a proteínas transportadoras.

- 9) La capacidad inmunogénica de los péptidos quiméricos depende del orden secuencial de los epítomos que los componen, estando ésta relacionada con la conformación adoptada por el péptido

- 10) Se ha puesto a punto una nueva metodología con utilidad para estudiar la interacción antígeno-anticuerpo empleando la tecnología de resonancia del plasmón de superficie, en la que los derivados lipófilos de los antígenos se adsorben a la superficie sensora.

Globalmente, este trabajo refleja la validez de la utilización de los péptidos sintéticos como antígenos para el desarrollo de sistemas que permitan el serodiagnóstico de infección pasada por el virus GBV-C/HGV.