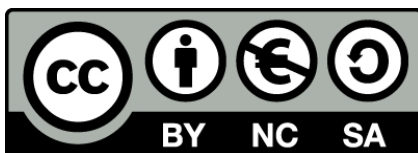




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Péptidos sintéticos del GB virus C.
Aplicación en el diagnóstico de infección
y en el diseño de potenciales agentes
terapéuticos contra el VIH-1**

Leticia Fernández Arauzo



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**

Tesis Doctoral

Péptidos sintéticos del GB virus C.
Aplicación en el diagnóstico de infección y en el diseño de
potenciales agentes terapéuticos contra el VIH-1

Leticia Fernández Arauzo

Departamento de Química Orgánica
Facultad de Química
Universitat de Barcelona

Departamento de Química Biomédica
Unidad de Síntesis y Aplicaciones Biomédicas de Péptidos
Instituto de Química Avanzada de Cataluña
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Abril 2012



Memoria presentada por
Leticia Fernández Arauzo
Para optar al grado de Doctor por la Universitat de Barcelona
Programa de doctorado: Química Orgánica
Bienio: 2006-2008

Dirigida por:

Dra. Isabel Haro Villar

Dra. María José Gómara Elena

Tutor:

Dr. Ernesto Nicolàs Galindo

A mi familia

Son muchas las personas con las que he compartido estos años de doctorado, tanto dentro como fuera del laboratorio. De todas he aprendido algo y, sin ellas, este trabajo no habría sido posible.

En primer lugar, dar las gracias a Isabel Haro y María José Gómara, mis directoras de tesis. Muchas gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de conocer de cerca el mundo de la investigación. Gracias también por vuestro apoyo fuera del laboratorio. Moltes gràcies.

Gracias a mi tutor de tesis, Ernesto Nicolàs, por su amabilidad y por darme su ayuda cuando la he necesitado.

Agradecer al Dr. Weng C. Chan, de la Universidad de Nottingham, por darme la posibilidad de colaborar en su grupo. También dar las gracias a todo su equipo de laboratorio, en especial a Sophia, mi guía por el CBS. Y ¡cómo no! a Sarah, mi compañera de piso y amiga, por hacer de mis meses en Nottingham una estancia agradable. Thanks.

Mi más sincero agradecimiento a María José Bleda, gran estadística y profesora. Gracias por echarme una mano (más bien las dos) con esos infinitos datos, por explicarme las cosas todas las veces que lo he necesitado, por hacer que empiece a coger el gusto a la estadística y por tu enorme paciencia.

Gracias a la Lúcia Sevilla, del Servicio de Transcriptómica del Parc Científic, y a los compañeros Nacho y David, que me enseñaron el mundo de los microarrays. Gracias también por hacerme sentir como una más del grupo. A Meri, por ayudarme con las células. A Roser, Dori y María, del Laboratorio de Espectrometría de Masas, por aguantarme durante “mis turnos de UPLC”.

Tengo mucho que agradecer a mis compañeras y compañeros de laboratorio, que tanto me han ayudado, tan buenos momentos me han hecho pasar y a los que, sin duda, echaré de menos. A Ramona, ¡cuánto hemos compartido y espero que sigamos compartiendo! trabajo, mudanza, fiestas, vacaciones... Gracias por estar siempre codo con codo. TVB. Aimee, “amol”, por todas las risas que nos hemos echado. Espero que no me dejes nunca detrás del palo. Anna, futura química, gràcies per fer-me veure les coses d'una altra manera. Segueix amb la teva força i constància. Raymond, gràcies per ésser la persona que ets, trobaré a faltar les nostres xerrades i les teves “raymonades”. Marta, amb els teus riures, les teves cançons y els teus balls. Et desitjo el

millor per a la teva nova vida a Mèxic. Dar las gracias también a Elena, Jessi, Nacho y Emili, con los que compartí mis primeros años de tesis y a los compañeros y compañeras que han pasado por el laboratorio: Morteza, Mari, Gabrielle y Aurelien, Marina, Marta Pitet, Cristina, Joana, Sanae, Oriol, Salva, David, Antoni y Jordi.

Agrair també a l'Anna Rodríguez, l'Anna Alcaide i en Gerard, per compartir amb mi no només el seu coneixement.

Gracias a todo el grupo del laboratorio 309 por ser como nuestro segundo laboratorio o “nuestro laboratorio de emergencia”. En especial a Asun, Miriam y Mikel muchas gracias por echarnos siempre una mano, por vuestros consejos y por los buenos momentos que hemos pasado y los que nos quedan por pasar. Per suposat, moltíssimes gràcies Glòria, per ésser més que companya, amiga. Per tota la teva ajuda incondicional des del primer moment, fora i dins del CSIC. Per les teves idees. Per ensenyar-me català. Per ésser com ets.

Al Sergi. Moltes, moltíssimes gràcies per ajudar-me, pels ànims, per suportar-me i per fer-me costat durant tot aquest temps. Gràcies per la teva paciència... i per tot.

Por último, dar las gracias a toda mi familia. Gracias a mis padres, por educarme como lo han hecho y por estar ahí siempre que los he necesitado. A mi hermana, Yara, porque aunque estemos lejos, estamos cerca. A mis tíos, tías, primos y primas, por su confianza en mí. Y, finalmente, a mis abuelos, que sé lo orgullosos que estarían.

A todas y todos, y a aquellas personas que no he nombrado pero que han estado también a mi lado, gracias. Porque a pesar de las dificultades, habéis hecho de estos años un recuerdo inolvidable. Muchas gracias por todo lo que me habéis dado.

Leticia

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	17
ABREVIATURAS	21
APÉNDICE	27
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	35
Introducción.....	37
Objetivos	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
1. Estudio antigénico de la proteína E2 del GBV-C por microarrays	49
1.1. Microarrays de péptidos.....	49
1.1.1. Soportes sólidos	50
1.1.2. Métodos de impresión	51
1.1.3. Métodos de detección	53
1.2. Optimización de la técnica de microarrays como ensayo inmunoenzimático	53
1.2.1. Comparación de soportes sólidos	54
1.2.2. Concentración del péptido unido a la placa	56
1.2.3. Efecto de dilución de los sueros	59
1.3. Capacidad diagnóstica de los péptidos de la proteína E2 del GBV-C en pacientes infectados por VIH-1	61
1.3.1. Barrido de la proteína E2 del GBV-C. Primera selección de péptidos.....	63
1.3.2. Comparación de paneles de sueros. Segunda selección de péptidos.....	67
1.3.3. Capacidad diagnóstica de los péptidos seleccionados. Tercera selección.....	74
2. Diseño y síntesis de construcciones peptídicas derivadas del extremo N-terminal de la proteína E2 del GBV-C	85
2.1. Síntesis de péptidos en fase sólida.....	85
2.1.1. Soportes poliméricos.....	89
2.1.2. Reactivos de acoplamiento.....	90
2.1.2.2 Sales de fosfonio y de uronio	93
2.1.3. Separación del péptido de la resina y eliminación de grupos protectores semipermanentes	95
2.2. Síntesis de péptidos ramificados (MAPs).....	97
2.2.1. Péptidos ramificados de tipo lineal.....	98
2.2.1.1. Péptidos ramificados de tipo lineal heterogéneo.....	98
2.2.1.2. Péptidos ramificados de tipo lineal homogéneo.....	102

2.2.2. Péptidos ramificados de tipo cíclico	107
2.2.2.1. Obtención de péptidos cíclicos	108
2.2.2.2. Síntesis de péptidos ramificados de tipo lineal-cíclico.....	115
2.2.2.3. Péptidos ramificados de tipo cíclico homogéneos	119
3. Estudio de la actividad anti-VIH-1 de las construcciones sintéticas derivadas del dominio N-terminal de la proteína E2 del GBV-C	128
3.1. Estudio de toxicidad.....	128
3.2. Estudio de fusión celular	130
4. Estudio de la capacidad antigénica de las construcciones peptídicas derivadas del dominio N-terminal de la proteína E2 del GBV-C por ELISA	133
4.1. Criterio de positividad de las muestras.....	135
4.2. Comparación de la capacidad diagnóstica de los péptidos MAP ₄ [E2(7-26),NS4a(27-43)] y MAP ₄ [E2(99-118),NS5a(112-126)] en pacientes hemodializados e infectados por el virus de la hepatitis C.....	136
4.3. Capacidad diagnóstica de la secuencia peptídica E2(7-26).....	140
4.4. Comparación de la capacidad diagnóstica de las diferentes construcciones peptídicas que contienen la secuencia E2(7-26) en pacientes infectados por el VIH-1	142
5. Valor diagnóstico de anticuerpos anti-péptidos del GBV-C en pacientes infectados por el VIH-1.....	150
ANEXO	157
A.1. Estudio de fiabilidad del ensayo de microarrays.....	159
A.2. Análisis estadístico de la comparación de los paneles de sueros.....	174
A.3. Síntesis de 3-mercaptopropanamida	177
A.4. Caracterización de los N-cisteinil-péptidos lineales	181
A.5. Espectros MALDI-TOF de los N-cisteinil-péptidos derivatizados como tioéster en el extremo C-terminal	183
CONCLUSIONES	185
MATERIALES Y MÉTODOS	191
1. Reactivos y disolventes.....	193
2. Instrumentación general	195
3. Procedimientos experimentales de la síntesis de péptidos	196
3.1 Métodos de acoplamiento	196
3.1.1. Incorporación del primer aminoácido.....	196
3.1.1.1. Resina NovaSyn TGR.....	196
3.1.1.2. Resina Cloruro de 2-clorotritilo	196

3.1.2. Determinación del grado de unión del primer aminoácido	197
3.1.3. Incorporación de los aminoácidos de la secuencia peptídica	198
3.2. Test de identificación de aminas libres.....	200
3.2.1. Test de Kaiser o de ninhidrina	200
3.2.2. Test de cloranilo.....	201
3.2.3. Test de TNBS.....	201
3.3. Eliminación del grupo protector Fmoc.....	201
3.4. Eliminación del grupo protector ivDde.....	202
3.5. Tratamiento final y secado de la peptidil-resina.....	202
3.6. Separación del péptido de la resina y eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos.....	203
3.6.1. Resina NovaSyn TGR.....	204
3.6.2. Resina Cloruro de 2-clorotritilo.....	204
3.7. Tioesterificación del extremo C-terminal.....	205
3.7.1. Síntesis de 3-mercaptopropanamida.....	205
3.7.2. Reacción de tioesterificación	206
3.8. Ciclación de péptidos totalmente desprotegidos. Ligación Química Nativa Intramolecular	206
3.9. Unión de péptidos cíclicos al núcleo de lisinas. Reacción de tioeterificación.....	207
3.10. Técnicas cromatográficas	208
3.10.1. Cromatografía en capa fina.....	208
3.10.2. Extracción en fase sólida.....	208
3.10.3. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) a escala analítica	209
3.10.4. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) a escala semipreparativa.....	209
3.10.5. Cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC)	209
3.11. Espectrometría de masas.....	210
3.11.1. Espectrometría de masas por ionización por electrospray (ESI).....	210
3.11.2. Espectrometría de masas MALDI-TOF	210
4. Síntesis de construcciones peptídicas derivadas del extremo N-terminal de la proteína E2 del GBV-C	211
4.1. Síntesis del péptido lineal E2(7-26) (LP1 _{E2})	211
4.2. Síntesis del péptido lineal E2(11-26) (LP2 _{E2})	212
4.3. Síntesis del péptido lineal E2(17-26) (LP3 _{E2})	213
4.4. Síntesis del péptido lineal NS4a(27-43).....	214
4.5. Síntesis del péptido cíclico E2(7-26) (CP1): Cyc-HT-CysE2(7-26).....	215
4.6. Síntesis del péptido cíclico E2(11-26) (CP2): Cyc-HT-CysE2(11-26).....	216
4.7. Síntesis del péptido cíclico E2(17-26) (CP3): Cyc-HT-CysE2(17-26).....	217
4.8. Síntesis del péptido cíclico NS4a(27-43): Cyc-HT-CysNS4a(27-43).....	217
4.9. MAP tetramérico de tipo lineal heterogéneo (MAP _{E2/NS4})	218

4.9.1. Núcleo de lisinas ortogonalmente protegido	218
4.9.2. MAP dimérico de tipo lineal E2(7-26)	220
4.9.3. Síntesis de la secuencia NS4a(27-43) en los extremos N ^o del núcleo de lisinas	221
4.10. MAP dimérico de tipo lineal E2(7-26) cloroacetilado	222
4.11. MAP tetramérico lineal E2(17-26) (MAP _{LP3})	222
4.11.1. Núcleo de lisinas tetramérico.....	222
4.11.2. Síntesis de la secuencia E(17-26) en los extremos N α y N ^o del núcleo de lisinas.....	224
4.12. MAP tetramérico de tipo lineal E2(11-26) (MAP _{LP2})	224
4.13. MAP tetramérico de tipo lineal E2(7-26) (MAP _{LP1}).....	225
4.14. MAP tetramérico de tipo cíclico E2(17-26) (MAP _{CP3})	226
4.14.1. Núcleo de lisinas tetracloroacetilado.....	226
4.14.2. Reacción de tioeterificación	227
5. Obtención de las construcciones peptídicas derivadas del extremo N-terminal de la proteína E2 del GBV-C	228
5.1. Obtención del péptido lineal E2(7-26) (LP1 _{E2})	228
5.2. Obtención del péptido lineal E2(11-26) (LP2 _{E2})	229
5.3. Obtención del péptido lineal E2(17-26) (LP3 _{E2})	229
5.4. Obtención del péptido lineal NS4a(27-43)	230
5.5. Obtención del péptido cíclico E2(7-26) (CP1): Cyc-HT-CysE2(7-26)	231
5.6. Obtención del péptido cíclico E2(11-26) (CP2): Cyc-HT-CysE2(11-26).....	232
5.7. Obtención del péptido cíclico E2(17-26) (CP3): Cyc-HT-CysE2(17-26).....	233
5.8. Obtención del péptido cíclico NS4a(27-43): Cyc-HT-CysNS4a(27-43)	234
5.9. Obtención del MAP dimérico de tipo lineal E2(7-26) cloroacetilado.....	234
5.10. Obtención de MAP tetramérico de tipo lineal heterogéneo (MAP _{E2/NS4}).....	235
5.11. Obtención del MAP tetramérico lineal E2(17-26) (MAP _{LP3})	236
5.12. Obtención del MAP tetramérico de tipo lineal E2(11-26) (MAP _{LP2}).....	237
5.13. Obtención del MAP tetramérico de tipo lineal E2(7-26) (MAP _{LP1}).....	237
5.14. Obtención del MAP tetramérico de tipo cíclico E2(17-26) (MAP _{CP3}).....	238
5.14.1. Obtención del núcleo de lisinas tetracloroacetilado.....	238
5.14.2. Reacción de tioeterificación	239
6. Ensayo antigénico por microarrays	240
6.1. Disoluciones tamponadas.....	240
6.2. Péptidos.....	240
6.3. Sueros	240
6.4. Protocolo de microarrays	241
6.5. Control de los ensayos	243
6.6. Tratamiento estadístico de los datos.....	243
6.6.1. Barrido de la proteína E2 del GBV-C. Primera selección de péptidos.....	243

6.6.2. Comparación de paneles de sueros. Segunda selección de péptidos.....	244
6.6.2.1. Estudio de fiabilidad del ensayo de microarrays.....	244
6.6.2.2. Análisis estadístico de la comparación de los paneles de sueros.....	245
6.6.3. Capacidad diagnóstica de los péptidos seleccionados. Tercera selección.....	245
6.6.4. Reactividad de los péptidos para el diagnóstico en la infección por el GBV-C en pacientes infectados por VIH-1.....	246
7. Ensayo Inmunoenzimático: ELISA.....	247
7.1. Disoluciones tamponadas.....	247
7.2. Sueros	247
7.3. Protocolo de ELISA.....	248
7.4. Diseño de la microplaca.....	250
7.5. Estimación del punto de corte.....	251
7.6. Tratamiento estadístico de los datos.....	252
8. Estudio de toxicidad y fusión celular.....	253
8.1. Líneas celulares.....	253
8.2. Cultivo de líneas celulares.....	253
8.3. Ensayo de toxicidad.....	253
8.4. Estudio de fusión celular	254
BIBLIOGRAFÍA.....	255
TRABAJOS RELACIONADOS.....	283

RESUMEN

RESUMEN

El GB virus C (GBV-C), también conocido como virus de la hepatitis G, es un virus humano no patogénico. Su infección es bastante frecuente, encontrándose incluso en personas sanas. Su prevalencia es mucho mayor en individuos considerados de riesgo, ya que comparte las vías de transmisión con otros virus, como por ejemplo con el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Numerosos estudios asocian la coinfección del GBV-C y el VIH con una menor progresión de la enfermedad y con una mayor supervivencia de los pacientes una vez que el SIDA se ha desarrollado. Sin embargo, el mecanismo de acción aún no se ha determinado. De este modo, el estudio de la interacción entre ambos virus podría dar lugar a nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento del SIDA. Por otro lado, en cuanto al diagnóstico, actualmente no existe ningún sistema comercial para detectar marcadores específicos de la infección causada por el GBV-C.

De esta manera, en esta tesis se ha estudiado la capacidad de diversas moléculas peptídicas de regiones de la proteína de envoltura E2 y de la proteína no estructural NS4a del GBV-C para inhibir la entrada del VIH-1 a la célula, con el fin de conocer su potencial aplicación como agentes terapéuticos contra dicho virus. Asimismo, se ha estudiado la utilidad de dichas construcciones para desarrollar nuevos sistemas de diagnóstico de la infección causada por el GBV-C, empleando el ensayo inmunoenzimático de ELISA y la técnica de microarrays.

En primer lugar, se ha realizado un estudio detallado de la proteína E2 del GBV-C mediante la preparación de microarrays peptídicos con 124 secuencias lineales de dicha proteína. Para ello, se han empleado sueros procedentes de pacientes infectados por el VIH-1, de los cuales se conocía la presencia o ausencia de anticuerpos anti-E2 del GBV-C, y sueros de personas voluntarias sanas. Este ensayo ha permitido identificar dominios potencialmente antigénicos de la proteína E2 del GBV-C.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y estudios previos realizados en el grupo de investigación, se ha llevado a cabo la síntesis de moléculas peptídicas derivadas del dominio N-terminal de la proteína E2 del GBV-C. Por un lado, se ha realizado la síntesis en fase sólida, siguiendo una estrategia Fmoc/tBu, de péptidos lineales y de MAPs tetraméricos de tipo lineal homogéneo (con cuatro secuencias peptídicas iguales) y de tipo lineal heterogéneo (con secuencias peptídicas iguales dos a dos). También se han sintetizado péptidos cíclicos en solución mediante la reacción de transesterificación intramolecular conocida como Ligación Química Nativa. Por último, se ha llevado a cabo la formación de MAPs tetraméricos de tipo cíclico mediante ligación quimioselectiva en solución. Todas las moléculas sintetizadas se han

caracterizado por HPLC, UPLC y espectrometría de masas (ESI y MALDI-TOF) y se han purificado por HPLC semipreparativo.

Posteriormente, se han realizado ensayos de fusión celular con el fin de evaluar la actividad anti-VIH-1 de las moléculas peptídicas que derivan del dominio N-terminal de la proteína E2 del GBV-C. Las líneas celulares empleadas fueron la Hela-env y la TZM-bl. De este estudio pudo concluirse que las construcciones de tipo cíclico tienen mayor tendencia hacia una mayor inhibición de la entrada del VIH-1 en la célula.

Se ha estudiado la capacidad para detectar anticuerpos anti-GBV-C de todas las secuencias y construcciones sintéticas mediante el ensayo inmunoenzimático de ELISA con sueros procedentes de pacientes con hepatitis C crónica, de pacientes sometidos a hemodiálisis, infectados con VIH-1 y sueros de donantes voluntarios sanos. Los resultados obtenidos demostraron la potencial utilidad diagnóstica de la región E2(7-26) del GBV-C.

Por último, con un panel de sueros de pacientes infectados por el VIH-1, del que no se tenía información sobre la presencia o ausencia de anticuerpos anti-E2 del GBV-C, se ha evaluado el valor diagnóstico de los dominios peptídicos identificados mediante microarrays. La combinación de las secuencias peptídicas ensayadas ha permitido establecer una reactividad del 47% en cuanto a la detección de anticuerpos anti-E2 del GBV-C en personas infectadas por el VIH-1. Además, esta tecnología ha miniaturizado el ensayo inmunoenzimático de ELISA y ha demostrado la utilidad de los péptidos sintéticos como potenciales antígenos para el desarrollo de un sistema de diagnóstico de la infección del GBV-C.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

A

A	Absorbancia
aa	Aminoácido
Abu	Ácido 2-aminobutírico
Ac	Anticuerpo
ACN	Acetonitrilo
AcOH	Ácido acético
Ag	Antígeno
Ahx	ácido 6-aminohexanoico
ANOVA	Análisis de Varianza
AUC	Área Bajo la Curva, (<i>Area Under Curve</i>)

B

Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonil
BSA	Albúmina Sérica Bovina (<i>Bovine Seric Albumin</i>)

C

CCF	Cromatografía en Capa Fina
CCI	Coefficiente de Correlación Intraclase
Cloranilo	Tetracloro-p-benzoquinona
CM	Cuadrado Medio
CO	Valor del punto de corte (<i>Cut-Off</i>)
Cy3	Indocarbocianina-3
Cy5	Indocarbocianina-5
Cyc-HT	Ciclo cabeza-cola de un péptido N-cisteinil, (<i>Cyclic Head to Tail N-cysteiny-peptide</i>)

D

DBU	1,8-diazabicyclo-[5,4,0]-undec-7-ene
DCU	Diciclohexilurea
DCM	Diclorometano
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's D5796

DHB Ácido 2,5-dihidroxibenzoico, (*2,5-Dihydroxybenzoic acid*)

DIEA N,N-diisopropiletilamina
 DIPCDI N,N'-diisopropilcarbodiimida
 DMF N,N'-dimetilformamida
 DMSO Dimetilsulfóxido

E

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético
 ELISA Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
 ESI Espectroscopia de Masas con Ionización por Electro spray (*ElectroSpray-Mass Spectroscopy*)
 ES⁺/ES⁻ Electro spray positivo/negativo

F

F F de Fisher
 FDR *False Discovery Rate*
 Fm 9-Fluorenilmetil
 Fmoc 9-Fluorenilmetoxicarbonil

G

GBV-C GB Virus C

H

HATU Hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo-[4,5-b]piridin-1-il-metilen]-N-metilmetanaminio
 HCCA Ácido hidroxicinámico (*Hydroxycinnamic Acid*)
 HD Hemodializados
 HOAt 1-Hidroxi-7-azabenzotriazol
 HOBt 1-Hidroxibenzotriazol

HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)	P	
HRP	Peroxidasa de Rábano Picante (<i>Horseradish Peroxidase</i>)	P25	Percentil 25
		P75	Percentil 75
		PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
		Pmc	2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonil
I		PyBOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(pirrolidin)fosfonio
I.C.	Intervalo de Confianza	R	
Ig	Inmunoglobulina	R.I.	Rango Intercuartílico
Igepal	Octilfenil-polietilenglicol	ROC	Curva de Rendimiento Diagnóstico (<i>Receiver Operating Characteristic</i>)
IgG	Inmunoglobulina G		
ivDde	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutil	RMN	Resonancia Magnética Nuclear
L		S	
LTR	<i>Long Terminal Repeats</i>	SA	Ácido Sinapínico (<i>Sinapinic Acid</i>)
LP	Lineal Positivo	SC	Suma de Cuadrados
M		SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight</i>	SPPS	Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (<i>Solid-Phase Peptide Synthesis</i>)
MAP	Péptido Multiantigénico (<i>Multiple Antigen Peptide</i>)	SDS	Dodecil sulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
MeOH	Metanol	T	
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilformazán	T	Temperatura
NOS	N-hidroxisuccinimida	t	Tiempo
N		TBAI	Yoduro de tetrabutilamonio
Ninhidrina	2,2-dihidroxi-1,3-indanodiona	TBTU	Tetrafluoroborato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il)(dimetilamino)metil]-N-metilmetaminio
NovaSyn TGR	4-(2',4'-dimetoxifenilamino-metil)-fenoxiacetamida	tBu	<i>tert</i> -butil
O		TCEP	Tris(2-carboxietil)fosfina
O ₂ Oc	ácido 3,6-dioxaoctanoico	TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico
OPD	Orto-fenilendiamina	TFA	Ácido trifluoroacético
		TIS	Triisopropilsilano
		TRIS	Tris(hidroximetil)-aminometano

Tritón x-100	Octilfenolpoli(etilenglicol) x
Trt	Trifenilmetil
Tween 20	Monolaureato de poli(oxyetilen) x- sorbitano

U

UV	Ultravioleta
UPLC	Cromatografía Líquida de Ultra Resolución (<i>Ultra-Performance Liquid Chromatography</i>)

V

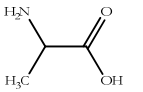
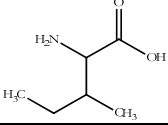
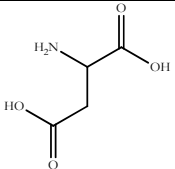
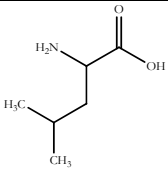
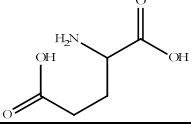
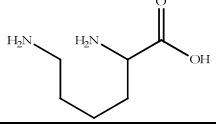
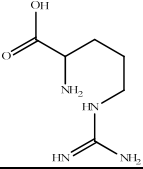
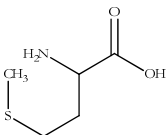
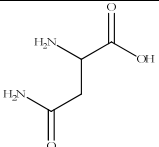
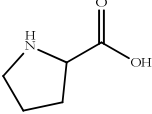
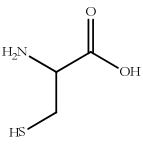
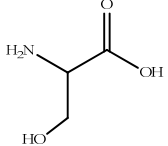
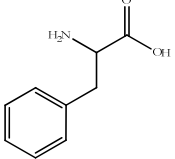
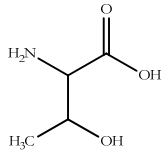
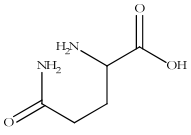
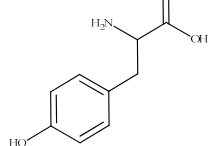
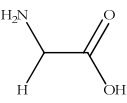
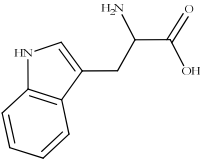
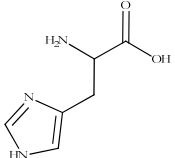
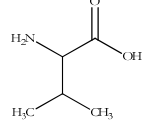
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VHC	Virus de la Hepatitis C

W

WSCDI	Hidrocloruro de 1-etil-3-(3'- dimetilaminopropil)carbodiimida Carbodiimida soluble en agua (<i>Water Soluble Carbonyldiimide</i>)
-------	--

APÉNDICE

Tabla 1. Aminoácidos, código de tres letras y estructura.

Aminoácido	Estructura	Aminoácido	Estructura
Alanina, Ala, A		Isoleucina, Ile, I	
Ácido aspártico, Asp, D		Leucina, Leu, L	
Ácido glutámico, Glu, E		Lisina, Lys, K	
Arginina, Arg, R		Metionina, Met, M	
Asparagina, Asn, N		Prolina, Pro, P	
Cisteína, Cys, C		Serina, Ser, S	
Fenilalanina, Phe, F		Treonina, Thr, T	
Glutamina, Gln, Q		Tirosina, Tyr, T	
Glicina, Gly, G		Triptófano, Trp, W	
Histidina, His, H		Valina, Val, V	

Las abreviaturas de los aminoácidos siguen la regla de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB: *J.Biol. Chem.*, **1981**, 256, 12-14 y *Eur. J. Biochem.* **1984**, 138, 9-37.

Tabla 2. Grupos protectores empleados en la estrategia Fmoc/tBut

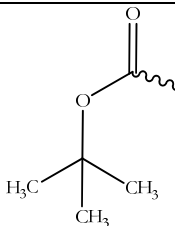
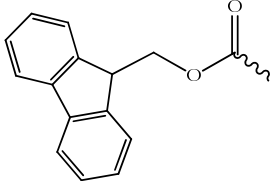
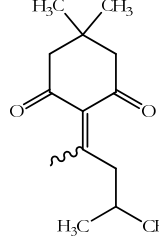
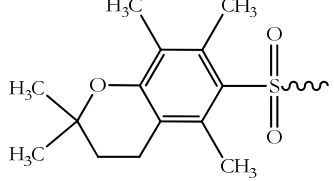
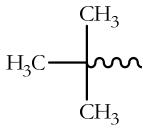
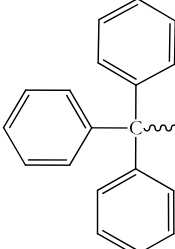
Grupo protector	Aminoácido	Estructura
<i>tert</i> -butoxicarbonil (Boc)	Cisteína, Cys, C Triptófano, Trp, W	
9-Fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc)	Todos los aminoácidos	
1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-4-iliden)-3-metilbutil (ivDde)	Lisina, Lys, K	
2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonil (Pmc)	Arginina, Arg, R	
<i>tert</i> -butil (tBu)	Ácido aspártico, Asp, D Ácido glutámico, Glu, E Serina, Ser, S Tirosina, Tyr, Y Treonina, Thr, T	
Tritil (Trt)	Asparagina, Asn, N Cisteína, Cys, C Glutamina, Gln, Q Histidina, His, H	

Tabla 3. Soportes sólidos utilizados en la síntesis de péptidos en fase sólida

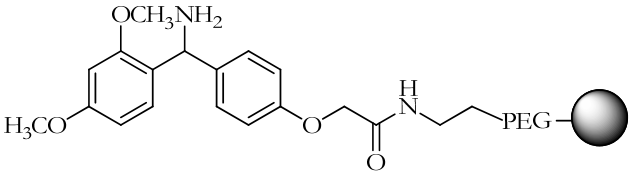
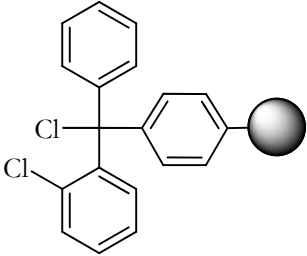
Nombre de la resina	Estructura
4-(2',4'-dimetoxifenilaminometil)- fenoxiacetamida (NovaSyn TGR)	
Cloruro de 2-clorotritil (Cl-trt)	

Tabla 4. Agentes de condensación y aditivos empleados en la síntesis de péptidos.

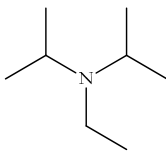
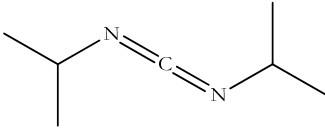
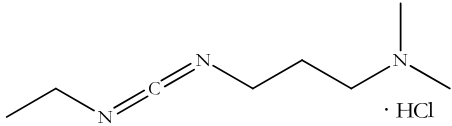
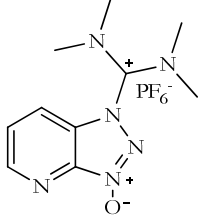
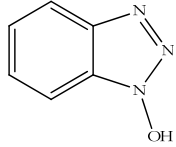
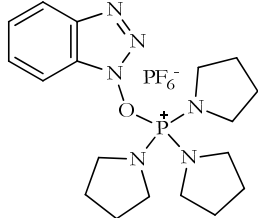
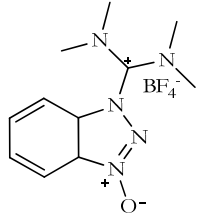
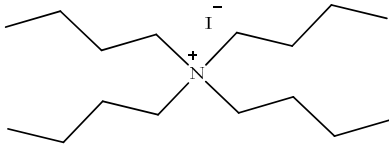
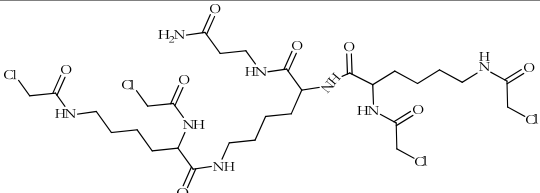
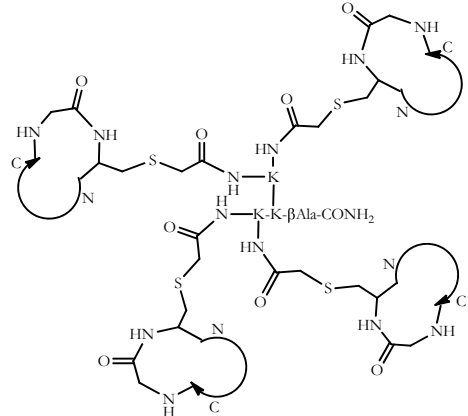
Nombre	Siglas	Estructura
N,N-Diisopropiletilamina	DIEA	
N,N'-Diisopropilcarbodiimida	DIPCDI	
Hidrocloruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida	WSCDI·HCl	
Hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo-[4,5-b]piridin-1-il-metilen]-N-metilmetanam	HATU	
1-Hidroxibenzotriazol	HOBT	
Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(pirrolidin)fosfonio	PyBOP	
Tetrafluoroborato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il)(dimetilamino)metilen]-N-metilmetaminio	TBTU	
Yoduro de tretrabutilamonio	TBAI	

Tabla 5. Índice de las moléculas peptídicas sintetizadas.

Nombre	Moléculas sintetizadas
NS4(27-43) cyc-HT-CysNS4(27-43)	(C)TDWDVKGGGSPLYRHGDG
E2(17-26) (LP3 _{E2}) cyc-HT-CysE2(17-26) (CP3)	(C)WQS[Abu]S[Abu]RANG
E2(11-26) (LP2 _{E2}) cyc-HT-CysE2(11-26) (CP2)	(C)FEPGLTWQS[Abu]S[Abu]RANG
E2(7-26) (LP1 _{E2}) cyc-HT-CysE2(7-26) (CP1)	(C)GSRPFEPGLTWQS[Abu]S[Abu]RANG
Núcleo de lisinas (ClCH ₂ CO) ₄ (K) ₂ K-βA	
MAP ₄ [E2(7-26),NS4(27-43)] (MAP _{E2/NS4})	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N-GSRPFEPGCTWQS[Abu]S[Abu]RANG} \\ \\ \text{H}_2\text{N-TDWDVKGGGSPLYRHGDG-K} \\ \\ \text{H}_2\text{N-GSRPFEPGCTWQS[Abu]S[Abu]RANG-K-K-}\beta\text{Ala-CONH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N-TDWDVKGGGSPLYRHGDG} \end{array}$
MAP ₄ E2(17-26) (MAP _{LP3})	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N-WQS[Abu]S[Abu]RANG} \\ \\ \text{H}_2\text{N-WQS[Abu]S[Abu]RANG-K} \\ \\ \text{H}_2\text{N-WQS[Abu]S[Abu]RANG-K-K-}\beta\text{Ala-CONH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N-WQS[Abu]S[Abu]RANG} \end{array}$
MAP ₄ E2(11-26) (MAP _{LP2})	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N-FEPGCTWQS[Abu]S[Abu]RANG} \\ \\ \text{H}_2\text{N-FEPGCTWQS[Abu]S[Abu]RANG-K} \\ \\ \text{H}_2\text{N-FEPGCTWQS[Abu]S[Abu]RANG-K-K-}\beta\text{Ala-CONH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N-FEPGCTWQS[Abu]S[Abu]RANG} \end{array}$
MAP ₄ E2(7-26) (MAP _{LP1})	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N-GSRPFEPGCTWQS[Abu]S[Abu]RANG} \\ \\ \text{H}_2\text{N-GSRPFEPGCTWQS[Abu]S[Abu]RANG-K} \\ \\ \text{H}_2\text{N-GSRPFEPGCTWQS[Abu]S[Abu]RANG-K-K-}\beta\text{Ala-CONH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N-GSRPFEPGCTWQS[Abu]S[Abu]RANG} \end{array}$
MAP _{CP3-4}	

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN

El GB virus C (GBV-C)^{1, 2} pertenece a la familia *Flaviviridae* y se caracteriza por presentar envuelta y una cadena de ARN sencilla de polaridad positiva. El modelo de su estructura se muestra en la figura 1.

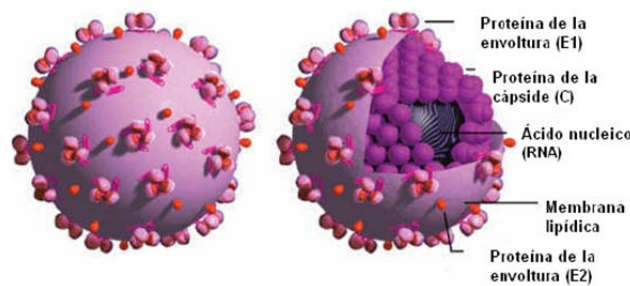


Figura 1. Estructura del GBV-C donde se observan las proteínas de envoltura E1 y E2 en la membrana lipídica, la proteína de la cápside y el ARN.

El genoma del GBV-C consta aproximadamente de 9.400 nucleótidos que codifican para una única poliproteína de unos 2.900 aminoácidos. En el extremo amino de ésta, se encuentran las proteínas de envoltura E1 y E2, y en el extremo carboxilo las proteínas no estructurales NS2, NS3, NS4 y NS5 (figura 2).

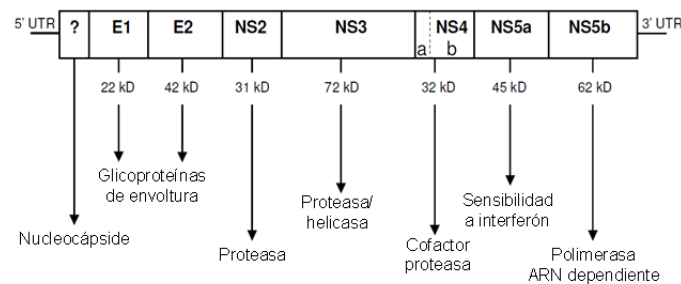


Figura 2. Genoma del GBV-C. Se señalan las diferentes regiones del genoma y las correspondientes proteínas codificadas.

A este virus también se le conoce como virus de la hepatitis G, ya que, cuando se descubrió, muchos grupos de investigación trataron de correlacionarlo con la inflamación hepática u otras enfermedades asociadas^{3, 4}. Sin embargo, no parece causar hepatitis ni ninguna otra patología^{5, 6}; por tanto, podría decirse que se trata de un virus humano no patogénico.

La infección con el virus GBV-C es bastante frecuente, encontrándose incluso en personas sanas⁷. Su prevalencia es mucho mayor en individuos considerados de riesgo, ya que comparte

las vías de transmisión con otros virus⁸⁻¹⁰, como por ejemplo con el virus de la hepatitis B (VHB)¹¹, el virus de la hepatitis C (VHC)¹² y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)^{6,13}. Así, la coinfección con estos virus es muy común. Se ha descrito que entre el 15% y el 20% de los individuos infectados por el VHC tienen además una infección activa por el GBV-C, y entre el 25% y el 70% presenta evidencias de contacto anterior con dicho virus, es decir, presencia de anticuerpos anti-E2¹⁴⁻¹⁶. En el caso de la coinfección con el GBV-C y el VIH-1, la prevalencia del primero sobre el segundo varía entre el 17% y el 40% de los enfermos¹³. En España, se han realizado varios estudios para conocer la prevalencia de infección por el GBV-C, y se ha concluido que entre el 6% y el 26% de los pacientes que requieren de hemodiálisis presentaron infección activa por dicho virus. Además, el 27% de los pacientes estudiados estaban coinfectados con el VHC, y el 19% con el VHB^{17,18}.

Por otro lado, las personas con frecuente exposición a sangre o productos sanguíneos (hemofílicos u otras coagulopatías) también poseen un elevado riesgo de adquirir el GBV-C. En este grupo de pacientes, la prevalencia de la infección activa del virus oscila entre el 14% y el 38%^{19,20}.

Algunos trabajos asocian la coinfección GBV-C/VIH con una menor progresión de la enfermedad y con una mayor supervivencia de los pacientes una vez que el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) se ha desarrollado^{13,21,22}. No obstante, aunque se sabe que el GBV-C se replica en células mononucleares de sangre periférica, incluyendo los linfocitos T y B²³, el mecanismo por el cual ejerce un efecto protector en pacientes infectados con el VIH todavía no se ha determinado.

En cuanto al diagnóstico, la infección activa por el GBV-C se detecta por la presencia del virus en el suero tras la amplificación de las secuencias del genoma del virus mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)²⁴. En el caso de la infección pasada, la presencia de anticuerpos anti-E2 podría considerarse un indicador²⁵. En este sentido, las empresas Abbott y Roche desarrollaron un ensayo inmunoenzimático que utilizaba como antígeno la proteína recombinante E2 de la envoltura viral para la detección de anticuerpos anti-GBV-C. Sin embargo, en la actualidad, este ensayo se encuentra descatalogado debido a la presencia de falsos negativos en algunos casos, baja sensibilidad en otros y errores en el diagnóstico debido a la variabilidad de estos ensayos. Por tanto, actualmente, no existe en el mercado ningún sistema que permita diagnosticar la infección pasada por el GBV-C. A esto hay que añadir que, en algunos trabajos, se ha detectado en suero la presencia simultánea de anticuerpos anti-E2 y de ARN viral^{26,27}. También se han descrito casos de personas expuestas al virus que no han

desarrollado anticuerpos contra la proteína E2²⁸, aunque no se descarta que se desarrollen anticuerpos dirigidos contra otras proteínas, como son las proteínas no estructurales. Por otro lado, algunos estudios proponen que los anticuerpos anti-E2 no son marcadores del todo fiables de la enfermedad pasada en poblaciones inmunodeprimidas²⁹, particularmente en pacientes coinfectados con el VHC que reciben terapia con interferón. Todo ello hace necesario el desarrollo de un nuevo sistema para el diagnóstico de la infección por el GBV-C.

En los últimos años, se han utilizado péptidos sintéticos lineales, cíclicos y ramificados para mimetizar epítomos específicos de agentes infecciosos de diversas enfermedades con el fin de desarrollar sistemas de diagnóstico^{30, 31}. En la Unidad de Síntesis y Aplicaciones Biomédicas de Péptidos (USiBAP) del Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC-CSIC), se ha estudiado la utilidad de péptidos sintéticos tanto de las proteínas estructurales como no estructurales del GBV-C para el desarrollo de nuevos sistemas de diagnóstico de la infección causada por el GBV-C³²⁻³⁴. Estas moléculas peptídicas actuarían como antígenos químicamente bien definidos garantizando una menor variabilidad inter- e intra-ensayos.

- **Virus de la Inmunodeficiencia Humana y GB virus C**

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) pertenece a la familia *Retroviridae* y se caracteriza por tener dos hebras idénticas, no unidas entre sí, de ARN monocatenario de polaridad positiva. También se caracteriza por su capacidad de transcribir su ARN en una doble cadena de ADN mediante la enzima transcriptasa inversa para, de este modo, poder replicarse. El VIH tiene forma esférica y una bicapa lipídica externa que recubre un core nucleoproteico (cápside) que alberga el material genético viral (figura 3).

En la actualidad, se conoce la existencia de dos variantes de este virus, el VIH de tipo 1 (VIH-1)³⁵ y el VIH de tipo 2 (VIH-2)³⁶, siendo este último menos patogénico^{37, 38}. Este trabajo se centrará en el VIH-1, ya que su frecuencia de infección es mayor que la del VIH-2^{39, 40}.

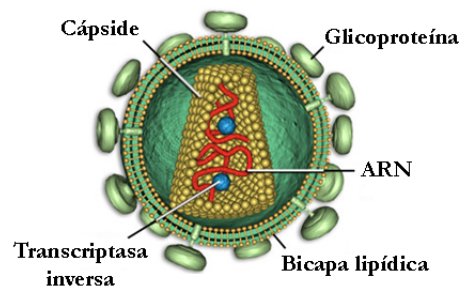


Figura 3. Estructura del VIH donde se observan las glicoproteínas en la bicapa lipídica y el material genético y la transcriptasa inversa dentro de la cápside.

El VIH invade fundamentalmente los linfocitos T CD4⁺, lo que da lugar a la destrucción del sistema inmune, favoreciendo la aparición de enfermedades oportunistas, como por ejemplo la candidiasis, la tuberculosis, la toxoplasmosis o la neumonía, que finalmente pueden provocar la muerte del paciente.

El ciclo de vida del VIH se ilustra en la figura 4. Puede dividirse en dos fases: la fase temprana y la fase tardía. La primera comienza cuando un virión se une a la superficie celular y finaliza con la integración del ADN viral dentro del genoma de la célula huésped. En la fase tardía se produce la transcripción y procesamiento del ARN viral a partir del ADN viral integrado. Esta fase acaba con la liberación de los viriones al medio extracelular, donde madurarán hasta convertirse en viriones infectivos.

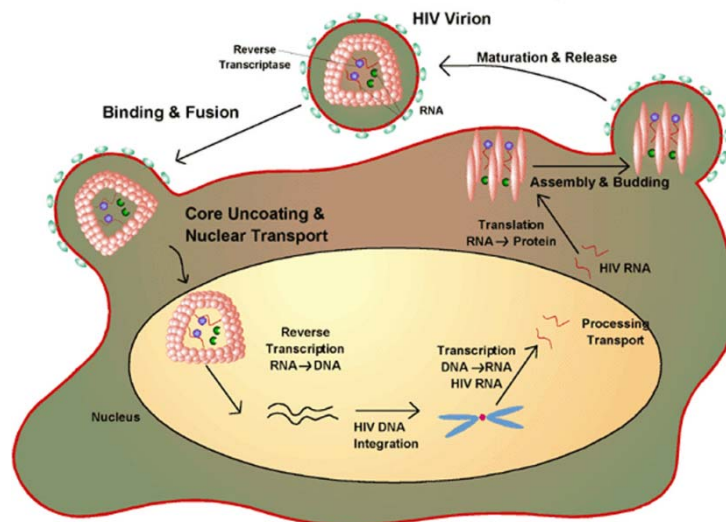


Figura 4. Ciclo de vida del VIH. El virus es reconocido por los receptores CD4 y los coreceptores CCR5 o CXCR4, y tras producirse la fusión de membranas, el ARN viral se transcribe a ADN, que se integra en el genoma celular.

Recientemente, se ha demostrado que dos proteínas del GBV-C inhiben la replicación del VIH *in vitro*⁴¹. Una de ellas es la glicoproteína de envoltura E2, que disminuye la expresión de los coreceptores CCR5 e induce uno de sus ligandos (RANTES), lo que ocurre en las etapas previas a la replicación (unión del virus y fusión). La segunda proteína es la no estructural NS5a, que disminuye la expresión del receptor CXCR4 y aumenta la liberación de su ligando (SDF-1)⁴². Asimismo, trabajos recientes realizados en nuestro grupo de investigación, han descrito ciertos dominios peptídicos pertenecientes a la proteína de envoltura E2 del GBV-C que dan lugar a

una notable disminución de la fusión de la membrana celular, interfiriendo en la infectividad del VIH-1 de una manera dosis-dependiente⁴³.

En los últimos años, ha aumentado el interés de los péptidos sintéticos como agentes terapéuticos contra el VIH-1, debido a su baja toxicidad y la versatilidad de las secuencias peptídicas a ser modificadas para así mejorar su distribución en el organismo, y con ello su eficacia. Actualmente, el único péptido inhibidor del VIH-1 aprobado para uso clínico es el conocido como T-20 o Enfurtivide⁴⁴, que inhibe la entrada del virus en la célula. No obstante, ya han aparecido mutantes resistentes. Otro péptido inhibidor es el denominado VIRIP⁴⁵ (*virus inhibitory peptide*), que también inhibe la fusión del VIH-1, incluso a concentraciones inferiores a las del T-20, actuando a nivel del péptido de fusión del VIH-1.

Actualmente, el tratamiento utilizado para evitar la replicación del VIH en enfermos de SIDA es la terapia antirretroviral de gran actividad (HAART, *Highly Active Antiretroviral Therapy*), basada en la combinación de fármacos de diferentes familias. Sin embargo, este tratamiento es bastante agresivo. Por otro lado, se ha demostrado que los pacientes que habían iniciado este tratamiento y estaban infectados por el GBV-C mostraban una mejor respuesta inicial y un mantenimiento más largo de la supresión del VIH con un menor riesgo de rebote viral durante dicho tratamiento⁴⁶.

A pesar de que existe un amplio número de posibilidades en el tratamiento de la infección por el VIH, no dejan de surgir resistencias a los antirretrovirales ya conocidos, por lo que queda patente la necesidad de desarrollar nuevos inhibidores de éste. Así, el estudio de interacción del VIH con el GBV-C podría dar lugar a la identificación de nuevos agentes terapéuticos contra el SIDA.

- **Diseño de construcciones peptídicas con potenciales aplicaciones diagnósticas y terapéuticas**

Desde el desarrollo de la biotecnología, a principios de los años 90, los antígenos recombinantes fueron utilizados para la detección de anticuerpos en laboratorios de diagnóstico clínico. Sin embargo, su uso en pruebas diagnósticas ha dado lugar a varios problemas. En primer lugar, algunos parecen ser menos inmunorreactivos que los correspondientes antígenos humanos purificados, debido a la ausencia de modificaciones post-traduccionales de las proteínas expresadas a partir de bacterias y/o la adopción de una estructura mal plegada. En segundo lugar, la producción en elevada calidad y cantidad de antígenos recombinantes es a menudo

laboriosa y cara. Por último, se han descrito algunos problemas en cuanto a la reproducibilidad de estos métodos, principalmente debido a variaciones de reactividad inter-ensayo cuando se emplean diferentes lotes de proteínas.

En las últimas décadas, los péptidos sintéticos que mimetizan epítomos específicos de proteínas de agentes infecciosos han sido utilizados tanto en el diseño molecular de vacunas como en el desarrollo de sistemas de diagnóstico para la detección de un gran número de enfermedades infecciosas ya sean de origen viral^{47, 48}, parasitario^{49, 50} o bacteriano⁵¹. En cuanto al diagnóstico de enfermedades infecciosas, los péptidos sintéticos pueden actuar como antígenos uniformes, químicamente bien definidos, reduciendo la variación inter- e intra-ensayo, y aumentando la sensibilidad y la especificidad de los sistemas de diagnóstico.

El principal objetivo en el desarrollo de sistemas de diagnóstico basados en péptidos es reconocer anticuerpos específicos inducidos por un conjunto de proteínas, pero utilizando pequeños fragmentos seleccionados que contengan los determinantes antigénicos adecuados. El éxito dependerá de la capacidad de los péptidos sintéticos para mimetizar los epítomos inmunodominantes de estas proteínas.

Además de la capacidad de algunos péptidos para mimetizar epítomos específicos de algunas proteínas antigénicas, éstos presentan otras ventajas como la posibilidad de modificar su estructura química mediante la unión covalente de diferentes moléculas como la biotina, residuos de cisteína, ácidos grasos y proteínas transportadoras. También pueden incorporarse modificaciones post-traduccionales como la fosforilación o la citrulinación, añadir residuos no-naturales como los D-aminoácidos, unir otros residuos orgánicos, y por último, existe también la posibilidad de ciclar y/o multimerizar las secuencias antigénicas.

Sin embargo, la utilización de péptidos sintéticos lineales como sustratos en ensayos inmunoenzimáticos puede dar resultados menos sensibles de los esperados. En el caso de los péptidos cortos, especialmente aquellos que contienen cadenas laterales poco hidrófobas, son generalmente poco antigénicos en los inmunoensayos en fase sólida debido a que se adsorben débilmente en el poliestireno, material habitual en las placas de inmunoensayo. Además, las secuencias peptídicas pueden ver limitada o disminuida su antigenicidad cuando las cadenas laterales no quedan lo suficientemente expuestas, adoptando conformaciones que impiden un buen reconocimiento por parte de las inmunoglobulinas. Los péptidos de pequeño tamaño

pueden no adoptar una conformación estable en solución y sólo una pequeña fracción de éstos adopta una conformación comparable a la que se presenta en el lugar antigénico de la proteína completa.

Una alternativa para solventar la problemática anteriormente descrita consiste en la obtención de péptidos quiméricos y péptidos ramificados (*Multiple Antigenic Peptides*, MAPs), que pueden mejorar su reactividad frente a los anticuerpos, ya que combinan dos o más epítomos en una misma molécula. Además, la introducción de restricción de movilidad en los péptidos mediante la formación de ciclaciones intramoleculares reduce el repertorio conformacional de las secuencias lineales, lo que supone una mimetización antigénica más eficaz.

Los péptidos ramificados fueron introducidos por J.P. Tam *et al.*^{52, 53}. Estas moléculas son construcciones peptídicas basadas en un núcleo de lisinas, inmunológicamente inerte, al que se unen las secuencias peptídicas. Durante las pasadas dos décadas, los MAPs se han empleado en diferentes campos de la investigación, como son la biología molecular, la inmunología o la bioquímica y sus aplicaciones terapéuticas⁵⁴. La mayor utilidad de estas moléculas consiste en su empleo como reactivos de inmunoensayo para la serodiagnos⁵⁵, como moléculas marcadas en el diagnóstico por imagen⁵⁶, en vacunas como reactivos inmunoestimuladores para la producción de anticuerpos⁵⁷, y como agentes terapéuticos^{58, 59}. En este sentido, este tipo de construcciones sintéticas pueden actuar como inhibidores virales polivalentes debido a la presencia de múltiple sitios de contacto en una misma molécula, lo que podría prevenir eficientemente o evitar las interacciones moleculares que permiten la entrada de los virus en la célula huésped⁶⁰.

Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación, describen la capacidad antigénica tanto de péptidos quiméricos como de péptidos lineales y cíclicos de las proteínas estructurales y no estructurales del GBV-C^{33, 61}, utilizando sueros de pacientes afectados de hepatitis C crónica y hemodializados. Paralelamente, se han estudiado varias secuencias peptídicas correspondientes a las proteínas de envoltura E1 y E2 del GBV-C para conocer las regiones relacionadas con el proceso de fusión del virus en la célula⁶²⁻⁶⁴, e investigado epítomos lipoderivados del GVB-C en modelos lipídicos de membrana^{34, 65, 66}. Asimismo, se ha analizado el papel de estos péptidos como potenciales inhibidores del péptido de fusión del VIH-1⁶⁷⁻⁷¹.

Por todo ello, teniendo en cuenta las potenciales utilidades de los péptidos ramificados, así como las de los péptidos cíclicos, en la presente tesis se abordará la síntesis y el estudio de construcciones sintéticas, con la finalidad de desarrollar nuevos sistemas de diagnóstico de la infección causada por el GBV-C en pacientes infectados por el VIH-1, así como identificar nuevos agentes terapéuticos contra dicho virus.

OBJETIVOS

Los objetivos globales de este proyecto son, por una parte, el diseño y desarrollo de un sistema de diagnóstico, basado en péptidos sintéticos, que permita la detección de la infección causada por el GBV-C y, por otra, la aplicación de las construcciones peptídicas derivadas del mismo como agentes terapéuticos contra el VIH-1.

Así, en esta tesis se estudiarán varias estrategias tanto en el diseño de construcciones peptídicas, como en el estudio de dos metodologías diferentes basadas en péptidos sintéticos, que tienen como finalidad reconocer anticuerpos dirigidos contra proteínas del GBV-C. Asimismo, se estudiará la capacidad de las moléculas sintetizadas de inhibir la fusión celular mediada por la proteína de envoltura del VIH-1 con el fin de seleccionar potenciales inhibidores de la entrada del virus a la célula.

Los objetivos concretos de esta tesis son los siguientes:

1. Identificar dominios potencialmente antigénicos de la proteína E2 del GBV-C mediante la técnica de microarrays, empleando para ello sueros procedentes de pacientes infectados por el VIH-1 y de personas voluntarias sanas.
2. Diseñar y sintetizar diversas formas de presentación del dominio seleccionado N-terminal de la proteína E2 del GBV-C.
3. Evaluar la actividad anti-VIH-1 de las construcciones que derivan del dominio N-terminal de la proteína E2 del GBV-C mediante ensayos de fusión celular.
4. Evaluar la utilidad del valor diagnóstico de anticuerpos anti-péptidos derivados de la proteína E2 del GBV-C en pacientes infectados por el VIH-1 para el desarrollo de una prueba serodiagnóstica con utilidad para la detección de anticuerpos específicos contra la proteína E2 del GBV-C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ESTUDIO ANTIGÉNICO DE LA PROTEÍNA E2 DEL GBV-C POR MICROARRAYS

1.1. MICROARRAYS DE PÉPTIDOS

Los microarrays pueden definirse como dispositivos analíticos que se caracterizan por llevar a cabo los ensayos a partir de puntos microscópicos o *spots* depositados sobre soportes planos (portaobjetos o *slides*), que se distribuyen en filas y columnas. La detección de las interacciones puede medirse mediante fluorescencia, quimioluminiscencia, electroluminiscencia y radioactividad.

Esta técnica está presente en diversos campos de la ciencia gracias a su gran versatilidad. Por ejemplo, en genómica por ser una manera rápida y económica de interpretar la función genética^{72, 73}, como se ha demostrado con los microarrays de ADN⁷⁴⁻⁷⁶. También se han desarrollado microarrays incluyendo tejidos⁷⁷, células^{78, 79}, proteínas^{80, 81}, hidratos de carbono^{82, 83}, moléculas pequeñas⁸⁴ y, como en el caso que nos ocupa, péptidos⁸⁵⁻⁸⁹.

La técnica de microarrays aplicada a péptidos comenzó en los años 80⁹⁰, pero no es hasta los años 90 cuando comienza a desarrollarse gracias a la publicación de R. Frank *et al.* de la técnica de síntesis SPOT⁹¹, que consistía en la síntesis y posterior barrido de un gran número de péptidos y otros compuestos orgánicos impresos sobre un soporte plano de celulosa^{92, 93}; y gracias también a la técnica ideada por S. Fodor *et al.*, que combinaba la química en fase sólida, grupos protectores fotolábiles y la fotolitografía⁹⁴. Con esta técnica se usaba la luz para dirigir por el espacio la síntesis simultánea de diferentes compuestos químicos sobre un soporte sólido.

Las principales ventajas de la utilización de la tecnología de los microarrays peptídicos y de proteínas en el campo del diagnóstico son su alto rendimiento y elevada precisión, así como la posibilidad de permitir la unión específica de las moléculas al soporte sólido, que puede funcionalizarse con diferentes tipos de agentes de captura (anticuerpo, antígenos, aptámeros); concretamente, en el estudio de la interacción antígeno-anticuerpo, permiten una alta unión específica que da lugar a señales relacionadas con la concentración del anticuerpo presente en la muestra problema. Por otro lado, esta técnica miniaturiza los ensayos de ELISA, permitiendo un escaneo rápido de un gran número de secuencias peptídicas y la utilización de bajos volúmenes

de reactivos. Dado que el formato de los microarrays es mucho más reducido que el de ELISA, pueden simultanearse múltiples experimentos, lo que disminuye el tiempo de ensayo. Además, pueden combinarse diferentes anticuerpos marcados con distintos fluoróforos, permitiendo un marcaje fluorescente multicolor en función del estudio⁹⁵.

Los arrays peptídicos tienen gran utilidad en el diagnóstico de enfermedades humanas, tanto infecciosas como autoinmunes y alérgicas^{96,97}. Así, por ejemplo, mediante una ligación específica de péptidos, se ha desarrollado un ensayo inmunoenzimático que permite la detección simultánea de anticuerpos dirigidos contra los virus de la hepatitis B y C, el virus de inmunodeficiencia humana, el virus Epstein-Barr y el de la sífilis⁹⁸. También se han fabricado microarrays para el diagnóstico del virus del herpes simple y el coronavirus humano⁹⁹, para la diagnosis de la enfermedad hidatídica o equinococosis¹⁰⁰, o para identificar diferentes perfiles de sueros en pacientes con artritis reumatoide¹⁰¹, entre otros.

Por otro lado, sin embargo, el tratamiento de los datos obtenidos es laborioso. A pesar del considerable progreso científico, aún quedan muchas cuestiones relacionadas con la calidad, el análisis y la interpretación de los datos obtenidos tras los experimentos de microarrays. Actualmente, no existe ningún método establecido para el análisis de datos, encontrándose en la bibliografía el uso de gran variedad de métodos estadísticos y programas informáticos¹⁰²⁻¹⁰⁶.

1.1.1. Soportes sólidos

Existen multitud de soportes para la realización de estos ensayos. Según como estén funcionalizados, la unión del péptido puede establecerse mediante:

- Adsorción física^{107, 108} mediante interacciones iónicas o hidrofóbicas o enlaces de hidrógeno. Los soportes más comunes son los formados por nitrocelulosa¹⁰⁹, poli-L-lisina¹¹⁰ o aminosilano¹¹¹.
- Atrapamiento físico con un gel como agarosa¹¹² o poliacrilamida¹¹³, o los hidrogeles^{114, 115} (microarrays 2D o 3D).
- Enlace covalente a través de grupos funcionales, como aminas primarias¹¹⁶⁻¹¹⁸ o tioles^{119, 120}
- Afinidad. La inmovilización es orientada, uniforme y específica, mediante reconocimiento molecular¹²¹⁻¹²³.

En esta tesis se utilizaron portaobjetos funcionalizados con epóxido 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (*Epoxide*), que permite una unión covalente de los péptidos; y soportes de unión adsorbente funcionalizados con γ -aminopropilsilano, denominados UltraGAPS (*Gamma Amino Propyl Silane*) y cargados positivamente, lo que facilita las interacciones iónicas con los péptidos (figura 1.1).

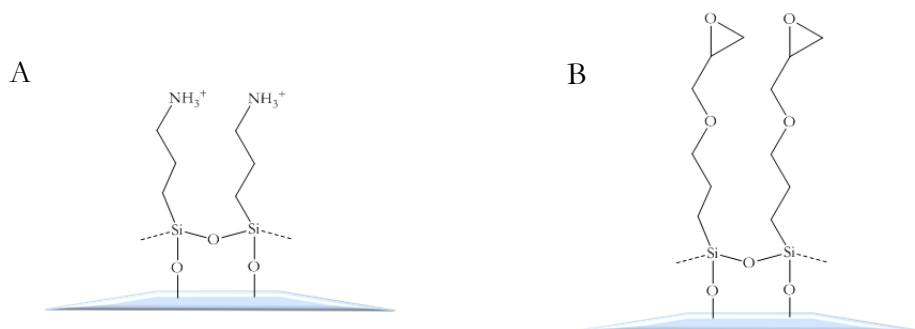


Figura 1.1. Estructura de los soportes sólidos funcionalizados con γ -aminopropilsilano, UltraGAPS (A) y epóxido 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano, *Epoxide* (B).

Una vez inmovilizados los péptidos, para poder llevar a cabo los ensayos, es necesario dividir estos soportes sólidos planos utilizando unas gradillas de silicona. De esta manera, se divide cada *slide* en diferentes áreas de reacción, pocillos o *subarrays*. Existen en el mercado gran variedad de gradillas que permiten crear desde 2 a 384 pocillos. En esta tesis, los portaobjetos se dividieron en 16 pocillos, y cada uno de ellos contenía la misma distribución de péptidos en filas y columnas.

1.1.2. Métodos de impresión

La etapa de impresión e inmovilización de las moléculas sobre el soporte sólido consiste en depositar sobre el *slide* gotas o *spots* de la solución de la muestra. Se depositan del orden de nanolitros o picolitros de una manera ordenada previamente diseñada.

Las técnicas de fabricación de microarrays son muy variadas, pero todas tienen como objetivo una impresión eficiente y uniforme de pequeñas gotas de las moléculas en cuestión. Estas técnicas pueden clasificarse en dos grandes grupos¹²⁴: impresión por contacto o sin contacto.

- Impresión por contacto. El aparato de impresión entra en contacto físico con el sustrato mientras deposita las muestras. Estas técnicas emplean diferentes tipos de agujas, puntas o *pins*, pudiendo distinguirse entre agujas sólidas (*solid pins*)¹²⁵, agujas con hendidura (*Split spins*)^{126, 127},

nano-puntas (*nano-tips*)^{128, 129} y microsellos (*microstamps*)^{130, 131}. Éste último tipo permite la impresión de un gran número de moléculas en paralelo, mientras que cuando se utilizan *pins*, las moléculas se depositan en serie. En la figura 1.2 se muestra un esquema de algunos de ellos.

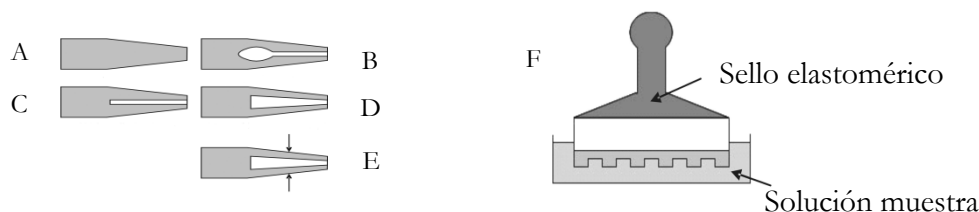


Figura 1.2. Esquemas de *pins* de impresión. *Pin* sólido (A). Agujas con hendidura: Ink-stamp (B), *split pin* fino (C), *split pin* con ancho variable (D), *split pin* ajustable (E). Microsellos (F).

- Impresión sin contacto. No existe contacto físico entre el soporte y el sustrato. Esta técnica reduce la contaminación y tiene mayor rendimiento. Dentro de este grupo se encuentra la impresión fotoquímica¹³², como la fotolitografía¹³³; la impresión electroquímica^{134, 135}; mediante la acción de un láser¹³⁶ y por dispensador de gotas¹³⁷, como la impresión *inkjet*^{138, 139} o por electrospray^{140, 141}.

En esta tesis, debido al tipo de robot de impresión de que se disponía, la técnica utilizada fue la impresión por contacto mediante un *pin* con hendidura del tipo C (figura 1.2), de tal forma que la solución se carga por capilaridad, como se indica en el esquema de la figura 1.3. Con el fin de evitar la contaminación entre muestras, se realizaron ciclos de lavado y secado del *pin*. Éstos se realizaron en la estación de lavado que contenía el impresor de proteínas, con 10% etanol/agua MilliQ mediante sonicación y el posterior secado con aire a presión.

Por otro lado, cabe destacar que con una única carga pueden imprimirse un gran número de *spots*. En este caso, el *pin* utilizado (946MP4, ArrayIt) cargaba un volumen de 250 nl y, cada vez que entraba en contacto con el soporte, depositaba 1,1 nl.

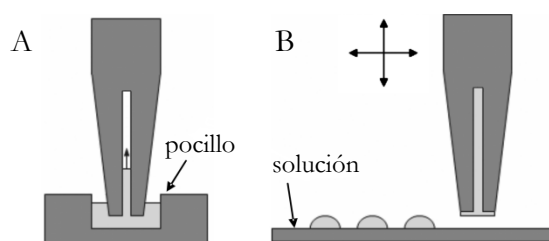


Figura 1.3. Proceso de impresión. A) El *pin* se carga por capilaridad con la solución del pocillo de la placa. B) Impresión de múltiples *spots* con una misma carga del pin.

1.1.3. Métodos de detección

Como se ha dicho anteriormente, la detección de las interacciones puede medirse mediante fluorescencia, quimioluminiscencia, electroluminiscencia y radioactividad.

En cuanto a los *arrays* peptídicos, la detección por fluorescencia es la técnica más empleada en el estudio de la interacción antígeno-anticuerpo. Para ello, se utiliza un anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo, siendo los más comunes el Cy5¹⁰⁰ y el Cy3¹⁰¹, de la familia de la cianina o el Dylight 649¹⁴², de la familia Dylight Flúor, que es similar al Cy5.

Una vez escaneado el soporte sólido, se genera una imagen formada por filas y columnas de *spots*. La fluorescencia de cada *spot* se calcula como la mediana de la fluorescencia de los píxeles que lo componen.

En este trabajo, la detección se llevó a cabo utilizando como anticuerpo secundario una anti-inmunoglobulina G (anti-IgG) humana de mono, conjugada con el fluoróforo Dylight 649, específica de los fragmentos Fc γ . Este fluoróforo tiene su máximo de excitación a 652 nm y su máximo de emisión a 670 nm. Además, la señal emitida es más intensa que la emitida por otros fluoróforos, como el Cy5, y los experimentos se obtienen con menor ruido de fondo.

1.2. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE MICROARRAYS COMO ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO

Los experimentos se llevaron a cabo en la Plataforma de Transcriptómica del Parc Científic de Barcelona, con el asesoramiento de la Dra. Lúdia Sevilla y el Dr. Ignacio Pons.

El protocolo seguido en la realización de los ensayos con microarrays (apdo. 6, Materiales y métodos) fue muy similar, una adaptación, al procedimiento de la técnica de ELISA, que se describirá posteriormente en la sección 4 de esta tesis y que ya se había puesto a punto con anterioridad en el grupo de laboratorio. Las principales diferencias fueron la incorporación de los péptidos sobre el soporte sólido (impresión de péptido) y la detección de la unión antígeno-anticuerpo (anticuerpo secundario marcado con fluoróforo).

En primer lugar, se imprimen los péptidos en los soportes sólidos con el robot de impresión a temperatura ambiente (25°C) y humedad constantes (55-60%), y se dejan secar a 4°C. Seguidamente, tras colocar las gradillas para dividir los portaobjetos, se bloquea la superficie de los *slides* donde no se ha imprimido el péptido para evitar interacciones inespecíficas en los pasos posteriores del experimento, y se incuban los sueros diluidos. Pasado el tiempo de reacción, se lavan los soportes, para adicionar posteriormente el anticuerpo secundario marcado con el fluoróforo. Por último, tras otro proceso de lavado, se secan los soportes y se escanean, obteniendo una imagen para cada *slide*, el cual se divide en 16 pocillos o *subarrays*. En cada *slide*, además, se incluyen dos controles negativos, es decir, dos pocillos en los que no se incubaba ningún suero, si no únicamente tampón de dilución. En la figura 1.4 se ejemplifica el ensayo.

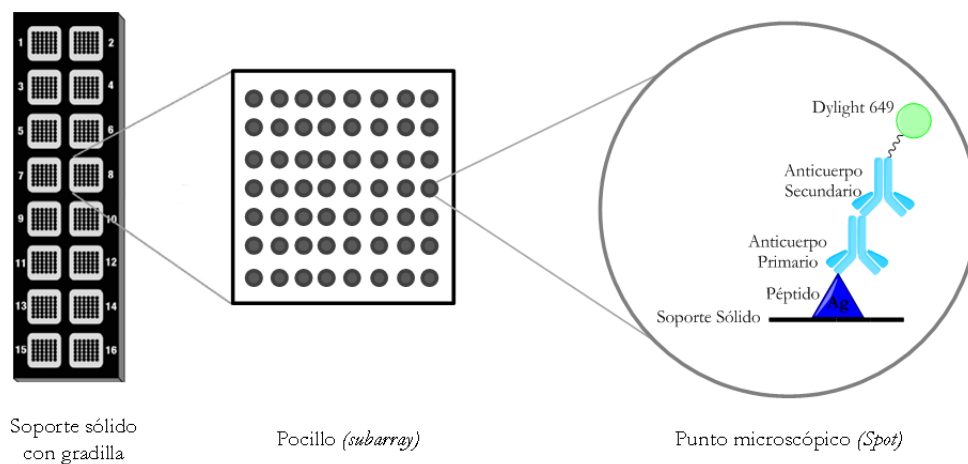


Figura 1.4. Esquema del experimento de microarrays.

Con el fin de encontrar las mejores condiciones para llevar a cabo el estudio, se compararon dos tipos de soporte sólido (unión por adsorción y unión covalente) y diferentes concentraciones de péptido y suero. El péptido y los sueros empleados en la puesta a punto del ensayo habían sido perfectamente caracterizados previamente en nuestro grupo en cuanto al diagnóstico de la artritis reumatoide¹⁴³.

1.2.1. Comparación de soportes sólidos

Se realizó un primer experimento utilizando el *slide* de unión por adsorción (UltraGAPs) y el *slide* de unión covalente (*Epoxide*) (figura 1.1). Se probaron tres concentraciones diferentes de péptido (0,25; 0,5 y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en PBS-T_{0,005%} para una misma dilución de suero (1/50) en tampón

RIA (empleado en el ensayo de ELISA) y de anticuerpo secundario (1/1.000) en PBS-T_{0,005%}. En este experimento, se imprimió el péptido de forma manual sobre el soporte depositando, por duplicado, 1 μ l en cada pocillo de cada *slide* (figura 1.5-A). El ensayo se realizó con un suero positivo, un suero de una persona sana (suero negativo) y con tampón de dilución de los sueros (tampón RIA). Pasado el tiempo de incubación de los sueros, se hicieron los lavados de los pocillos con tampón PBS-T y se añadió el anticuerpo secundario Dylight 649. Pasado el tiempo de reacción, se volvió a lavar el *slide*, se secó y se escaneó. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1.5.

Tras el análisis de los datos de fluorescencia (figura 1.5), se observó que existía una disminución de la señal de fluorescencia en ambos soportes a medida que disminuía la concentración de péptido, siendo esta disminución más acusada en el soporte *Epoxide*. Estos datos se obtuvieron restando el ruido de fondo o *background* local a la fluorescencia de cada *spot*, y posteriormente, calculando la media para cada duplicado. Finalmente, se observó que se obtenían valores de fluorescencia considerablemente más elevados cuando el péptido se inmovilizaba en el soporte en el que la unión se produce mediante adsorción (soporte UltraGAPs), es decir, mediante interacciones iónicas.

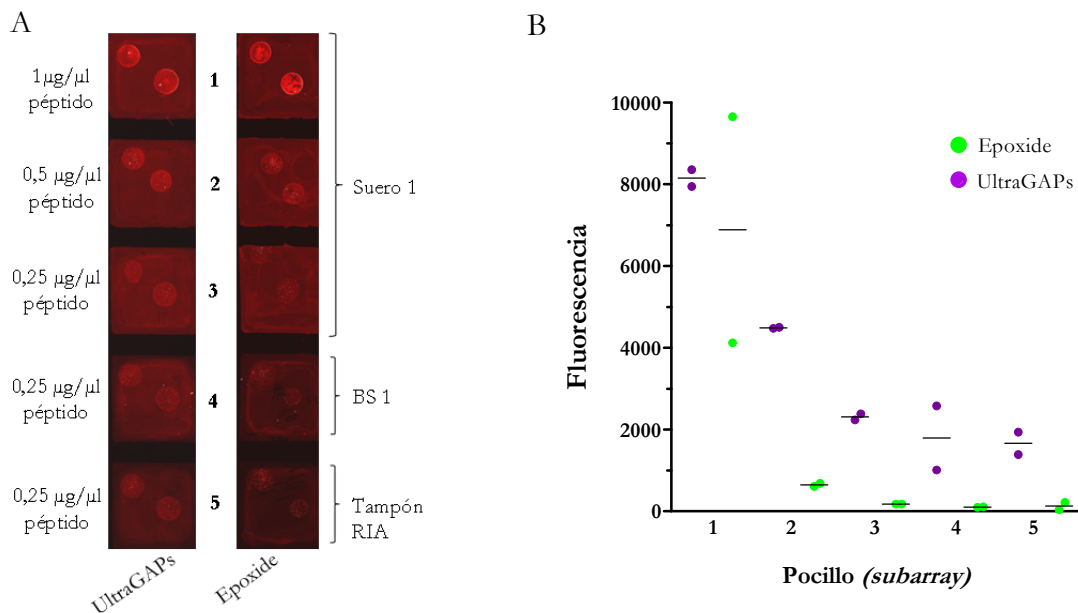


Figura 1.5. Experimento para la comparación de soportes sólidos. A) Imagen obtenida tras escanear los soportes sólidos. B) Valores de fluorescencia obtenidos en cada pocillo en los distintos soportes. La línea horizontal representa la mediana.

Teniendo en cuenta estos resultados y considerando el trabajo realizado por R.C. Zangar y colaboradores¹⁴⁴, donde comparan diferentes tipos de superficies que pueden emplearse en el desarrollo de microarrays para la detección de anticuerpos, se decidió realizar los ensayos posteriores inmovilizando los péptidos mediante adsorción, es decir, sobre soportes sólidos de tipo UltraGAP. Asimismo, R.C. Zangar concluye en su estudio que con los soportes funcionalizados con aminosilano se obtienen mejores resultados que con aquéllos de unión covalente, principalmente debido a que los primeros dan lugar a una menor señal de ruido de fondo que los segundos.

1.2.2. Concentración del péptido unido a la placa

Según el experimento anterior, en el caso de la interacción entre el péptido y un suero control positivo, se observó una mayor señal de fluorescencia a mayor concentración de péptido. Con el fin de encontrar una concentración óptima, que permitiera obtener una buena señal de fluorescencia, se realizó otro experimento imprimiendo el péptido de forma automática a dos concentraciones diferentes (0,5 y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sobre el soporte sólido. Como control positivo del ensayo se imprimió el suero positivo, que debía dar señal de fluorescencia al incubarlo con el anticuerpo secundario; y como control negativo, el tampón de bloqueo (5% BSA en PBS- $T_{0,005\%}$), que no debía dar señal de fluorescencia.

También se imprimieron dos diluciones tamponadas, PBS- $T_{0,005\%}$ y PBS- $T_{0,005\%}$ con 0,5% BSA, con la finalidad de escoger aquélla que mostrara una menor señal de fluorescencia. Se hicieron 10 réplicas en cada caso.

La superficie impresa se incubó con dos diluciones (1/50 y 1/100) tanto del suero positivo como del suero control negativo, así como con tampón de bloqueo. La incubación se llevó a cabo durante 1h 30 minutos con agitación suave. En este experimento, se cambió el tampón de dilución de los sueros (inicialmente tampón RIA) por PBS- $T_{0,005\%}$ con 5% BSA con el fin de disminuir el ruido de fondo observado en el experimento anterior (figura 1.5-A). Pasado el tiempo de incubación y tras el proceso de lavado, se añadió el anticuerpo secundario (dilución 1/1.000). También en este caso, se cambió el tampón de dilución del anticuerpo secundario (PBS) por PBS- $T_{0,005\%}$ con 5% BSA con la intención de disminuir el *background* de la superficie. Finalizado el proceso de incubación, de lavado y secado, se escaneó el soporte obteniéndose la imagen que se muestra en la figura 1.6.

Como era de esperar, se observó fluorescencia en los *spots* correspondientes al control positivo (suero), y no se observó en el control negativo (impresión con 5% BSA en PBS-T_{0,005%}). Además, puede apreciarse que algunos *spots* no estaban bien definidos (presencia de “colas de cometa”) y que la señal de la superficie no era uniforme. Esto fue debido a que las etapas de incubación se llevaron a cabo con agitación, por lo que en los sucesivos experimentos estas etapas se dejaron transcurrir en reposo.

Se representaron los resultados de fluorescencia obtenidos para las dos concentraciones de péptido y para el tampón de dilución PBS-T_{0,005%} (figura 1.7). Como se observa, para una misma concentración de péptido y dilución de suero, la fluorescencia debida al suero positivo es mayor que la fluorescencia correspondiente al suero negativo. Asimismo, para una misma dilución de suero, la fluorescencia debida al tampón es mucho menor que la encontrada para los sueros, principalmente cuando la concentración del péptido es de 1 µg/µl.

Los resultados de fluorescencia obtenidos para las dos concentraciones de péptido se analizaron y compararon estadísticamente mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney¹⁴⁵ (figura 1.7 y tabla 1.1). Al igual que en la técnica de ELISA, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el suero positivo y el suero control negativo para una misma concentración de péptido.

Para una misma dilución de suero, también existen diferencias estadísticamente significativas en la reactividad de los sueros cuando la concentración del péptido era 1 ó 0,5 µg/µl, siendo, como era de esperar, más elevada la señal en el primer caso que en el segundo.

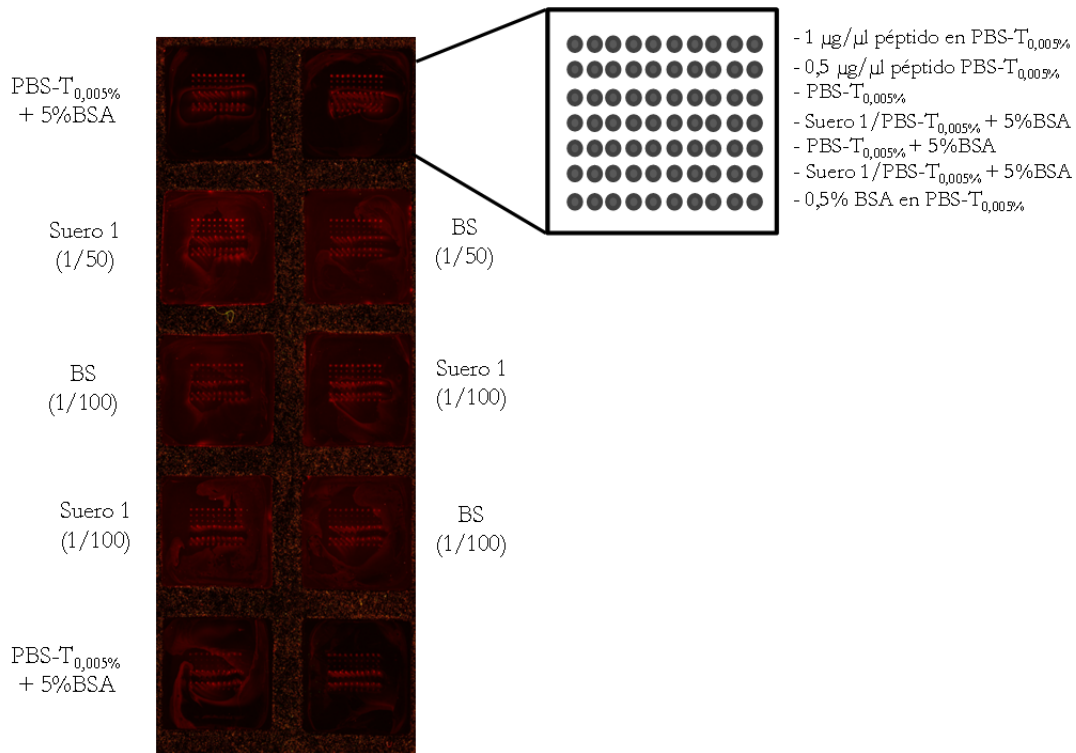


Figura 1.6. Esquema del experimento e imagen obtenida tras escanear el soporte.

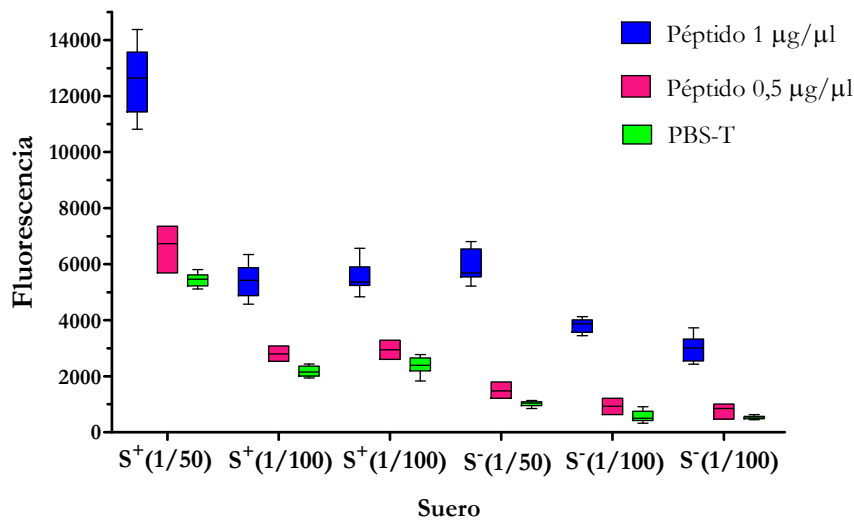
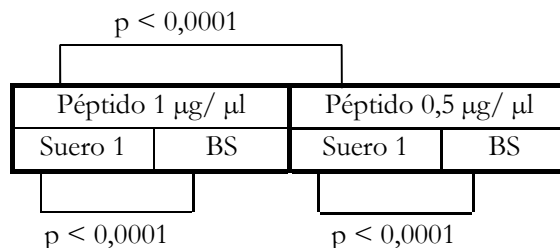


Figura 1.7. Distribución de los datos de fluorescencia para el péptido a concentración 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (azul) y 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (rosa), y del tampón de dilución (verde). La línea horizontal intermedia de las cajas representa la mediana, mientras que los límites inferior y superior de estas cajas son el percentil 25 (P25) y el percentil 75 (P75), respectivamente. Los bigotes corresponden con el valor máximo y mínimo de fluorescencia en cada caso. S⁺(1/50): incubación con suero positivo a dilución 1/50; S⁺(1/100): incubación con suero positivo a dilución 1/100; S⁻(1/50): incubación con suero control negativo a dilución 1/50; S⁻(1/100): incubación con suero control negativo a dilución 1/100.

Tabla 1.1. Valores p calculados a partir de los datos de fluorescencia obtenidos en el experimento usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Suero 1: suero positivo; BS: suero control negativo. Se estableció un intervalo de confianza del 95%, por lo que los valores de $p < 0,05$ indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados.



Por tanto, teniendo en cuenta estos resultados y con el fin de obtener medidas suficientemente elevadas de fluorescencia en los sucesivos experimentos y asimismo reducir el efecto del tampón de dilución, se decidió trabajar a una concentración de péptido de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Esta concentración es la misma que la utilizada en los ensayos de ELISA, pero debe destacarse que la cantidad de péptido utilizado es mucho menor en los experimentos de microarrays, siendo 1,1 nl el volumen necesario por medida de fluorescencia (*spot*) y 1 μl por medida de absorbancia (ELISA).

1.2.3. Efecto de dilución de los sueros

Se diseñó un experimento que combinaba diferentes diluciones tanto de suero positivo como del suero control negativo con el fin de elegir una dilución que permitiera obtener una buena señal de fluorescencia minimizando el volumen de suero empleado.

El ensayo se realizó comparando cinco diluciones de los sueros (1/50, 1/100, 1/200 y 1/500). Aunque la concentración de péptido elegida para trabajar fue de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, como se indica en el apartado anterior, este experimento se llevó a cabo con dos concentraciones de péptido (0,5 y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) con el fin de tener más datos de comparación. Como control negativo, se imprimió e incubó tampón PBS-T_{0,005%}. Se siguió el protocolo indicado en el capítulo de Materiales y métodos (apdo. 6.4). Los resultados se muestran en la figura 1.8.

Como se observa, la fluorescencia tiende a disminuir a medida que aumenta la dilución del suero positivo, mientras que la señal correspondiente al suero control negativo se mantiene prácticamente constante y muy por debajo de la anterior. Analizando los datos mediante el test

de Mann-Whitney, nuevamente se encontraron, en todos los casos, diferencias estadísticamente significativas entre el suero positivo y el control negativo, como cabía esperar. También se compararon estadísticamente los valores de fluorescencia de las distintas diluciones de suero positivo (tabla 1.2), no encontrándose diferencias significativas entre la dilución 1/100 y 1/200 de suero positivo ($p = 0,2000$).

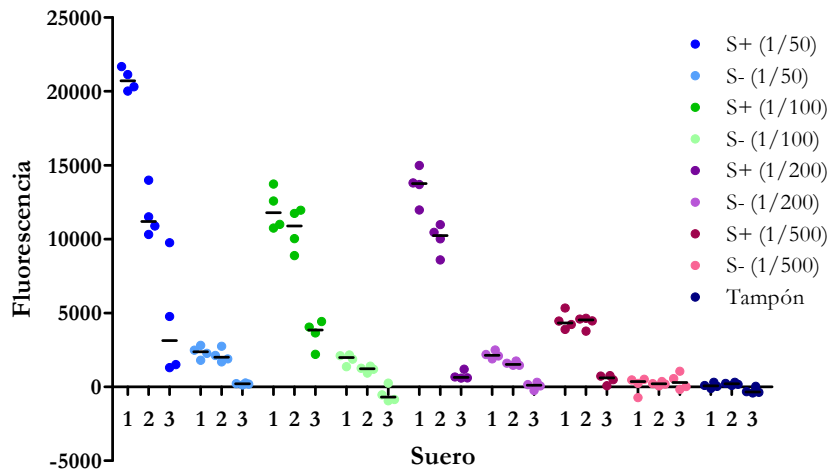
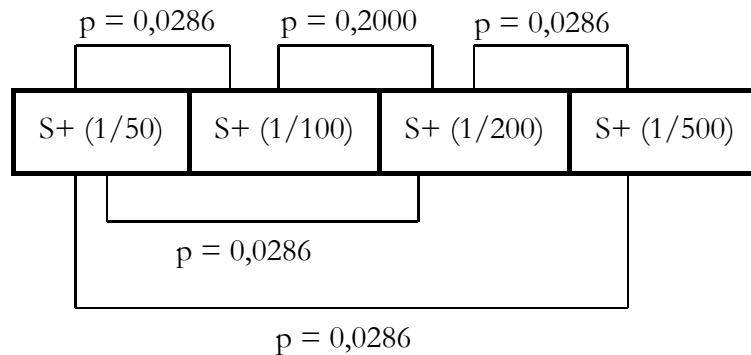


Figura 1.8. Distribución de los datos de fluorescencia para el péptido a concentración $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (1) y $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (2), y para el tampón PBS- $T_{0,005\%}$ impreso (3) a distintas diluciones de suero con presencia de anticuerpos anti-E2 del GBV-C y en ausencia de anticuerpos anti-E2 del GBV-C. La línea horizontal representa la mediana.

Tabla 1.2. Valores p de las comparaciones realizadas con el test de Mann-Whitney calculados a partir de los datos de fluorescencia obtenidos en el experimento para las distintas diluciones de los sueros positivos. Valores de $p < 0,05$ indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados.



Por tanto, considerando estos resultados, se decidió realizar una dilución 1/200 de los sueros en los experimentos posteriores, ya que la señal obtenida en este caso es elevada comparándola con la que se obtiene cuando la dilución es 1/500, y no es significativamente diferente a la hallada cuando se trata de la dilución 1/100.

De esta manera, con la dilución de los sueros 1/200, se ha logrado disminuir de forma significativa la cantidad de suero empleada respecto al ensayo inmunoenzimático de ELISA (dilución 1/50).

1.3. CAPACIDAD DIAGNÓSTICA DE LOS PÉPTIDOS DE LA PROTEÍNA E2 DEL GBV-C EN PACIENTES INFECTADOS POR VIH-1

Como se ha explicado en la introducción de esta tesis, el estudio de la presencia de anticuerpos anti-GBV-C en sueros de pacientes infectados por el VIH-1 es de gran interés, debido a que esta coinfección es bastante frecuente y algunas investigaciones indican que dicha coinfección da lugar a una menor progresión de la enfermedad y una mayor supervivencia de los pacientes una vez que el SIDA se ha desarrollado^{15, 146, 147}.

Se planteó, por tanto, un estudio detallado de la antigenicidad de la proteína de envoltura E2 del GBV-C. De esta manera, se prepararon microarrays con 124 péptidos de esta proteína, compuestos por 18 aminoácidos solapados en 15 residuos, previamente sintetizados en nuestro grupo de laboratorio⁴³ (figura 1.9, tabla 1.3). Los ensayos se realizaron con un panel de 76 sueros de pacientes infectados por el VIH-1 procedentes de la Escuela de Medicina de Hannover (Alemania), de los que se conocía la presencia o ausencia de anticuerpos anti-E2, determinada mediante el test de Abbott¹⁴⁸ (descatalogado actualmente); y un panel de 38 sueros de donantes voluntarios sanos, que se utilizaron como controles negativos.

APASVLGSRPFDYGLTWQSCSCRANGSRYTTGEKVWDRGNVTLLCDCPNGPWVWLPAFCQA
IGWGDPIHWSHGQNRWPLSCPQYVYGSVSVTCVWGSVSWFASTGGRDSKIDVWSLVPVGS
SCTIAALGSSDRDTVVELSEWGVPCATCILDRRPASCGTCVRDCWPETGSRFPFHRCGAGPK
LTKDLEAVPFVNRTTPFTIRGPLGNQGRGNPVRSPGLFGSYAMTKIRDSLHLVKCPTPAIEPPT
GTFGFFPGVPPLNCLLLGTEVSEALGGAGLTGGFYEPLVRRRSELMGRRNPCPGFAWLSS
GRPDGFIHVQGHLEVDAGNFIPPPRWLLDFVFLVLLYLMKLAEARLVPLLLLLWWVWNQL
AVLGLPAVDAVA

Figura 1.9. Secuencia primaria de la proteína E2 del GB virus C.

Tabla 1.3. Secuencias de los péptidos sintéticos pertenecientes a la proteína E2 de GBV-C.

Péptido	Secuencia	Péptido	Secuencia
P1	A P A S V L G S R P F D Y G L T W Q	P63	L T K D L E A V P F V N R T T P F T
P2	S V L G S R P F D Y G L T W Q S C S	P64	D L E A V P F V N R T T P F T I R G
P3	G S R P F D Y G L T W Q S C S C R A	P65	A V P F V N R T T P F T I R G P L G
P4	P F D Y G L T W Q S C S C R A N G S	P66	F V N R T T P F T I R G P L G N Q G
P5	Y G L T W Q S C S C R A N G S R Y T	P67	R T T P F T I R G P L G N Q G R G N
P6	T W Q S C S C R A N G S R Y T T G E	P68	P F T I R G P L G N Q G R G N P V R
P7	S C S C R A N G S R Y T T G E K V W	P69	I R G P L G N Q G R G N P V R S P L
P8	C R A N G S R Y T T G E K V W D R G	P70	P L G N Q G R G N P V R S P L G F G
P9	N G S R Y T T G E K V W D R G N V T	P71	N Q G R G N P V R S P L G F G S Y A
P10	R Y T T G E K V W D R G N V T L L C	P72	R G N P V R S P L G F G S Y A M T K
P11	T G E K V W D R G N V T L L C D C P	P73	P V R S P L G F G S Y A M T K I R D
P12	K V W D R G N V T L L C D C P N G P	P74	S P L G F G S Y A M T K I R D S L H
P13	D R G N V T L L C D C P N G P W V W	P75	G F G S Y A M T K I R D S L H L V K
P14	N V T L L C D C P N G P W V W L P A	P76	S Y A M T K I R D S L H L V K C P T
P15	L L C D C P N G P W V W L P A F C Q	P77	M T K I R D S L H L V K C P T P A I
P16	D C P N G P W V W L P A F C Q A I G	P78	I R D S L H L V K C P T P A I E P P
P17	N G P W V W L P A F C Q A I G W G D	P79	S L H L V K C P T P A I E P P T G T
P18	W V W L P A F C Q A I G W G D P I T	P80	L V K C P T P A I E P P T G T F G F
P19	L P A F C Q A I G W G D P I T H W S	P81	C P T P A I E P P T G T F G F F P G
P20	F C Q A I G W G D P I T H W S H G Q	P82	P A I E P P T G T F G F F P G V P P
P21	A I G W G D P I T H W S H G Q N R W	P83	E P P T G T F G F F P G V P P L N N
P22	W G D P I T H W S H G Q N R W P L S	P84	T G T F G F F P G V P P L N N C L L
P23	P I T H W S H G Q N R W P L S C P Q	P85	F G F F P G V P P L N N C L L L G T
P24	H W S H G Q N R W P L S C P Q Y V Y	P86	F P G V P P L N N C L L L G T E V S
P25	H G Q N R W P L S C P Q Y V Y G S V	P87	V P P L N N C L L L G T E V S E A L
P26	N R W P L S C P Q Y V Y G S V S V T	P88	L N N C L L L G T E V S E A L G G A
P27	P L S C P Q Y V Y G S V S V T C V W	P89	C L L L G T E V S E A L G G A G L T
P28	C P Q Y V Y G S V S V T C V W G S V	P90	L G T E V S E A L G G A G L T G G F
P29	Y V Y G S V S V T C V W G S V S W F	P91	E V S E A L G G A G L T G G F Y E P
P30	G S V S V T C V W G S V S W F A S T	P92	E A L G G A G L T G G F Y E P L V R
P31	S V T C V W G S V S W F A S T G G R	P93	G G A G L T G G F Y E P L V R R R S
P32	C V W G S V S W F A S T G G R D S K	P94	G L T G G F Y E P L V R R R S E L M
P33	G S V S W F A S T G G R D S K I D V	P95	G G F Y E P L V R R R S E L M G R R
P34	S W F A S T G G R D S K I D V W S L	P96	Y E P L V R R R S E L M G R R N P V
P35	A S T G G R D S K I D V W S L V P V	P97	L V R R R S E L M G R R N P V C P G
P36	G G R D S K I D V W S L V P V G S A	P98	R R S E L M G R R N P V C P G F A W
P37	D S K I D V W S L V P V G S A S C T	P99	E L M G R R N P V C P G F A W L S S
P38	I D V W S L V P V G S A S C T I A A	P100	G R R N P V C P G F A W L S S G R P
P39	W S L V P V G S A S C T I A A L G S	P101	N P V C P G F A W L S S G R P D G F
P40	V P V G S A S C T I A A L G S S D R	P102	C P G F A W L S S G R P D G F I H V
P41	G S A S C T I A A L G S S D R D T V	P103	F A W L S S G R P D G F I H V Q G H
P42	S C T I A A L G S S D R D T V V E L	P104	L S S G R P D G F I H V Q G H L Q E
P43	I A A L G S S D R D T V V E L S E W	P105	G R P D G F I H V Q G H L Q E V D A
P44	L G S S D R D T V V E L S E W G V P	P106	D G F I H V Q G H L Q E V D A G N F
P45	S D R D T V V E L S E W G V P C A T	P107	I H V Q G H L Q E V D A G N F I P P
P46	D T V V E L S E W G V P C A T C I L	P108	Q G H L Q E V D A G N F I P P P R W
P47	V E L S E W G V P C A T C I L D R R	P109	L Q E V D A G N F I P P P R W L L L
P48	S E W G V P C A T C I L D R R P A S	P110	V D A G N F I P P P R W L L L D F V
P49	G V P C A T C I L D R R P A S C G T	P111	G N F I P P P R W L L L D F V F V L
P50	C A T C I L D R R P A S C G T C V R	P112	I P P P R W L L L D F V F V L L Y L
P51	C I L D R R P A S C G T C V R D C W	P113	P R W L L L D F V F V L L Y L M K L
P52	D R R P A S C G T C V R D C W P E T	P114	L L L D F V F V L L Y L M K L A E A
P53	P A S C G T C V R D C W P E T G S V	P115	D F V F V L L Y L M K L A E A R L V
P54	C G T C V R D C W P E T G S V R F P	P116	F V L L Y L M K L A E A R L V P L I
P55	C V R D C W P E T G S V R F P F H R	P117	L Y L M K L A E A R L V P L I L L L
P56	D C W P E T G S V R F P F H R C G A	P118	M K L A E A R L V P L I L L L L W W
P57	P E T G S V R F P F H R C G A G P K	P119	A E A R L V P L I L L L L W W V N
P58	G S V R F P F H R C G A G P K L T K	P120	R L V P L I L L L L W W V N Q L A
P59	R F P F H R C G A G P K L T K D L E	P121	P L I L L L L W W V N Q L A V L G
P60	F H R C G A G P K L T K D L E A V P	P122	L L L L W W V N Q L A V L G L P A
P61	C G A G P K L T K D L E A V P F V N	P123	L W W W V N Q L A V L G L P A V D A
P62	G P K L T K D L E A V P F V N R T T	P124	W V N Q L A V L G L P A V D A A V A

1.3.1. Barrido de la proteína E2 del GBV-C. Primera selección de péptidos

Se estudió la reactividad serológica de la proteína E2 del GBV-C imprimiendo los 124 péptidos en diversos *slides*, que se incubaron con ocho sueros de pacientes infectados por el VIH-1, los cuales tenían anticuerpos anti-E2 del GBV-C (VIH E2+), ocho sueros de pacientes infectados por el VIH-1 que no presentaban anticuerpos anti-E2 del GBV-C (VIH E2-), y cuatro sueros procedentes de donantes voluntarios sanos (BS), como control negativo; todos ellos seleccionados al azar. Los péptidos se imprimieron por triplicado y, como control negativo, se imprimieron dos péptidos previamente sintetizados y caracterizados en el grupo¹⁴⁵, no relacionados con ninguna proteína del GBV-C. Se representaron los resultados de fluorescencia de cada péptido como la mediana de la fluorescencia de cada triplicado, obtenida con los sueros del grupo VIH E2+ (figura 1.10). Se identificaron tres zonas de la proteína potencialmente antigénicas (tabla 1.4) situadas dos de ellas en el extremo N-terminal de la misma.

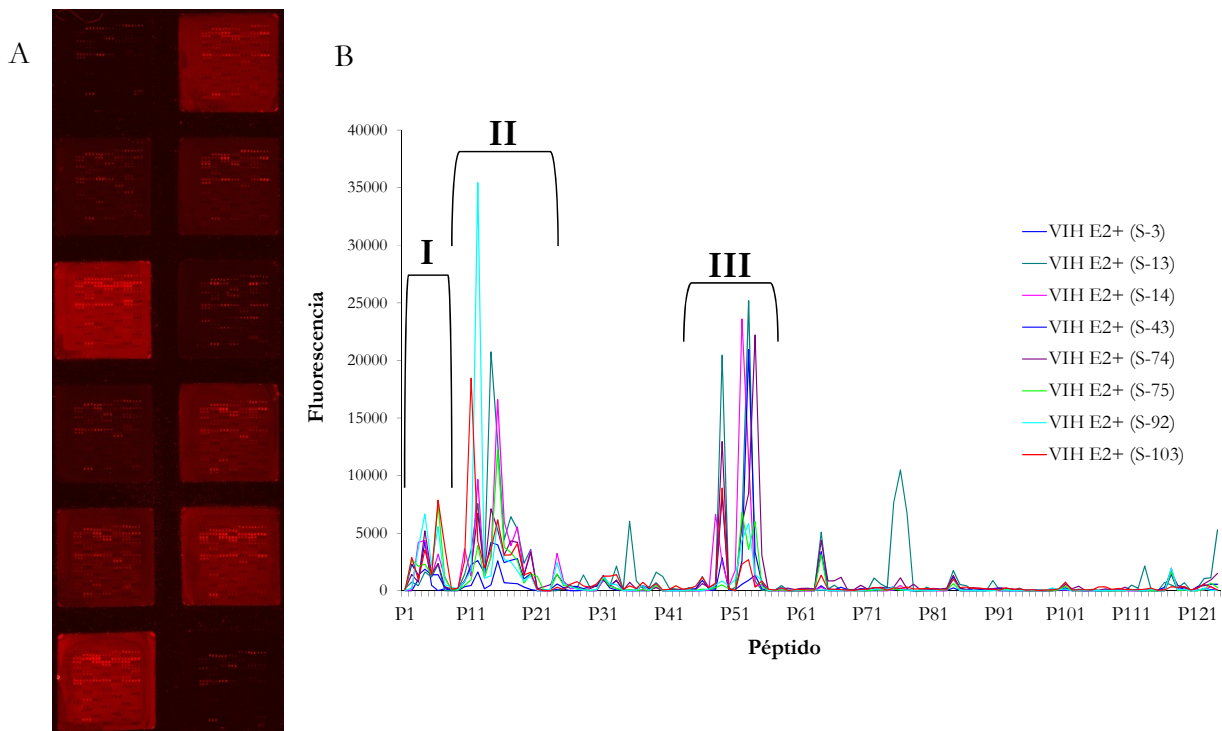


Figura 1.10. A) Imagen de unos de los soportes sólidos tras escanear; B) datos de fluorescencia de los 124 péptidos de la proteína E2 del GBV-C con los 8 sueros de pacientes infectados por VIH-1 con anticuerpos anti-E2 del GBV-C determinado mediante el test de Abbott .

Tabla 1.4. Zonas antigénicas de la proteína E2 del GBV-C.

Zona	Péptidos	Aminoácidos
I	P1-P9	1-42
II	P10-P27	28-96
III	P45-P55	133-180

Se hicieron dos grupos de comparación. Por un lado, el grupo formado por los péptidos de las tres zonas (38 péptidos); y por otro lado el conjunto de péptidos no seleccionados (86 péptidos). Se calculó la mediana, el percentil 25 (P25), el percentil 75 (P75) y el rango intercuartílico (tabla 1.5) para cada grupo y tipo de suero, y se representaron los valores de las medidas de fluorescencia (figura 1.11). Para los tres tipos de sueros ensayados, se compararon las distribuciones de los 38 péptidos de las tres zonas identificadas (figura 1.11-A) con la de los 86 péptidos no seleccionados (figura 1.11-B) con el software GraphPad Prism 5.01¹⁴⁹. Las cajas en la figura representan dónde se encuentran el 50% de los datos, la línea horizontal indica la mediana y los bigotes los valores máximo y mínimo. Para poder visualizar la parte central de las distribuciones, se ha cortado la escala del eje de unidades de fluorescencia.

Teniendo en cuenta tanto los valores de la tabla como la representación, se observa que la fluorescencia correspondiente al conjunto de péptidos de las tres zonas seleccionadas es más elevada que la del resto de péptidos; siendo mayor en los sueros del grupo VIH E2+ que en los sueros del grupo VIH E2- y en sueros de donantes voluntarios sanos. Además, tras comparar los datos mediante el test de Mann-Whitney (tabla 1.6), se encontró que se trataba de diferencias estadísticamente significativas, como cabía esperar.

Tabla 1.5. Comparación de los péptidos de las tres zonas (38 péptidos) y de los péptidos no seleccionados (86 péptidos). *n*, número de medidas; P25, percentil 25; P75, percentil 75; R.I., rango intercuartílico.

Péptidos	Suero	n	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo	R.I.
Zonas (I, II, III)	VIH E2 +	912	-1046	156	812	2732	36670	2575
	VIH E2 -	912	-909	151	490	1671	39632	1520
	BS	456	-1481	22	102	336	5278	314
No seleccionados	VIH E2 +	2064	-1023	-1	52	200	10913	201
	VIH E2 -	2064	-1471	5	64	223	24072	218
	BS	1032	-316	5	16	88	9496	83

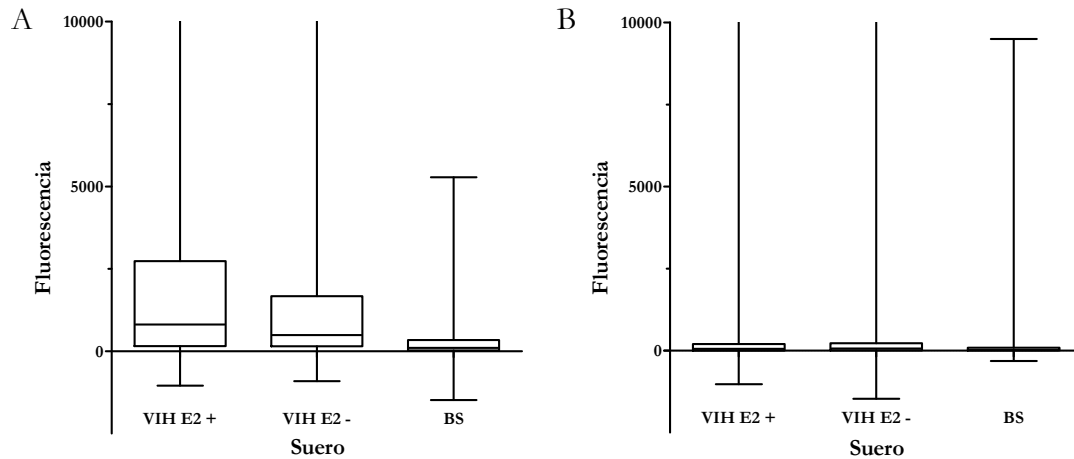
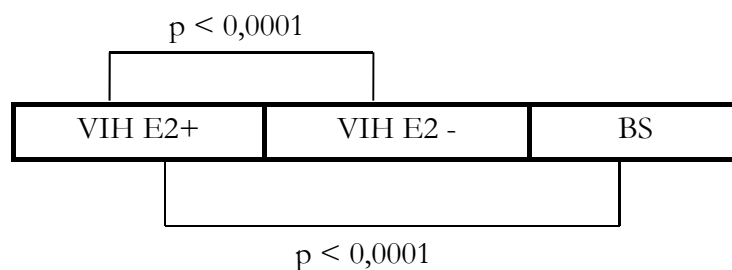


Figura 1.11. Distribución de los datos de fluorescencia obtenidos con los paneles de sueros estudiados para el conjunto de péptidos de las 3 zonas (A) y el conjunto de péptidos no seleccionados (B). VIH E2+: sueros de pacientes infectados por el VIH-1 con anticuerpos anti-E2 del GBV-C; VIH E2-: sueros de pacientes infectados por el VIH-1 sin anticuerpos anti-E2 del GBV-C; BS: sueros de donantes voluntarios sanos. La línea horizontal representa la mediana, la altura de las cajas el rango intercuartílico y los bigotes el valor máximo y mínimo. Escala de unidades de fluorescencia de -2.500 a 10.000 unidades para visualizar la parte central de la distribución.

Tabla 1.6. Valores de p calculados a partir de los datos de fluorescencia obtenidos para el conjunto de péptidos de las tres zonas al comparar los 3 tipos de sueros con el test de Mann-Whitney. Se estableció un intervalo de confianza del 95%, valores $p < 0,05$ indican diferencias significativas entre los grupos comparados. VIH E2+: sueros de pacientes infectados por VIH-1 con anticuerpos anti-E2 del GBV-C; VIH E2-: sueros de pacientes infectados por VIH-1 sin anticuerpos anti-E2 del GBV-C; BS: sueros de voluntarios sanos.



Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los sueros de pacientes infectados por el VIH-1 con anticuerpos anti-E2 del GBV-C y sin anticuerpos anti-E2 del GBV-C; y entre los sueros del grupo VIH E2+ y los sueros control negativo, procedentes de personas sanas.

De esta manera, puede decirse que el conjunto de los 38 péptidos que constituyen las 3 zonas identificadas es capaz de discriminar entre los diferentes tipos de sueros estudiados, encontrando una mayor reactividad con los sueros de pacientes coinfectados por el GBV-C y el VIH-1, respecto a los pacientes no coinfectados y las personas sanas.

En la figura 1.12 se muestran, a modo de ejemplo, imágenes escaneadas de diferentes *subarrays* incubados con sueros procedentes de bancos de sangre y sueros de pacientes infectados por el VIH-1, con y sin anticuerpos anti-E2 del GBV-C.

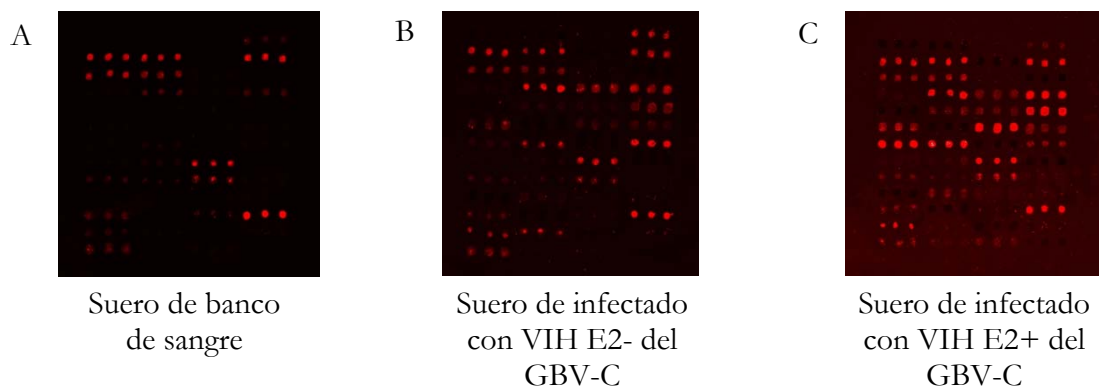


Figura 1.12. Ejemplo de pocillos incubados con sueros de banco de sangre (A), sueros de persona infectada por VIH-1 y que no presenta anticuerpos anti-E2 del GBV-C (B), y sueros de persona infectada por VIH-1 que presenta anticuerpos anti-E2 del GBV-C (C).

Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó un total de 38 péptidos de los 124 iniciales (31%), correspondientes a las zonas I (P1-P9), II (P10-P27) y III (P45-P55), y se estudiaron con un mayor número de sueros de pacientes infectados por el VIH-1 (30 VIH E2+ y 30 VIH E2-) y 34 sueros procedentes del banco de sangre.

1.3.2. Comparación de paneles de sueros. Segunda selección de péptidos

Se llevó a cabo un estudio del comportamiento de las secuencias peptídicas seleccionadas con la totalidad de los sueros de los tres paneles anteriormente mencionados (VIH E2+/E2-, BS y VIH-1 no caracterizados respecto a la presencia o ausencia de anticuerpos anti-E2 del GBV-C) y un estudio de fiabilidad de los ensayos. Todo ello en colaboración con la estadística María José Bleda Hernández, del Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC-CSIC).

El análisis estadístico de los resultados de fluorescencia obtenidos se realizó con el software Stata 12.1¹⁵⁰. Se crearon dos bases de datos incluyendo los resultados obtenidos para los 38 péptidos seleccionados en el apartado 1.3.1. La primera, con el panel de sueros de donantes voluntarios, formada por un total de 38 sueros procedentes de personas sanas; y la segunda base de datos con el panel de sueros de pacientes infectados por el VIH-1, de los que se conocía la presencia o ausencia de anticuerpos anti-E2 del GBV-C, constituida por 38 sueros del grupo VIH E2+ y 38 sueros del grupo VIH E2-.

Para cada suero, se trabajó con los valores de fluorescencia triplicados, medidos en cada péptido, más los triplicados de los dos péptidos considerados como control negativo. De este modo, el número total de mediciones realizadas fue de 13.680:

- Base de datos de donantes voluntarios.
38 sueros x 40 péptidos x 3 triplicados = 4.560 mediciones.
- Base de datos del panel de infectados por VIH-1 (E2- y E2+).
76 sueros x 40 péptidos x 3 triplicados = 9.120 mediciones

En la figura 1.13 y en la tabla 1.7, se recogen los resultados de fluorescencia obtenidos. La tabla muestra las medianas de cada péptido junto con su rango intercuartílico, que refleja la variabilidad de dichos datos, mostrando dónde se sitúa el 50% de los valores obtenidos. En la gráfica se representa la distribución de dichos valores, indicándose la mediana de las medidas de fluorescencia (línea horizontal) obtenidas para cada péptido con los distintos paneles de sueros y su rango intercuartílico correspondiente (Percentil 75-Percentil 25). Los valores extremos se eliminaron de la gráfica para simplificar la representación.

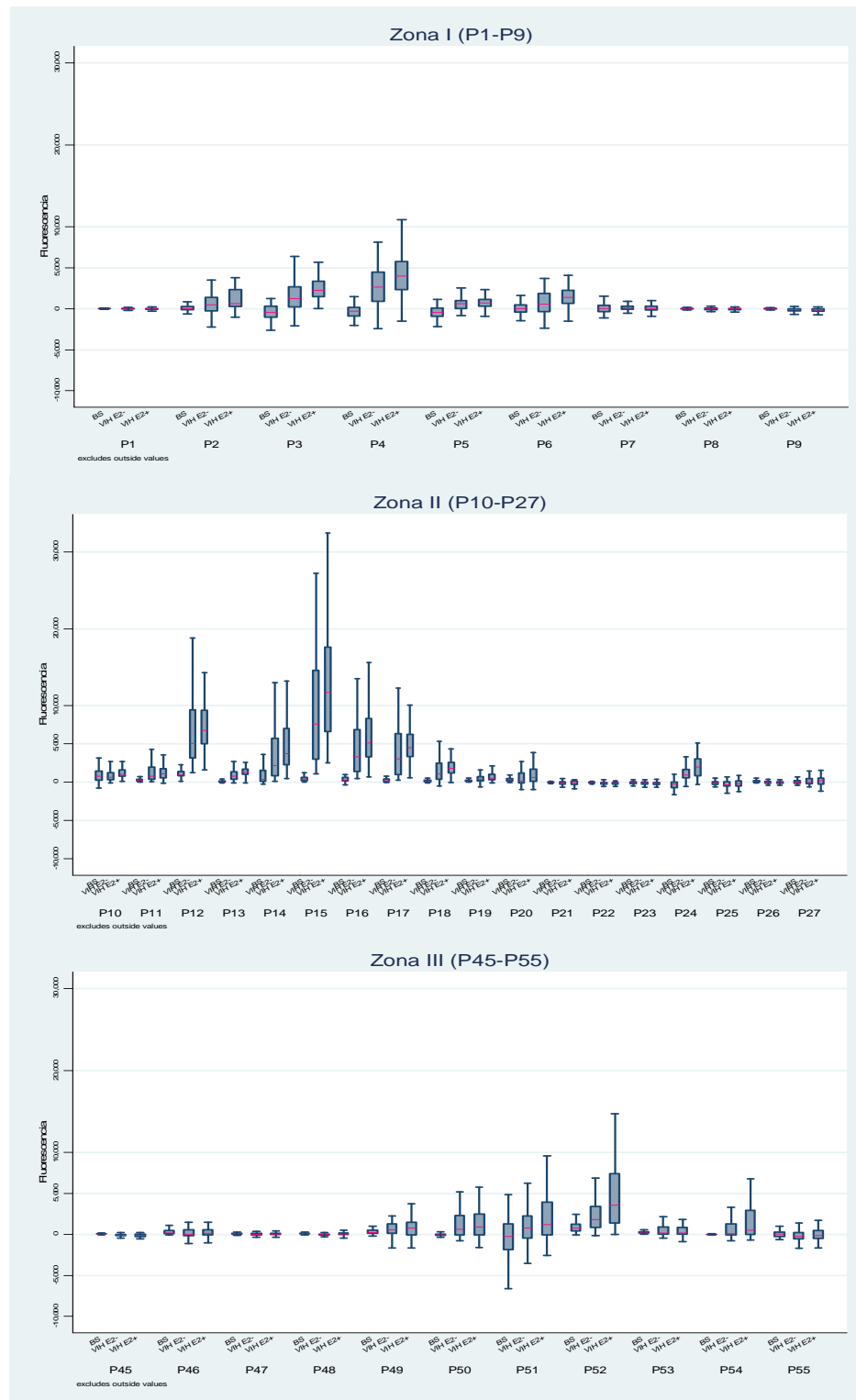


Figura 1.13. Distribución de las mediciones de fluorescencia para las 3 zonas potencialmente antigénicas, diferenciando entre panel de sueros de donantes voluntarios sanos (BS), y los grupos de sueros VIH E2- y VIH E2+ del panel de sueros de pacientes infectados por el VIH-1. La línea horizontal (rojo) representa la mediana, y la altura de las cajas el rango intercuartílico A) Zona I: P1-P9; B) Zona II: P10-P27; C) Zona III: P45-P55.

Tabla 1.7. Medidas de fluorescencia del ensayo de barrido de la proteína E2 del GBV-C. Mediana y rango intercuartílico (R.I.) de cada péptido para los valores de fluorescencia correspondientes al panel de sueros de donantes voluntarios (BS) y al panel de sueros de pacientes infectados por el VIH-1.

	Péptido	Sueros					
		BS		VIH E2-		VIH E2+	
		Mediana	R.I.	Mediana	R.I.	Mediana	R.I.
Zona I	P1	1	39	-14	98	-20	144
	P2	15	445	478	1622	620	2136
	P3	-427	1336	1263	2496	2272	1889
	P4	-317	1093	2644	3570	4002	3449
	P5	-425	1041	593	1046	704	876
	P6	12	855	553	2185	1376	1644
	P7	37	755	124	412	55	530
	P8	-11	90	-7	205	1	193
	P9	-4	80	-117	269	-140	291
Zona II	P10	773	1153	640	972	1021	859
	P11	250	246	804	1581	1066	1230
	P12	912	650	5029	6297	6726	4415
	P13	81	167	800	986	1295	738
	P14	391	1463	2159	4965	3723	4720
	P15	413	417	7587	11636	11692	11080
	P16	263	458	3280	5490	5094	5026
	P17	159	316	3022	5394	4499	2929
	P18	133	194	1104	2126	1810	1411
	P19	159	184	351	591	535	712
	P20	296	330	124	1301	629	1584
	P21	-3	88	-135	305	-62	475
	P22	-49	110	-135	234	-118	211
	P23	-92	221	-100	280	-151	286
	P24	-255	795	933	1122	1951	2263
P25	-86	366	-353	634	-218	724	
P26	86	210	-20	221	-35	190	
P27	13	327	48	669	215	766	
Zona III	P45	47	68	-95	181	-89	202
	P46	203	436	16	870	204	811
	P47	67	119	-23	190	7	187
	P48	71	107	-15	146	26	247
	P49	246	422	1004	1210	1181	1542
	P50	-59	199	1780	2620	2071	1996
	P51	-248	3187	455	2659	1113	3916
	P52	763	859	1354	2371	2452	3664
	P53	191	186	119	1112	144	2223
	P54	-25	46	350	3548	1271	4197
	P55	45	510	-303	800	-148	928
Controles	C1	59	77	-79	355	-58	388
	C2	27	186	-5	132	-17	108

Como se observa en la figura 1.13 y en la tabla 1.7, en algunos péptidos, la intensidad de fluorescencia de los sueros procedentes de personas sanas es más baja que la del grupo de sueros VIH E2- y ésta a su vez es menor que la del grupo de sueros VIH E2+. Estas diferencias varían en función del péptido en cuestión, observándose muy bien, por ejemplo, en los péptidos P3 y P15; y no siendo así en otros, como el péptido P1 o el P27.

Por otro lado, la fluorescencia de los péptidos elegidos como control negativo C1 y C2 es bastante baja, encontrando un valor de la mediana inferior a 100 unidades en ambos casos.

Por tanto, considerando estos datos, puede decirse que algunos de los péptidos parecen reconocer de forma específica anticuerpos en sueros de pacientes infectados por el VIH-1 y que fueron positivos para la proteína E2 del GBV-C, cuando se probaron con el test de Abbott.

El estudio de estos resultados permitió una nueva selección de péptidos. Sin embargo, antes de realizar las comparaciones entre paneles de sueros era necesario conocer cuán reproducibles eran. Con esta finalidad, se decidió estudiar la fiabilidad de los ensayos. Así, se repitió el experimento con 16 sueros del grupo de VIH E2+ y 16 sueros del VIH E2-, escogidos al azar por muestreo aleatorio simple. Además, se analizaron 4 sueros del primer grupo y otros 2 del segundo, debido a que sus mediciones (triplicados) en el ensayo anteriormente realizado presentaban gran variabilidad.

El estudio de fiabilidad llevado a cabo se detalla en el apartado A.1 del Anexo. Se analizó si los valores de la primera medición eran o no significativamente diferentes a los de la segunda medición para cada uno de los 38 péptidos principales de estudio y para los 2 péptidos utilizados como control negativo. Por otro lado, se estudió cómo era la variabilidad entre los triplicados de la primera y la segunda medición para un mismo suero, así como la variabilidad total teniendo en cuenta todas las mediciones.

Los resultados del estudio de fiabilidad mostraron una repetibilidad aceptable en aproximadamente dos terceras partes de los péptidos. Dado que en el grupo de péptidos cuya repetibilidad no era aceptable se observó una gran variabilidad entre los triplicados de la primera y la segunda medición (tabla A.1 y figura A.2 del Anexo), se decidió ser conservador y utilizar toda la información disponible para, a continuación, realizar las comparaciones entre todos los paneles de sueros. De esta manera, se tenía en cuenta, para todos los péptidos, la variabilidad encontrada en la fluorescencia al repetir sus mediciones. Así, en los sueros con los que se llevó a

cabo el estudio de fiabilidad, se utilizaron las 6 medidas correspondientes a los dos triplicados; y en los sueros en los que no se realizó dicho estudio se emplearon las 3 medidas correspondientes a su único triplicado.

El análisis estadístico de la comparación de los paneles de sueros se llevó a cabo tal y como se detalla en el apartado A.2 del Anexo. Se representaron las distribuciones de fluorescencia teniendo en cuenta toda esta información, las cuales fueron utilizadas para los sucesivos análisis (figura 1.14).

Finalmente, se seleccionaron los péptidos en los que la distribución de los datos de fluorescencia en el panel de pacientes infectados por el VIH-1 era significativamente mayor que la distribución de los datos del panel de donantes voluntarios sanos. De esta selección, se eligieron aquéllos en los que la distribución de los valores de fluorescencia en el grupo VIH E2+ era mayor y significativamente diferente de la distribución del grupo VIH E2- (p -valor menor que $\alpha_{\text{corregido}}$, Anexo, tabla A.8). Es decir, se escogieron aquellos péptidos que mostraron una reactividad significativa para los sueros de pacientes infectados por el VIH-1 con presencia de anticuerpos anti-E2 del GBV-C, y una baja reactividad en el caso de los sueros de pacientes infectados por el VIH-1 sin anticuerpos anti-E2 del GBV-C y frente a los sueros de donantes voluntarios sanos. Por tanto, de los 38 péptidos se eligieron 20, lo que corresponde con el 53%:

- Zona I: péptidos P3, P4, P5, P6.
- Zona II: péptidos P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P24, P25.
- Zona III: péptidos P51, P52, P54.

Además, se estableció como criterio el que la mediana de la intensidad de fluorescencia en el grupo de sueros de VIH E2+ debía ser, como mínimo, de 1.000 unidades. Así, observando la tabla 1.7, de estos 20, se eliminaron otros 2 péptidos, el P5 y el P25, que no cumplían este requisito. El péptido P54 era otro posible candidato a ser eliminado, dado su valor de la mediana (536 unidades), pero debido a su alto valor de rango intercuartílico y percentil 75 (2.945 y 2.902 unidades, respectivamente) se mantuvo seleccionado. El péptido P11 también es un caso particular ya que, aun cumpliendo el criterio, no fue seleccionado. Su mediana está ligeramente por encima de 1.000 unidades, pero comparando sus datos de fluorescencia para el grupo VIH E2- y para el grupo VIH E2+, los percentiles 75 eran prácticamente iguales (1.764 para el grupo VIH E2+ y 1.749 para el grupo VIH E2-), es decir, que el 75% de los datos en ambos grupos de

sueros se encontraban por debajo de este valor. Dada la variabilidad de los ensayos, se consideró que este péptido no sería buen candidato para el posterior estudio de antigenicidad en sueros de pacientes infectados por el VIH-1.

Por tanto, finalmente, se seleccionaron 17 de los 38 péptidos correspondientes a las tres zonas potencialmente antigénicas.

A continuación se detalla la clasificación de los péptidos escogidos de cada una de las 3 zonas:

- Zona I: péptidos P3, P4, P6; 33% de los péptidos de esta zona.
- Zona II: péptidos P10, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P24; 61% de los péptidos de dicha zona.
- Zona III: péptidos P51, P52, P54; 27% de esta zona.

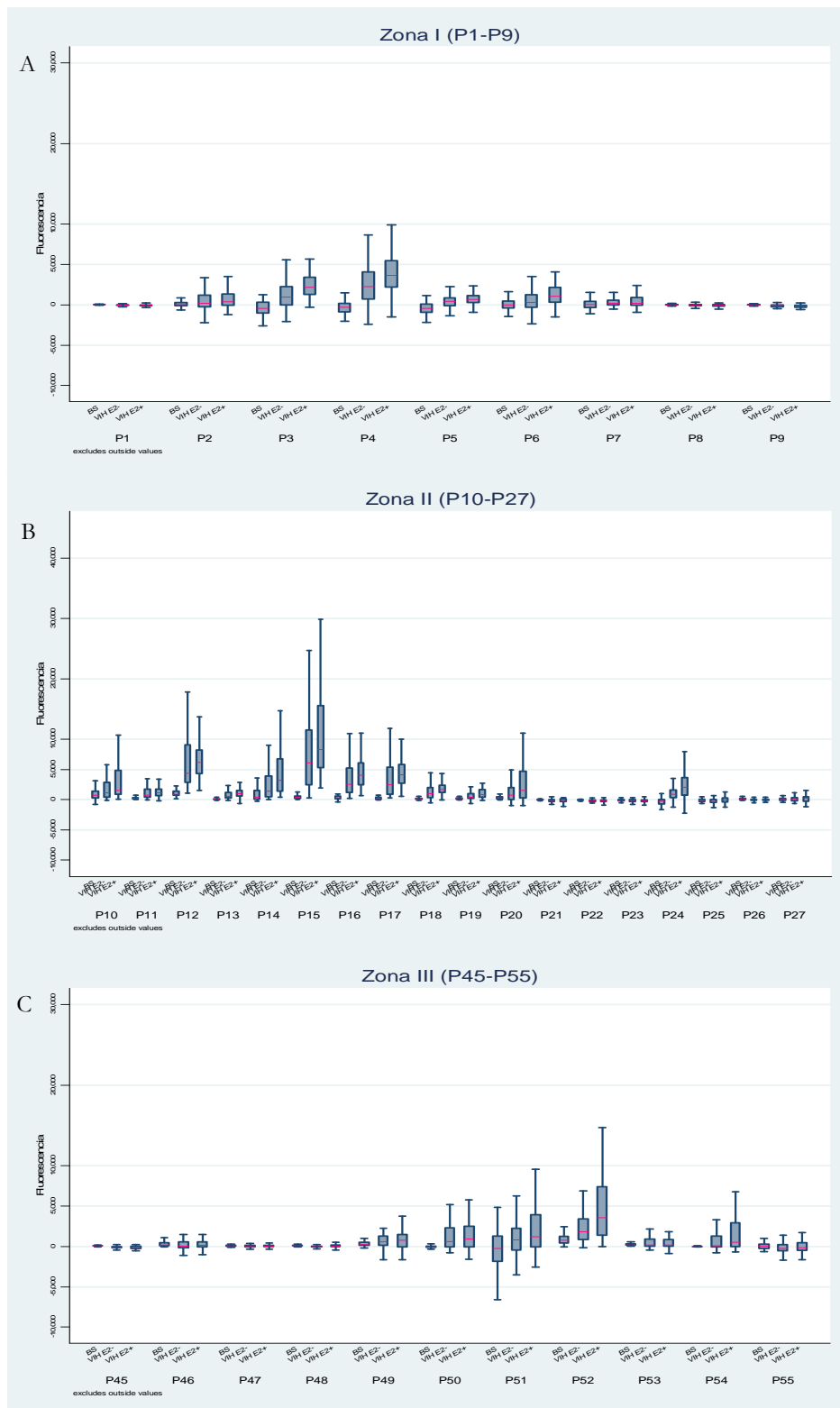


Figura 1.14. Distribución de los valores de fluorescencia uniendo el primer y segundo triplicado. La línea horizontal (roja) corresponde con la mediana de fluorescencia y la altura de las cajas con el rango intercuartílico (percentil 75-percentil 25). Los valores extremos se han excluido. A) Zona I: P1-P9; B) Zona II: P10-P27; C) Zona III: P45-P55.

1.3.3. Capacidad diagnóstica de los péptidos seleccionados. Tercera selección

El objetivo de cualquier prueba diagnóstica es determinar la presencia o ausencia de un evento patológico concreto, como una infección o cualquier otra enfermedad. Así, antes de dar por válidos los resultados, debe conocerse previamente la capacidad diagnóstica de dicha prueba, es decir, su precisión y exactitud.

Se define exactitud como la capacidad de clasificar correctamente a los individuos, de discriminar correctamente entre enfermos y no enfermos¹⁵¹. La exactitud se evalúa en función de dos características: la sensibilidad y la especificidad. La sensibilidad se define como la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo cuyo estado real es positivo respecto a la condición que estudia la prueba (infectado, enfermo, etc.). Por otro lado, la especificidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo cuyo estado real sea el definido como negativo¹⁵² (no infectado, no enfermo, etc.).

Para el cálculo de ambos parámetros, cuando el resultado de la prueba diagnóstica es un indicador cuantitativo (un valor numérico continuo), será necesario establecer un punto de corte por debajo del cual se considerará que la prueba diagnóstica proporciona un resultado negativo, y por encima del cual, se considerará que la prueba diagnóstica establece un resultado positivo (tabla 1.8)

Tabla 1.8. Cálculo de la sensibilidad y la especificidad en una prueba diagnóstica.

RESULTADO DE LA PRUEBA DIAGNÓSTICA	DIAGNÓSTICO VERDADERO		Total
	Enfermos	No enfermos	
Resultado + (≥ Punto de corte)	Verdaderos Positivos (VP)	Falsos Positivos (FP)	VP + FP
Resultado - (< Punto de corte)	Falsos Negativos (FN)	Verdaderos Negativos (VN)	FN + VN
Total	VP + FN	FP + VN	VP + FP + FN + VN

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{FP + VN}$$

$$1 - \text{Sensibilidad} = \frac{FN}{VP + FN}$$

$$1 - \text{Especificidad} = \frac{FP}{FP + VN}$$

La sensibilidad y la especificidad están relacionadas y dependen a su vez de un punto de corte o umbral que se establezca a partir del indicador cuantitativo. Si el punto de corte escogido tiene un valor muy bajo, se obtendrá una alta sensibilidad pero una baja especificidad. Si, por el contrario, se establece un punto de corte con un valor muy alto, la especificidad de la prueba será alta pero su sensibilidad será baja^{153, 154}.

La curva de rendimiento diagnóstico (ROC) se obtiene al representar gráficamente la sensibilidad frente a 1-especificidad (falsos positivos). Para cada punto de corte posible, se calcula la especificidad y la sensibilidad asociadas. Se representan tantos puntos como posibles puntos de corte hayan y se traza una línea continua que los une. En la figura 1.15 se representa un ejemplo.

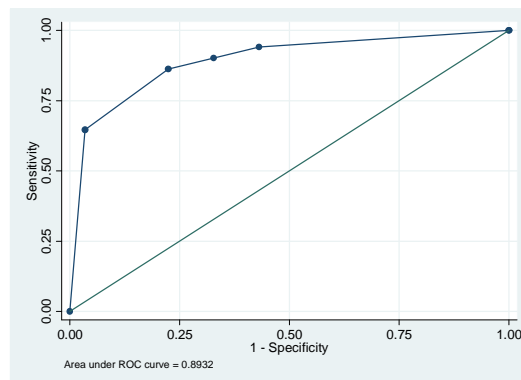


Figura 1.15. Ejemplo de curva de rendimiento diagnóstico.

La curva ROC resulta muy útil en la elección de una técnica diagnóstica entre varias en competencia. También permite estimar la probabilidad de diferentes resultados en la tabla de toma de decisiones, permitiendo aislar causas de error en sistemas diagnósticos. Este método permite establecer razonadamente reglas o mecanismos óptimos de toma de decisión dentro de un sistema de diagnóstico¹⁵⁵.

El área bajo la curva ROC (AUC) es una medida global de la exactitud de una prueba diagnóstica. Se define como probabilidad de clasificar correctamente un par de individuos, no enfermo y enfermo seleccionados al azar, mediante los resultados obtenidos al aplicarles la prueba diagnóstica¹⁵⁶. Por ejemplo, un AUC de 0,75 indica que un individuo seleccionado al azar del grupo de enfermos tendrá el 75% de las veces un valor en la prueba diagnóstica mayor que un individuo seleccionado al azar de entre el grupo de no enfermos.

Por convenio, el valor del AUC toma valores entre 0,5 y 1. Cuanto mayor es su valor, mayor es la capacidad discriminadora de la prueba diagnóstica. Cuando la prueba diagnóstica no discrimina, esta área tendrá el valor de 0,5 y la curva coincidirá con una línea recta diagonal de pendiente igual a la unidad. Por otro lado, en una prueba diagnóstica perfecta, es decir, cuando discrimina perfectamente, el AUC será igual a la unidad. Así, se considerará una prueba diagnóstica muy exacta cuando los valores de AUC sean mayores que 0,9; y pruebas moderadamente exactas, aquéllas en las que el área bajo la curva se encuentra entre 0,7 y 0,9¹⁵⁷. Además, si el intervalo de confianza no incluye el valor de 0,5, la prueba será capaz de discernir entre enfermos y no enfermos.

La comparación del área bajo la curva ROC de diferentes pruebas diagnósticas puede ayudar a seleccionar la prueba más exacta. Cuanto mayor sea el AUC, mejor discrimina esta prueba frente a las demás, siempre que las diferencias entre las áreas sean estadísticamente significativas. Habitualmente, la finalidad principal del estudio de las curvas ROC es comparar nuevas pruebas diagnósticas con una de referencia y así poder analizar si con la nueva prueba se mejora la precisión diagnóstica de la prueba de referencia. Para ello, se utilizan como controles negativos las muestras que hayan sido negativas para esta prueba de referencia; y como muestras problema, las muestras que fueron positivas.

Debido a que no se dispone de ninguna prueba de referencia para el diagnóstico de la infección por el GBV-C ya que no existe en el mercado ningún ensayo que permita realizar un serodiagnóstico, para construir las curvas ROC, los controles negativos empleados fueron los sueros procedentes de donantes voluntarios sanos. Éstos forman parte del grupo poblacional con un menor riesgo de haber estado en contacto con el virus y, por tanto, de haber pasado la infección. Así, en estos sueros será muy baja la probabilidad de que haya anticuerpos anti-GBV-C.

A partir de los valores de fluorescencia obtenidos en los ensayos de microarrays, se representaron las curvas ROC para cada uno de los 17 péptidos seleccionados en el apartado anterior (apdo. 1.3.2) empleando como controles positivos los 38 sueros del panel de pacientes infectados por el VIH-1 que contenían anticuerpos anti-E2 del GBV-C (VIH E2+), y como controles negativos los 38 sueros procedentes de donantes voluntarios sanos (figura 1.16).

El cálculo de la curva ROC se realizó mediante un método no paramétrico que no asume ninguna distribución subyacente de los datos. Como el valor de la fluorescencia era un indicador cuantitativo (un valor numérico continuo), para el cálculo de la sensibilidad y de la especificidad fue necesario establecer puntos de corte por debajo de los cuales se consideró que un suero pertenecía al grupo de donantes voluntarios sanos (la prueba diagnóstica proporciona un resultado negativo), y por encima de los cuales, se consideró que un suero pertenecía al grupo de VIH E2+ (la prueba diagnóstica establece un resultado positivo).

La tabla 1.9 se creó para calcular la sensibilidad y la especificidad con cada uno de los puntos de corte de cada péptido, necesarias para estimar la curva ROC, así como para calcular el porcentaje de sueros correctamente clasificados.

Tras calcular todos los valores de sensibilidad/especificidad de cada péptido, se representaron las curvas ROC (figura 1.16) y se calculó el área bajo dichas curvas. Se fijó un valor de especificidad del 94,74%, y para éste, se escogió el punto de corte o *cut-off* con la máxima sensibilidad (tabla 1.10). Se eligió un valor de especificidad tan elevado con el objetivo de seleccionar péptidos que fueran capaces, con una elevada probabilidad, de clasificar correctamente a un suero que pertenezca realmente al grupo de voluntarios sanos, y evitar así los falsos positivos.

Tabla 1.9. Cálculo de especificidad y sensibilidad para la prueba diagnóstica, y del porcentaje de sueros correctamente clasificados.

RESULTADO DE LA PRUEBA DIAGNÓSTICA = VALOR DE FLUORESCENCIA DEL PÉPTIDO	DIAGNÓSTICO VERDADERO		Total
	Enfermos = VIH E2+	No enfermos = Donantes Voluntarios	
Resultado + (≥ Punto de corte)	Verdaderos Positivos (VP)	Falsos Positivos (FP)	VP + FP
Resultado - (< Punto de corte)	Falsos Negativos (FN)	Verdaderos Negativos (VN)	FN + VN
Total	VP + FN	FP + VN	VP + FP + FN + VN

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{FP + VN}$$

$$\% \text{ correctamente clasificados} = \frac{VP + VN}{VP + FP + FN + VN}$$

Como se observa en la figura 1.16 y en la tabla 1.10, el área bajo la curva ROC fue superior a 0,9 en 10 de los 17 péptidos iniciales, indicando en éstos una excelente capacidad discriminatoria. En los 7 péptidos restantes, el área bajo la curva ROC tomó valores entre 0,7 y 0,9; indicando una moderada capacidad discriminatoria. Además, cabe señalar que en ninguno de los péptidos, el intervalo de confianza del AUC incluía el valor 0,5 indicando así que todos los péptidos eran capaces de discernir entre donantes voluntarios sanos y los sueros de pacientes infectados por el VIH-1 con anticuerpos anti-E2 del GBV-C (VIH E2+)¹⁵¹.

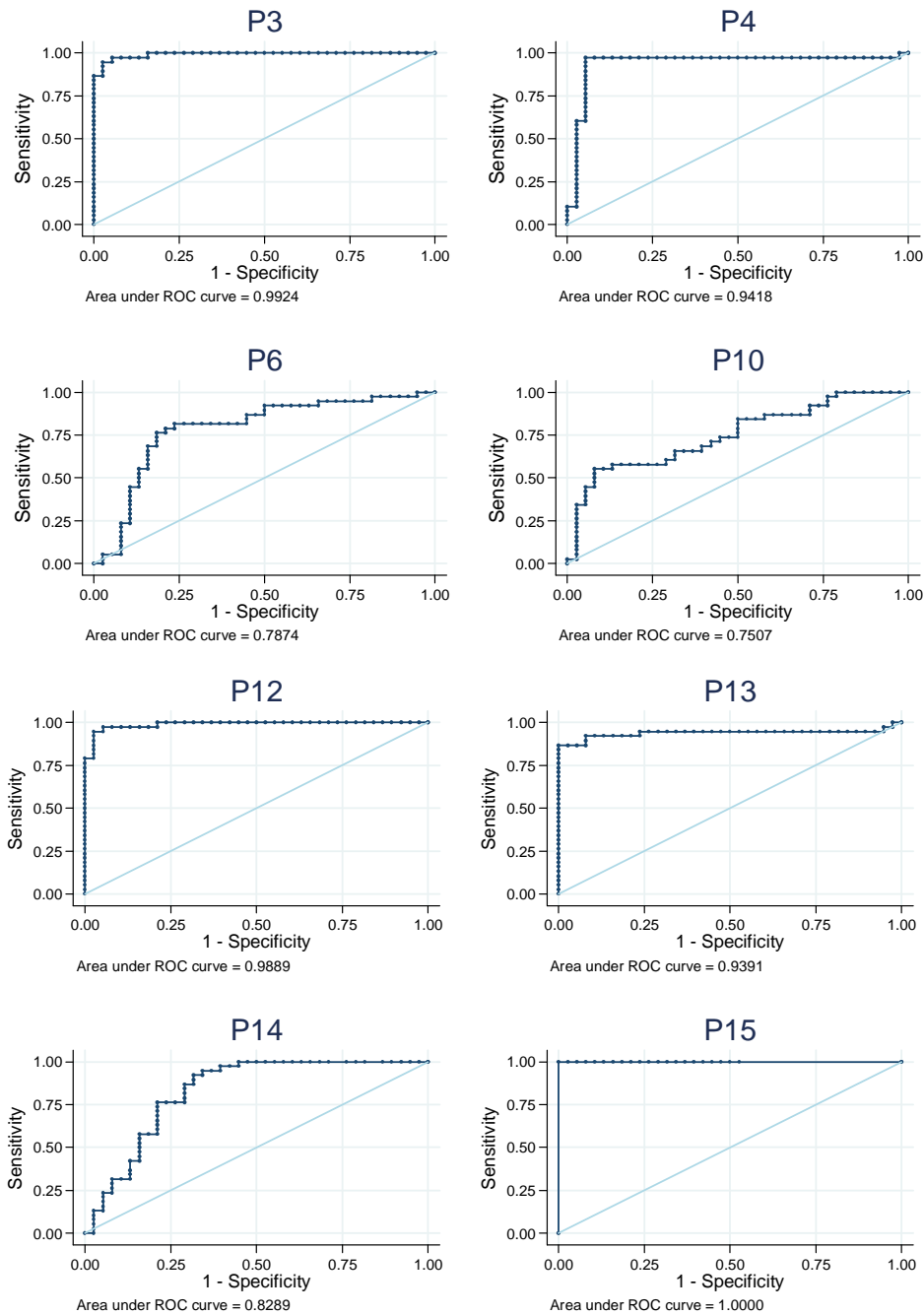


Figura 1.16. Curvas ROC obtenidas para los péptidos seleccionados. En cada caso, se indica el área bajo la curva ROC.

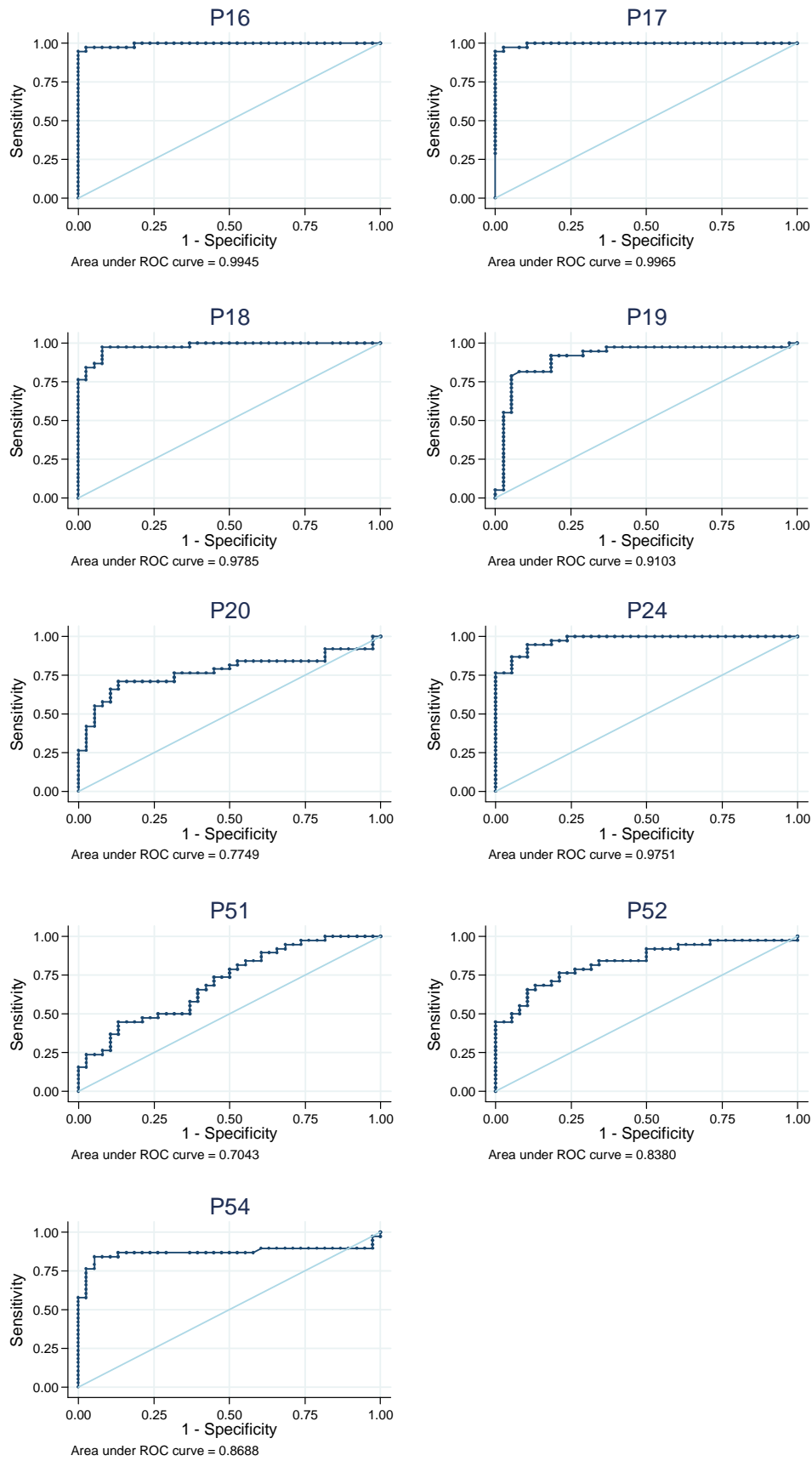


Figura 1.16 (continuación). Curvas ROC obtenidas para los péptidos seleccionados. En cada caso, se indica el área bajo la curva ROC.

Tabla 1.10. Área bajo la curva ROC, sensibilidad y punto de corte para las secuencias peptídicas seleccionadas con los sueros de VIH E2+, utilizando como control negativo los sueros procedentes de donantes voluntarios. Especificidad del 94,74% en cada caso.

	Péptido	AUC	I.C. (95%)	Sensibilidad	Sueros correctamente clasificados	Punto de Corte
Zona I	P3	0,992	(0,98 ; 1,00)	97%	96%	≥ 882
	P4	0,942	(0,87 ; 1,00)	97%	96%	≥ 1426
	P6	0,787	(0,68 ; 0,90)	5%	50%	≥ 6315
Zona II	P10	0,751	(0,64 ; 0,86)	45%	70%	≥ 2484
	P12	0,989	(0,97 ; 1,00)	97%	96%	≥ 2448
	P13	0,939	(0,87 ; 1,00)	87%	91%	≥ 384
	P14	0,829	(0,73 ; 0,93)	24%	59%	≥ 6932
	P15	1,000	(1,00 ; 1,00)	100%	97%	≥ 1251
	P16	0,994	(0,98 ; 1,00)	97%	96%	≥ 1595
	P17	0,996	(0,99 ; 1,00)	97%	95%	≥ 1248
	P18	0,978	(0,95 ; 1,00)	87%	91%	≥ 911
	P19	0,910	(0,84 ; 0,99)	79%	87%	≥ 427
	P20	0,775	(0,66 ; 0,89)	55%	75%	≥ 1223
Zona III	P24	0,975	(0,95 ; 1,00)	87%	91%	≥ 368
	P51	0,704	(0,59 ; 0,82)	24%	59%	≥ 3524
	P52	0,838	(0,75 ; 0,93)	50%	72%	≥ 3104
	P54	0,869	(0,77 ; 0,97)	84%	90%	≥ 78

Se representó la distribución de fluorescencia obtenida para cada péptido con los sueros control negativo y positivo, y el *cut-off* (figura 1.17). Como se observa, en 4 de los péptidos seleccionados (P6, P10, P14 y P51), el punto de corte (línea horizontal roja) se sitúa por encima del valor de la mediana correspondiente a los sueros control positivo.

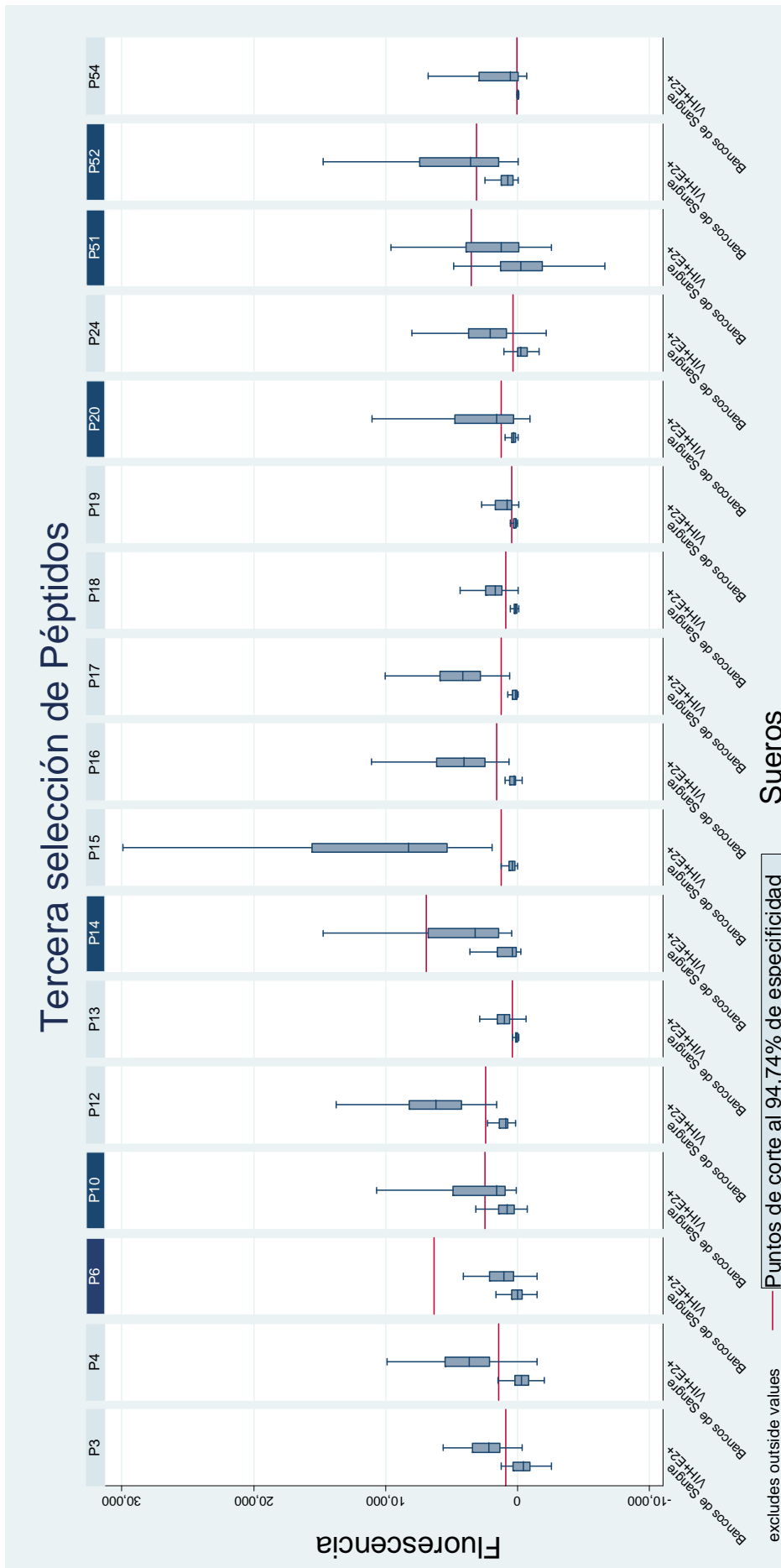


Figura 1.17. Distribución de la fluorescencia de los 17 péptidos para el panel de sueros de donantes voluntarios (bancos de sangre) y el grupo de sueros VIH E2+. La línea horizontal roja representa el *cut-off* en cada caso y la altura de las cajas el rango intercuartílico (P75-P25). Sombreados, se representan los péptidos con una sensibilidad menor del 75% y un porcentaje de sueros correctamente clasificados de 85%.

Teniendo en cuenta que la sensibilidad, en este caso, se define como la probabilidad de clasificar correctamente a un suero que realmente pertenece al grupo VIH E2+, y analizando también los resultados mostrados en la tabla 1.10, se observó que, además de estos péptidos, otros dos epítomos (P20 y P52) mostraban un valor de sensibilidad bajo para la especificidad fijada del 94,74%. Además, estos péptidos tenían porcentajes de sueros correctamente clasificados inferior al 75%.

Se decidió entonces seleccionar aquellas moléculas peptídicas en las que la sensibilidad era mayor o igual al 75% y el porcentaje de sueros correctamente clasificados mayor o igual al 85%, descartando los péptidos señalados en la figura 1.16. Así, un total de 11 de los 17 péptidos estudiados (P3, P4, P12, P13, P15, P16, P17, P18, P19, P24 y P54) cumplieron esta condición. Además, cabe destacar que el área bajo la curva ROC en 10 de estos 11 péptidos fue superior a 0,9 y tan solo en el P54 el valor fue de 0,87; indicando una excelente capacidad discriminatoria.

Concluyendo, mediante el análisis estadístico de los valores de fluorescencia obtenidos en los ensayos con los diferentes paneles de sueros estudiados, se han seleccionado 11 péptidos de los 124 estudiados que cubren toda la proteína E2 del GBV-C y que constan de 18 aminoácidos solapados en 15 residuos. Los epítomos seleccionados son capaces de diferenciar significativamente entre sueros de pacientes infectados por el VIH-1 con anticuerpos anti-E2 del GBV-C, sueros de pacientes infectados por el VIH-1 sin anticuerpos anti-E2 del GBV-C y sueros de personas sanas. Se calcularon las curvas de rendimiento diagnóstico (ROC), el área bajo dichas curvas (AUC ROC) y los correspondientes *cut-offs*, con el fin de evaluar la capacidad de estos péptidos para reconocer anticuerpos anti-E2 del GBV-C en sueros de pacientes infectados por el VIH-1.

Cabe destacar que los péptidos P3 y P4 de la zona I corresponden al segmento E2(7-26) del extremo N-terminal de la proteína E2 del GBV-C. Este dominio peptídico había sido previamente estudiado, en nuestro grupo de trabajo, a partir de estudios biofísicos utilizando modelos de membrana^{63, 158-160}, que identificaron esta región N-terminal como potencialmente antigénica, la cual se encuentra expuesta en la superficie del virión. Se emplearon también varias escalas de predicción semiempíricas, como el perfil de hidrofobicidad de Hopp & Woods¹⁶¹, la escala de predicción de la conformación secundaria más estable según Chou & Fasman¹⁶², utilizada para localizar posibles giros β dentro de la proteína (los cuales generalmente se encuentran en zonas superficiales) o la predicción de la escala de accesibilidad de Janin¹⁶³, que permite determinar los aminoácidos expuestos en la proteína o secuencia peptídica. En la figura 1.18 se muestra el perfil de accesibilidad de la proteína E2 del GBV-C, señalando la región E2(7-26). Por encima de la línea horizontal se consideran residuos accesibles de la proteína.

Estos estudios de predicción corroboraron los resultados experimentales obtenidos en el grupo de trabajo en los que se demostró la interacción de esta región con modelos de membrana. Por tanto, se trata de una región que, al estar expuesta en la superficie del virión, además de interactuar con la membrana celular, también podría ser reconocida por anticuerpos.

Asimismo, los resultados de antigenicidad obtenidos mediante los ensayos de microarrays realizados en este apartado confirman la potencial capacidad antigénica de esta región de la proteína E2 del GBV-C.

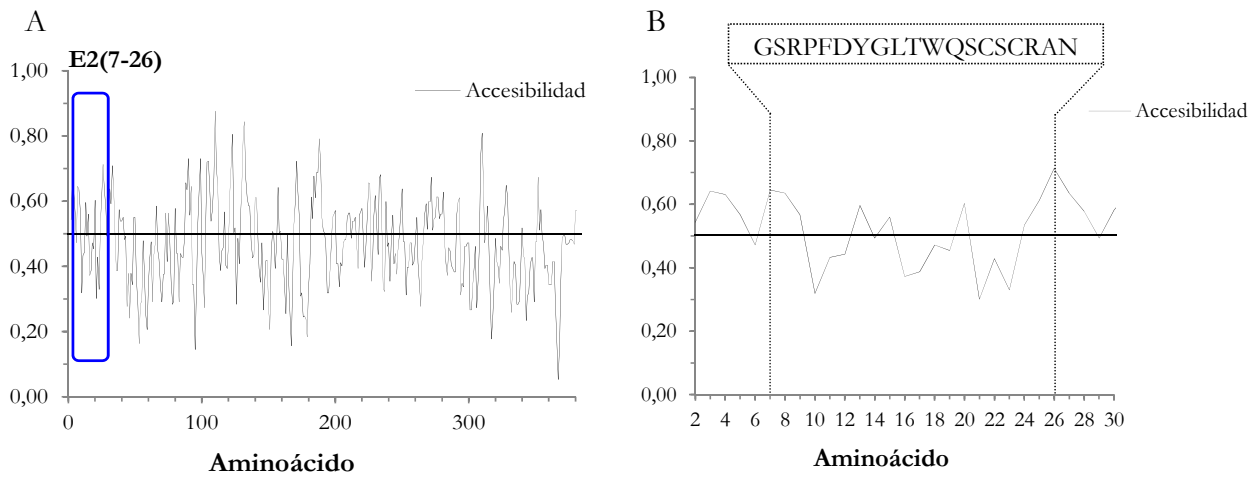


Figura 1.18. Perfil de accesibilidad de Janin para la proteína E2 del GBV-C (A) y para la región E2(7-26) del GBV-C (B).

Por todo ello, se planteó el diseño y la síntesis de diversas formas de presentación de este dominio N-terminal de la proteína E2 del GBV-C con el fin de tratar de desarrollar un ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos contra el GBV-C, así como de diseñar potenciales agentes terapéuticos anti-VIH-1.

2. DISEÑO Y SÍNTESIS DE CONSTRUCCIONES PEPTÍDICAS DERIVADAS DEL EXTREMO N-TERMINAL DE LA PROTEÍNA E2 DEL GBV-C

2.1. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA

La síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS), introducida por Bruce Merrifield en el año 1963¹⁶⁴, es una de las metodologías más sencilla y habitual para la obtención de péptidos. Este método consiste en la unión sucesiva de los aminoácidos que componen la secuencia peptídica, ortogonalmente protegidos tanto en su extremo α -NH₂ como en la cadena lateral de los aminoácidos trifuncionales, a un soporte polimérico insoluble o resina. Tras la incorporación del primer aminoácido al soporte sólido, se elimina el grupo protector del extremo α -NH₂ y se lleva a cabo la elongación de la secuencia adicionando los sucesivos aminoácidos junto con un agente activador del grupo α -COOH. Así, la síntesis transcurre desde el extremo C-terminal al extremo N-terminal del péptido. El sistema utilizado para la síntesis manual de péptidos en fase sólida es el que se muestra en la figura 2.1.

Una vez sintetizada la secuencia peptídica deseada, ésta se separa de la resina pudiéndose eliminar simultáneamente, en función de las condiciones de reacción utilizadas y el tipo de resina, los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos. La funcionalización del extremo C-terminal variará dependiendo del tipo del soporte sólido elegido, siendo lo más habitual la forma ácida o amida (figura 2.2).

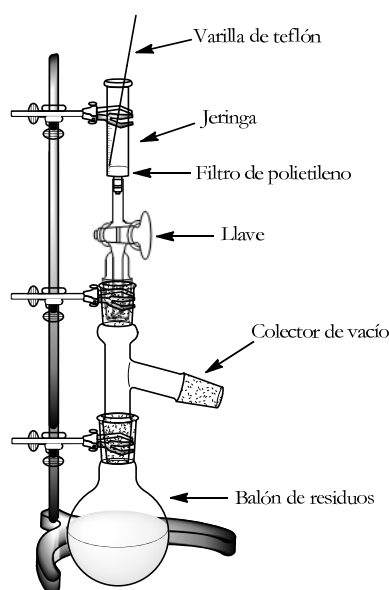


Figura 2.1. Esquema del sistema utilizado para la síntesis manual de péptidos en fase sólida.

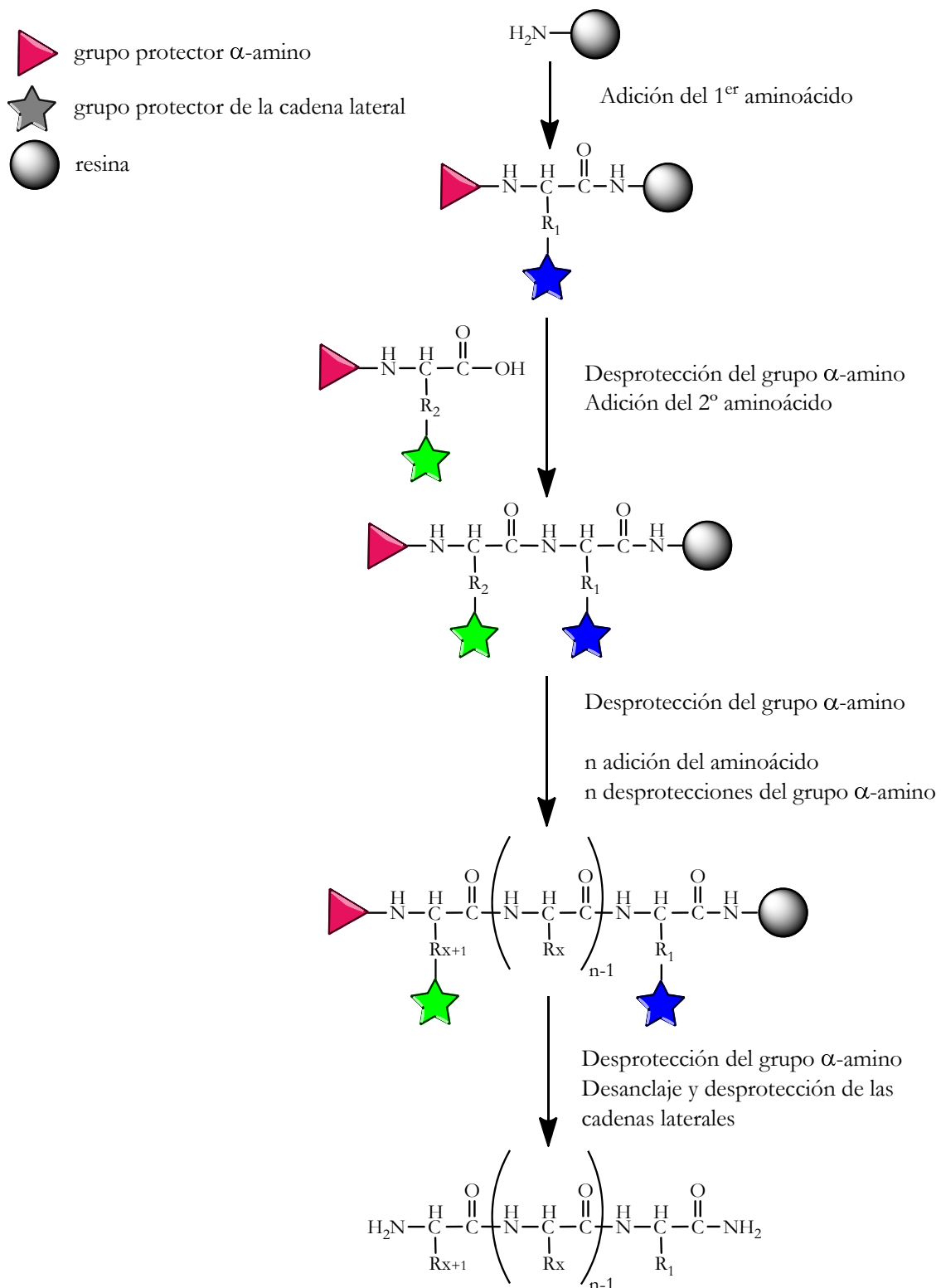


Figura 2.2. Esquema general de la síntesis en fase sólida de péptidos.

La síntesis de péptidos en fase sólida presenta una serie de ventajas respecto a la síntesis de péptidos en solución:

- a) Los acoplamientos de los aminoácidos son prácticamente cuantitativos, ya que el hecho de tener el péptido unido a un soporte sólido permite utilizar elevados excesos de reactivos.
- b) Los excesos de reactivos son eliminados sencillamente tras los procesos de lavado y filtrado.
- c) No se producen pérdidas mecánicas del péptido durante la síntesis.
- d) No es necesaria la purificación de los intermedios peptídicos.
- e) Se obtienen buenos rendimientos de reacción.
- f) El proceso puede automatizarse.

En la síntesis de péptidos, es importante definir la estrategia de protección de los aminoácidos, es decir, la protección del grupo α -NH₂ y de los grupos funcionales de las cadenas laterales. Estos grupos protectores deben ser ortogonales; han de eliminarse utilizando diferentes condiciones de reacción con el fin de evitar posibles reacciones secundarias asociadas con las cadenas laterales de los aminoácidos. Así, la protección del extremo α -NH₂ será temporal, eliminándose sucesivamente durante la síntesis; y la de los grupos funcionales de las cadenas laterales será semipermanente, eliminándose generalmente en la etapa final de desanclaje y desprotección.

En función de los grupos protectores utilizados, pueden definirse las dos estrategias sintéticas más empleadas:

- Estrategia Boc/Bzl: el grupo α -NH₂ de los aminoácidos se encuentra protegido con el grupo *tert*-butoxicarbonil (Boc), lábil a medio ácido, típicamente trifluoroacético (TFA); y los grupos protectores de las cadenas laterales son de tipo bencílico (Bzl), eliminados con ácido fluorhídrico (HF) (figura 2.3).
- Estrategia Fmoc/tBut: la eliminación del grupo protector temporal 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc) se lleva a cabo en medio básico, generalmente con piperidina; mientras que la desprotección de las cadenas laterales se realiza en medio ácido empleando TFA (figura 2.4).

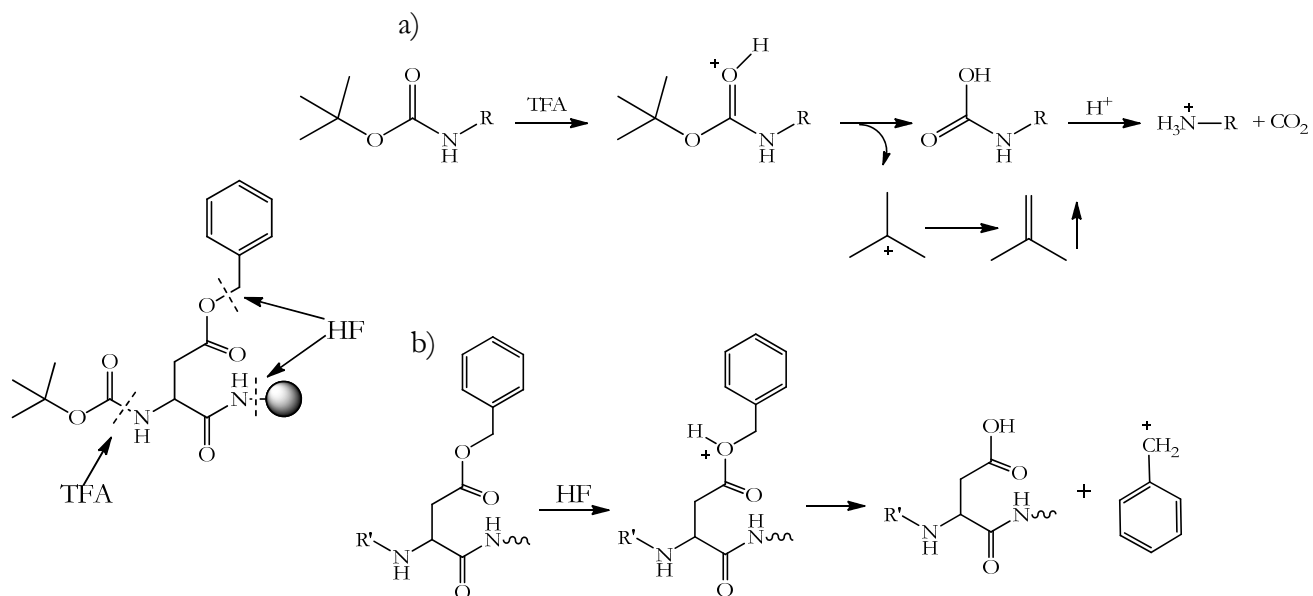


Figura 2.3. Mecanismo de eliminación de los grupos protectores en la estrategia Boc/Bzl.

(a) Eliminación del grupo protector temporal, (b) eliminación del grupo protector permanente.

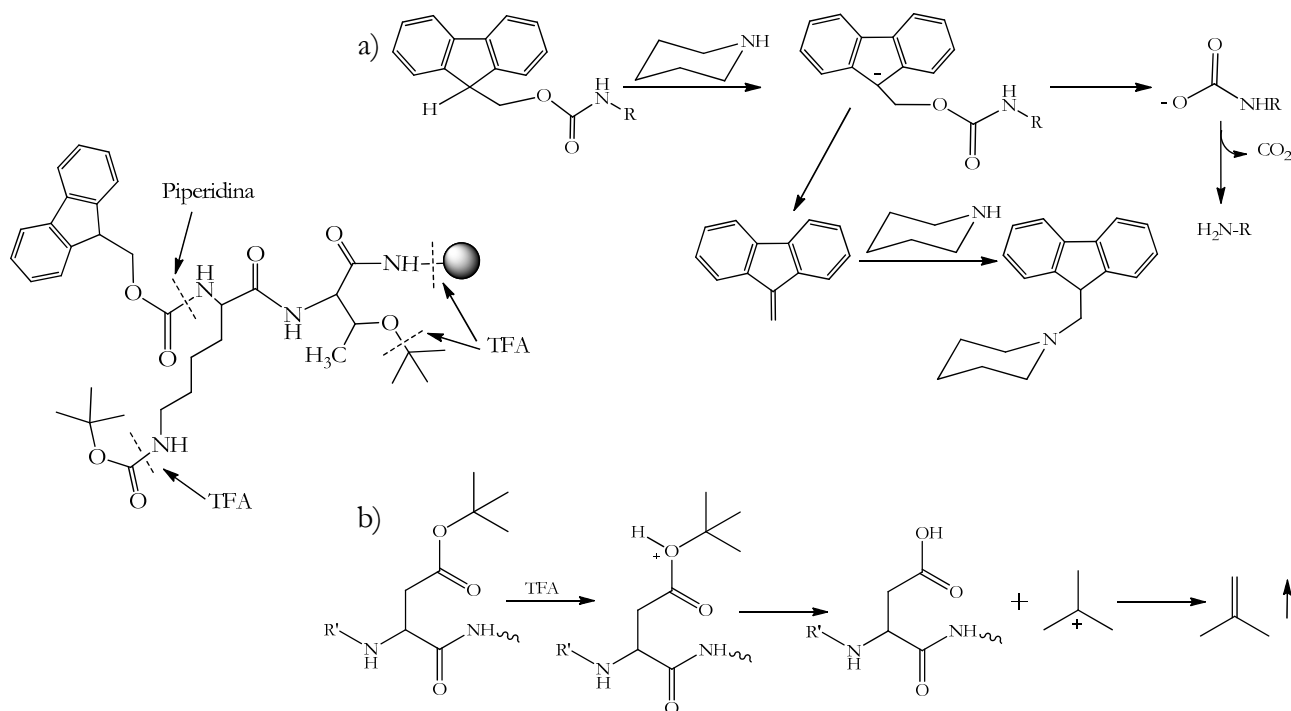


Figura 2.4. Mecanismo de eliminación de los grupos protectores en la estrategia Fmoc/tBut.

(a) Eliminación del grupo protector temporal, (b) eliminación del grupo protector permanente.

2.1.1. Soportes poliméricos

El soporte polimérico o resina debe ser químicamente inerte en las condiciones de síntesis empleadas, estable mecánicamente e insoluble en los disolventes utilizados. En los últimos años se han desarrollado una gran variedad de resinas para la síntesis de péptidos en fase sólida^{165, 166}.

Los péptidos seleccionados en esta tesis se sintetizaron siguiendo la estrategia Fmoc/tBut sobre la resina comercial de polietilenglicol 4-(2',4'-dimetoxifenilaminometil)-fenoxiacetamida (NovaSyn TGR); y la resina de poliestireno Cloruro 2-Clorotritilo (Cl-trt) (figura 2.5). La primera da lugar a péptidos carboxamidas totalmente desprotegidos y es lábil en medio ácido fuerte (95% TFA). En cambio, la resina Cl-trt, que contiene poliestireno reticulado con un 1% de 1,4-divinilbenceno (DVB)^{167, 168}, es también lábil a condiciones ácidas más débiles (1% TFA), lo que permite separar el péptido de la resina sin eliminar los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos, obteniendo así el péptido totalmente protegido excepto en su extremo C-terminal, el cual se encuentra en forma ácida.

Ambas resinas presentan espaciadores bifuncionales, en donde uno de los grupos funcionales está unido al soporte polimérico y el otro se unirá al primer aminoácido de la secuencia peptídica, mediante un enlace tipo amida o éster, respectivamente.

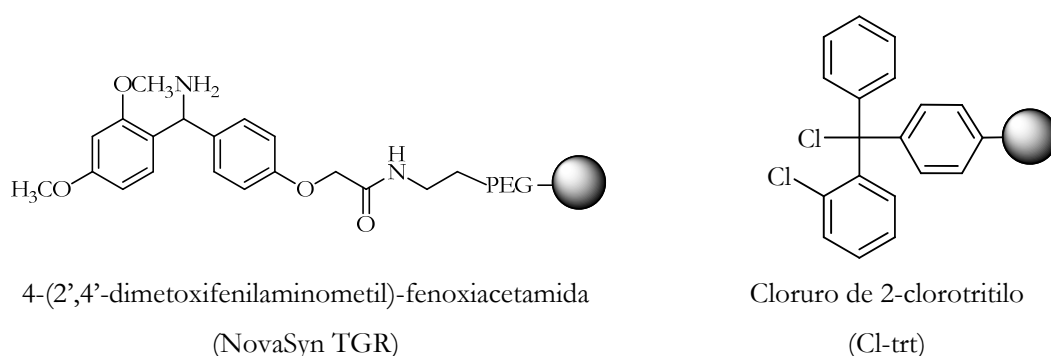


Figura 2.5. Estructura de las resinas utilizadas como soporte sólido.

2.1.2. Reactivos de acoplamiento

Los reactivos de acoplamiento se utilizan para activar el grupo α -carboxilo del aminoácido protegido y permiten obtener rendimientos prácticamente cuantitativos en la reacción de formación del enlace amida. Ésta tiene lugar por el ataque nucleófilo del grupo α -NH₂ de la cadena peptídica unida a la resina que desplaza el grupo saliente del derivado activado del ácido carboxílico (figura 2.6). Además, éstos minimizan las reacciones secundarias que pueden producirse durante la síntesis, como la racemización. Las causas de racemización son debidas a la enolización durante la activación del grupo carboxilo debido a un aumento de la acidez del H α (figura 2.7), o debido a la formación de 5-(4H)-oxazolona¹⁶⁹ (figura 2.8).

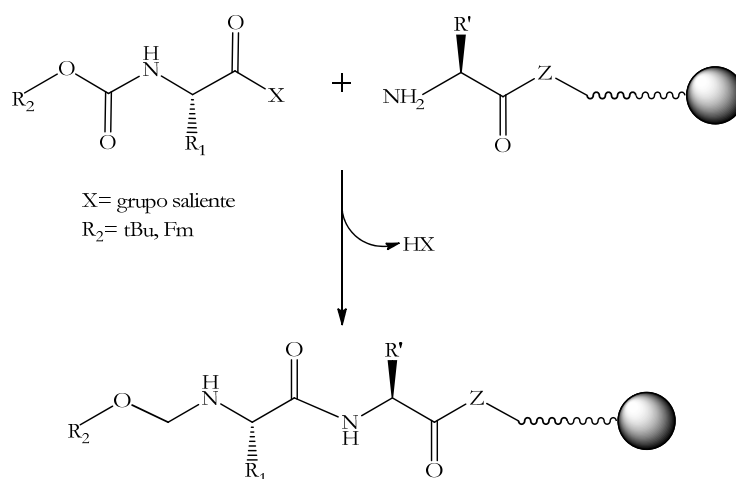


Figura 2.6. Reacción general de acoplamiento en la SPPS.

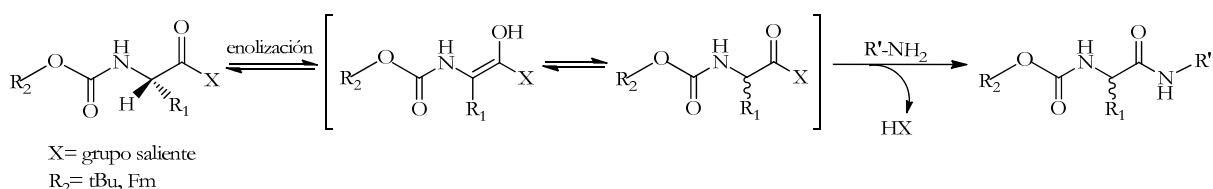


Figura 2.7. Mecanismo de racemización en la síntesis de péptidos debido a la enolización.

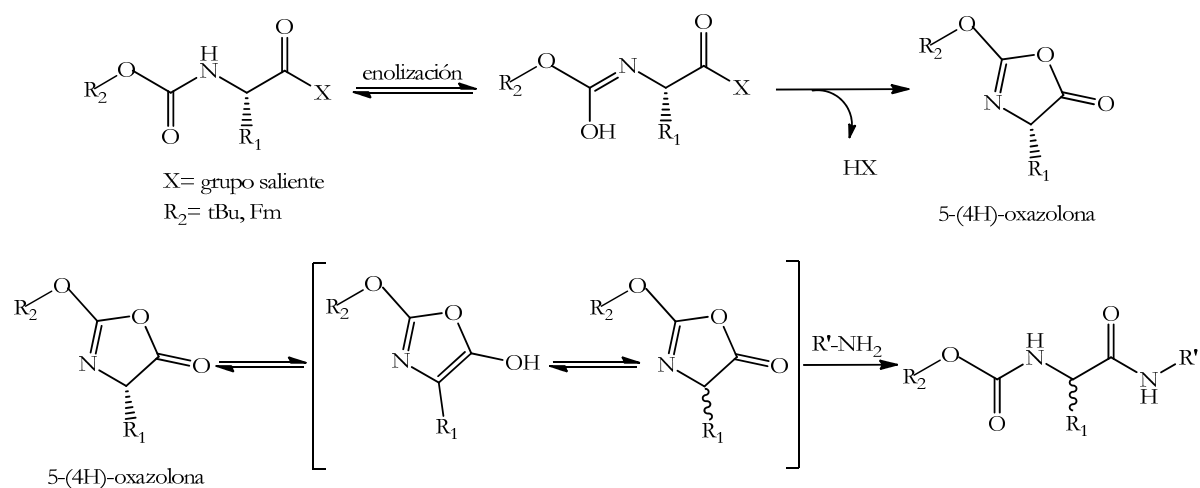


Figura 2.8. Mecanismo de racemización debido a la formación de 5-(4H)-oxazolona.

Los reactivos de acoplamiento pueden dividirse fundamentalmente en dos grupos: carbodiimidas y sales de fosfonio y uronio.

2.1.2.1. Carbodiimidas

Las carbodiimidas son los reactivos de acoplamiento más utilizados en la síntesis de péptidos, entre las que destacan la N,N' -diciclohexilcarbodiimida (DCC)^{170, 171}, que fue la primera descrita, y la N,N' -diisopropilcarbodiimida (DIPCDI)¹⁷² (figura 2.9), que presenta la ventaja de que la urea que se genera como subproducto de la reacción es soluble en los disolventes habituales de la síntesis y no precipita, a diferencia de la urea formada a partir de la DCC (figura 2.10).

Sin embargo, la utilización de estos reactivos de acoplamiento pueden dar lugar a reacciones secundarias debido al intermedio reactivo que se genera, la *O*-acil isourea. Estas reacciones secundarias pueden ser la transposición de *O*-acil a *N*-acil isourea (figura 2.11), que es una especie inactiva; o también puede racemizarse por enolización de la *O*-acil isourea formándose la 5-(4H)-oxazolona (figura 2.11).

Para minimizar estas reacciones secundarias, las carbodiimidas se utilizan conjuntamente con otros activadores del tipo de sales de fosfonio y uronio, como el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt)¹⁷³ o 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt)^{174, 175} (figura 2.12), que reaccionan con la *O*-acil isourea formándose el éster activo de estos activadores (figura 2.12).

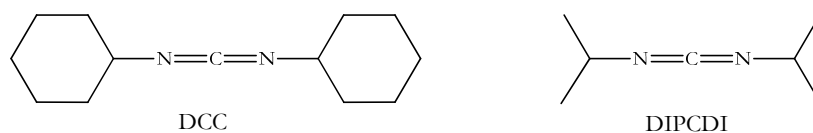


Figura 2.9. Estructura de las carbodiimidas más empleadas.

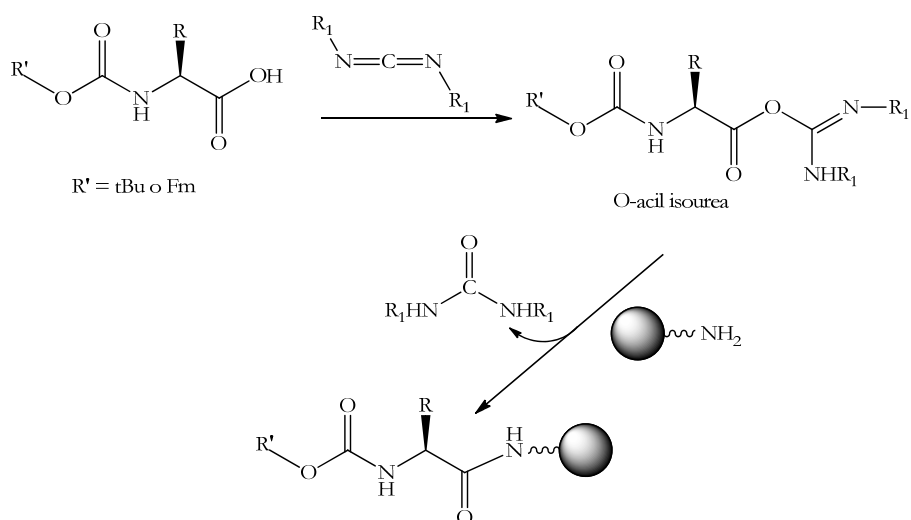


Figura 2.10. Mecanismo de acoplamiento en la SPPS empleando carbodiimidas.

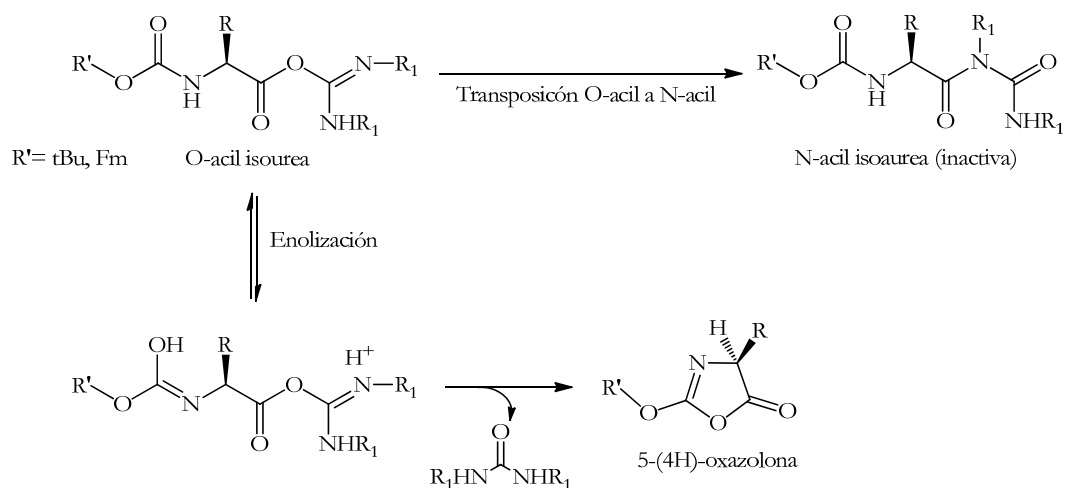


Figura 2.11. Reacciones secundarias que pueden ocurrir durante la activación con carbodiimidas.

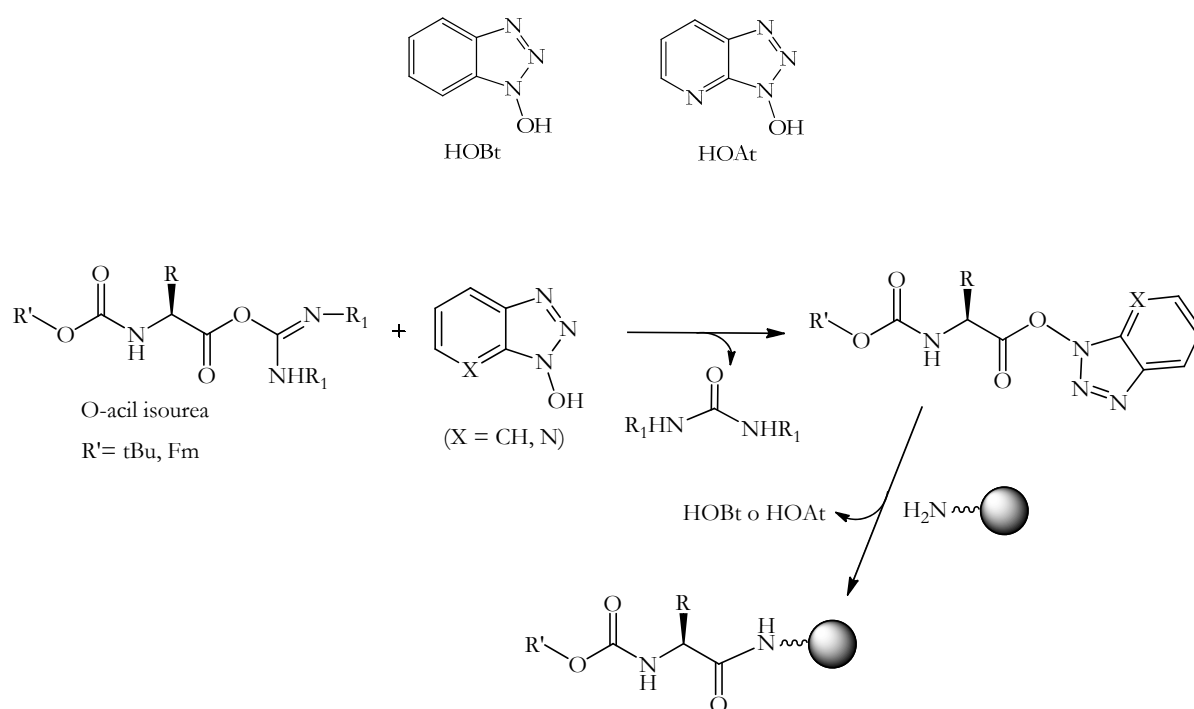


Figura 2.12. Mecanismo de formación del éster activo del HOBT y HOAt.

2.1.2.2 Sales de fosfonio y de uronio

Las sales de fosfonio y de uronio son derivados de los activadores HOBT y HOAt, y son agentes acoplantes más reactivos que las carbodiimidas. A diferencia de éstas, para que las sales de fosfonio y de uronio puedan reaccionar con el aminoácido a acoplar, éste debe estar en forma de carboxilato, por lo que es necesario combinar estos reactivos con una base, generalmente una amina terciaria como la N,N-diisopropiletilamina (DIEA). Estos reactivos dan lugar a una especie activa del carboxilato que posteriormente reacciona con el grupo NH_2 de la cadena peptídica objeto de síntesis (figura 2.13).

Entre las sales derivadas del HOBT destacan el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(dimetilamino)fosfonio (BOP)¹⁷⁶ y el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(pirrolidin)fosfonio (PyBOP)^{177, 178} (figura 2.14).

Las sales de fosfonio y uronio derivadas de HOAt más utilizadas son el hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il)(dimetilamino)metilen]-N-metilmetanaminio (HBTU)¹⁷⁹ y el tetrafluoroborato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il)(dimetilamino)metilen]-N-metilmetanaminio (TBTU)¹⁸⁰. También destacan el hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo-[4,5-b]piridin-1-il-metilen]-N-metilmetanaminio (HATU)¹⁸¹ y

el hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-il-N-oxi)-tris(pirrolidin)fosfonio (PyAOP)^{182, 183} (figura 2.15).

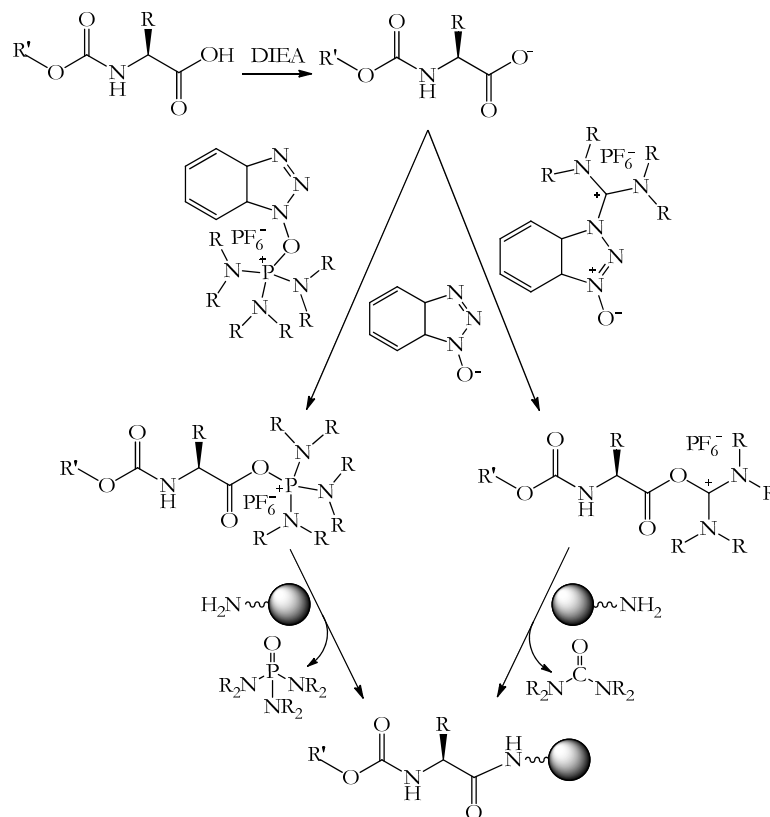


Figura 2.13. Mecanismo de acoplamiento con las sales de fosfonio y uronio.

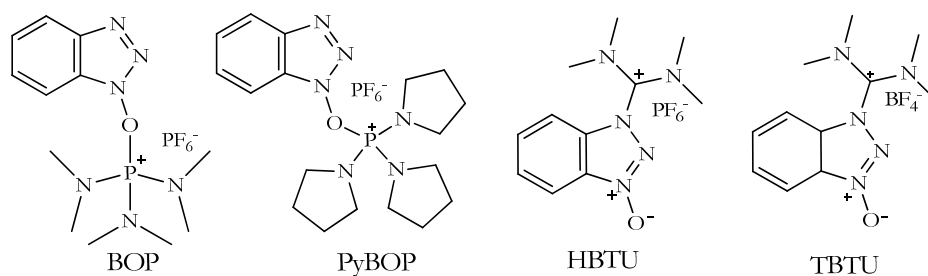


Figura 2.14. Principales sales de fosfonio y de uronio derivadas del HOBT.

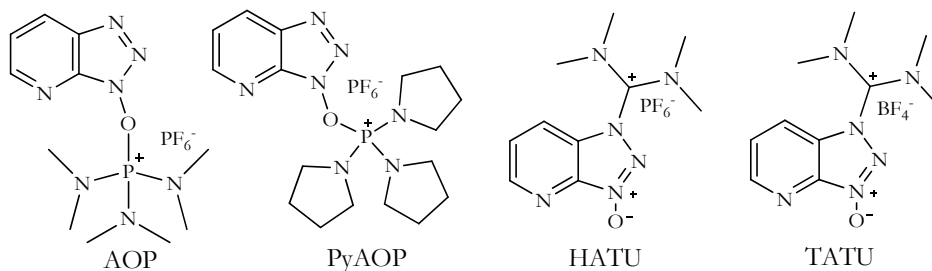


Figura 2.15. Principales sales de fosfonio y de uronio derivadas del HOAt.

2.1.3. Separación del péptido de la resina y eliminación de grupos protectores semipermanentes.

Como se ha descrito en el apartado 2.1, existen fundamentalmente dos estrategias para la síntesis de péptidos en fase sólida, Boc/Bzl y Fmoc/tBu. En ambos casos, la desprotección de las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales y la separación del péptido de la resina se lleva a cabo mediante acidólisis, empleando la mezcla acidolítica más adecuada en función de la estrategia utilizada, las características de la resina y de la secuencia peptídica.

En el caso de la estrategia Boc/Bzl, se utilizan condiciones acidolíticas fuertes, es decir, ácidos fuertes como HF anhidro, entre otros. Mientras que en la estrategia Fmoc/tBu, utilizada para la síntesis de los péptidos seleccionados en esta tesis, las condiciones acidolíticas empleadas son más suaves; siendo el ácido trifluoroacético (TFA) el más empleado junto con compuestos que actúan como capturadores de carbocationes, como son los compuestos de silicio del tipo triisopropilsilano (TIS) (figura 2.16).

Los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos utilizados durante las síntesis llevadas a cabo en esta tesis, además del tBu para el ácido glutámico, la serina y la treonina, fueron el 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonil (Pmc) para la arginina (figura 2.17) y el *tert*-butoxicarbonil (Boc) para el triptófano (figura 2.18). Éstos se eliminan también en medio ácido, por tratamiento con TFA. Otro grupo protector utilizado fue el grupo semi-temporal 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-4-iliden)-3-metilbutil (ivDde) para la lisina, sensible al tratamiento con hidracina en *N,N'*-dimetilformamida (DMF) (figura 2.19).

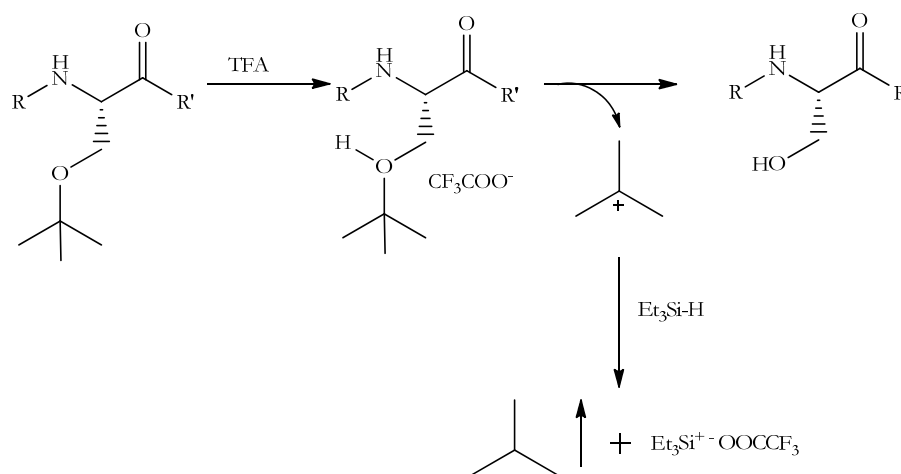


Figura 2.16. Mecanismo de eliminación del grupo protector tBu en presencia de TIS.

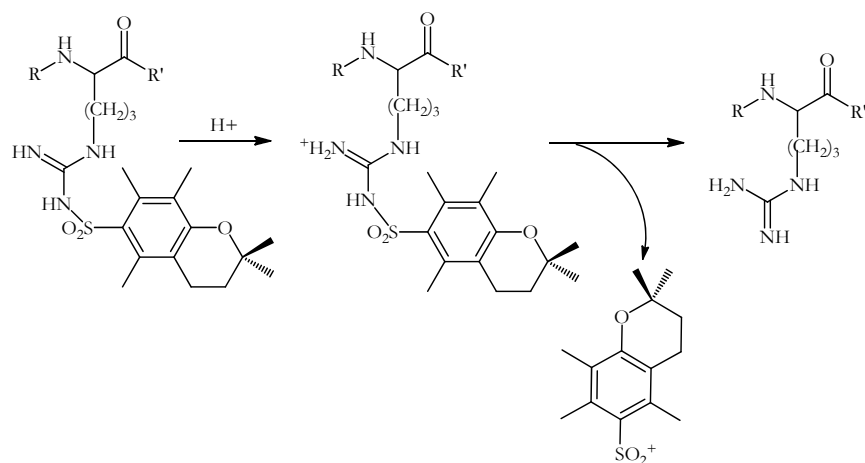


Figura 2.17. Mecanismo de eliminación del grupo Pmc del residuo de Arg.

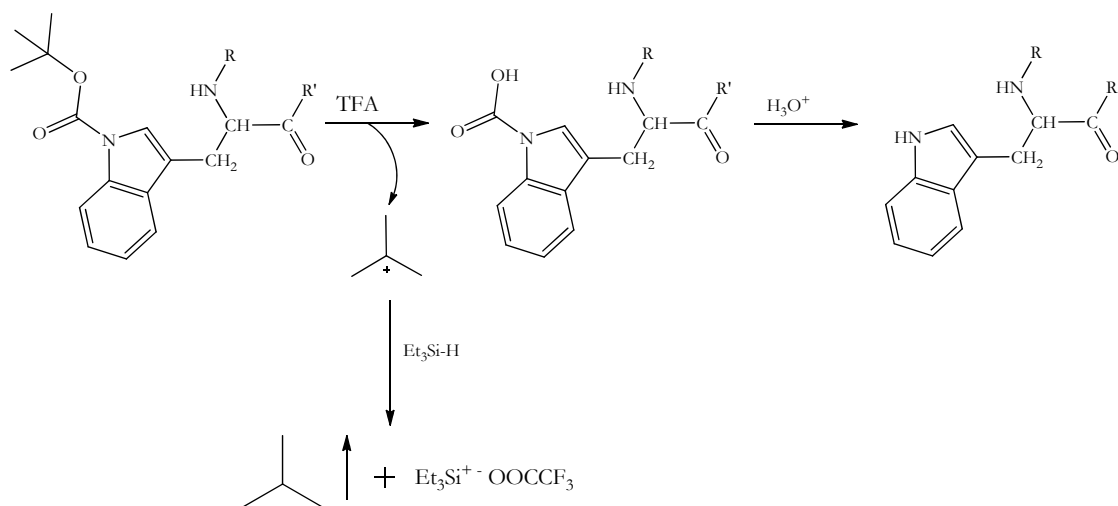


Figura 2.18. Mecanismo de eliminación del grupo protector Boc en el residuo Trp.

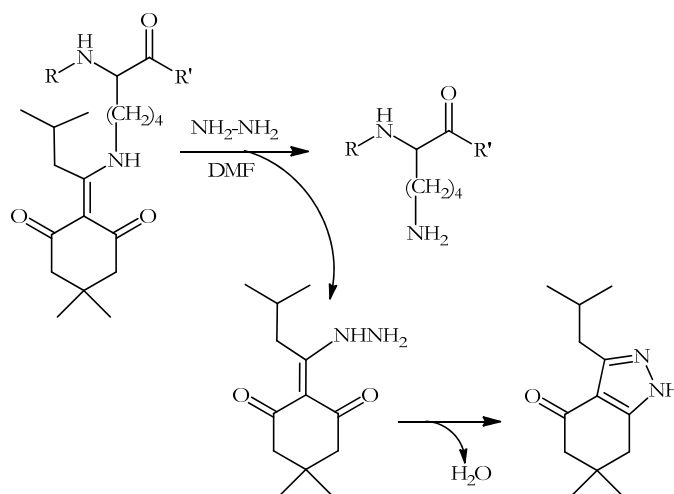


Figura 2.19. Mecanismo de eliminación del grupo protector ivDde en el residuo Lys.

2.2. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS RAMIFICADOS (MAPs)

Como se ha mencionado en la introducción de esta tesis, los péptidos ramificados o MAPs se basan en una matriz inmunológicamente inerte, formada por residuos trifuncionales de lisinas, sobre la que se sintetizan las secuencias peptídicas. Estas moléculas peptídicas se caracterizan por presentar una estructura química bien definida. Además, la estructura ramificada que genera el núcleo de lisinas facilita el empaquetamiento de los antígenos peptídicos que lo forman dando lugar a una mayor estabilización de la estructura secundaria de las secuencias peptídicas. Estas características suelen mejorar el reconocimiento de los epítomos por las inmunoglobulinas, pudiendo así ser consideradas como potenciales agentes para el desarrollo de nuevos sistemas diagnósticos, en nuestro caso, de la infección causada por el GBV-C.

En este trabajo se han sintetizado péptidos ramificados tetraméricos de tipo lineal y cíclico que contienen el dominio N-terminal de la proteína de envoltura E2 del GBV-C. Para ello, se tuvieron en cuenta estudios previos publicados por nuestro grupo de trabajo, que demostraron que los péptidos cíclicos manifestaban una capacidad incrementada en el reconocimiento de los anticuerpos anti-GBV-C presentes en el suero de pacientes hemodializados y con hepatitis C crónica⁶¹. Además, se llevó a cabo la síntesis de un péptido ramificado heterogéneo que conjuga la región N-terminal de la proteína E2 con una secuencia de la proteína no estructural NS4 del GBV-C, ya que estudios previos indicaban que la combinación de epítomos de proteínas estructurales y no estructurales parecía ser necesaria para alcanzar tanto una buena sensibilidad, en el ensayo inmunoenzimático, como una mayor especificidad en los resultados.

Las secuencias primarias de los epítomos potencialmente antigénicos del GBV-C seleccionados se detallan en la tabla 2.1. Por un lado, el péptido de la proteína no estructural, el epítomo NS4a(27-43), estudiado en el grupo durante la tesis doctoral de Teresa Pérez¹⁶⁰, y 3 péptidos antigénicos solapados, correspondientes a la región N-terminal de la proteína E2 del GBV-C (LP1_{E2}, LP2_{E2} y LP3_{E2}). Las secuencias peptídicas correspondientes a la proteína E2 se modificaron en los residuos 20 y 22, sustituyendo las cisteínas presentes en la proteína por el residuo ácido 2-aminobutírico (Abu). Éste presenta la misma hidrofobicidad y propiedades estéricas que la cisteína, pero evita la reactividad de su grupo tiol sin modificar las propiedades immunoquímicas del péptido original¹⁸⁴.

Tabla 2.1. Secuencia primaria de los péptidos seleccionados. El aminoácido cisteína se ha sustituido por el residuo ácido 2-aminobutírico, [Abu].

Péptidos	Secuencia primaria
E2(7-26) (LP1 _{E2})	GSRPFEPGLTWQS[Abu]S[Abu]RANG
E2(11-26) (LP2 _{E2})	FEPGLTWQS[Abu]S[Abu]RANG
E2(17-26) (LP3 _{E2})	WQS[Abu]S[Abu]RANG
NS4a(27-43)	TDWDVKGGGSPLYRHGDG

2.2.1. Péptidos ramificados de tipo lineal

Los MAPs tetraméricos de tipo lineal sintetizados se componen de cuatro secuencias peptídicas lineales. Dentro de este grupo, pueden diferenciarse entre MAPs tetraméricos heterogéneos, cuando los epítomos son iguales dos a dos; y MAPs tetraméricos homogéneos, cuando los cuatro epítomos son iguales.

La síntesis de ambos tipos de moléculas se llevó a cabo siguiendo la estrategia Fmoc/tBut sobre la resina NovaSyn TGR (0,29 mmol/g), como se indica en los apartados 4.9-4.13 de Materiales y métodos. El primer aminoácido introducido fue la β -alanina, que actúa como espaciador entre la resina y el núcleo de lisinas tetramérico. Este último se obtuvo acoplado en primer lugar una lisina protegida tanto en su extremo $N\alpha$ como $N\epsilon$ con el grupo Fmoc. Seguidamente y tras la eliminación de los grupos Fmoc, se acopló otra lisina de iguales características, en el caso de la síntesis de MAPs homogéneos; y una lisina ortogonalmente protegida en su extremo $N\alpha$ con el grupo Fmoc y en su extremo $N\epsilon$ con el grupo ivDde, en el caso de los MAPs heterogéneos.

A continuación se describen las síntesis de cada uno de los tipos de péptidos ramificados lineales.

2.2.1.1. Péptidos ramificados de tipo lineal heterogéneo

Se sintetizó un MAP tetramérico heterogéneo de tipo lineal que contenía dos copias del epítomo E2(7-26) en el extremo $N\alpha$, y dos copias de la secuencia peptídica NS4a(27-43) en el extremo $N\epsilon$ (apdo. 4.9, Materiales y métodos). La síntesis se llevó a cabo siguiendo el esquema de

síntesis que se muestra en la figura 2.20, a partir del núcleo de lisinas tetramérico con los extremos N^ε protegidos con el grupo ivDde. En primer lugar, se sintetizaron simultáneamente las dos cadenas de la secuencia E2(7-26) sobre el extremo N α del núcleo de lisinas. El último aminoácido se incorporó protegido en su extremo N α con el grupo *tert*-butoxicarbonilo (Boc). Seguidamente, a partir de una alícuota de peptidil-resina, se separó la molécula peptídica de la resina eliminando simultáneamente los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos y el grupo Boc de los extremos N α , con el fin de analizarla tanto por HPLC analítico como por espectrometría de masas, y así, caracterizar este intermedio de síntesis.

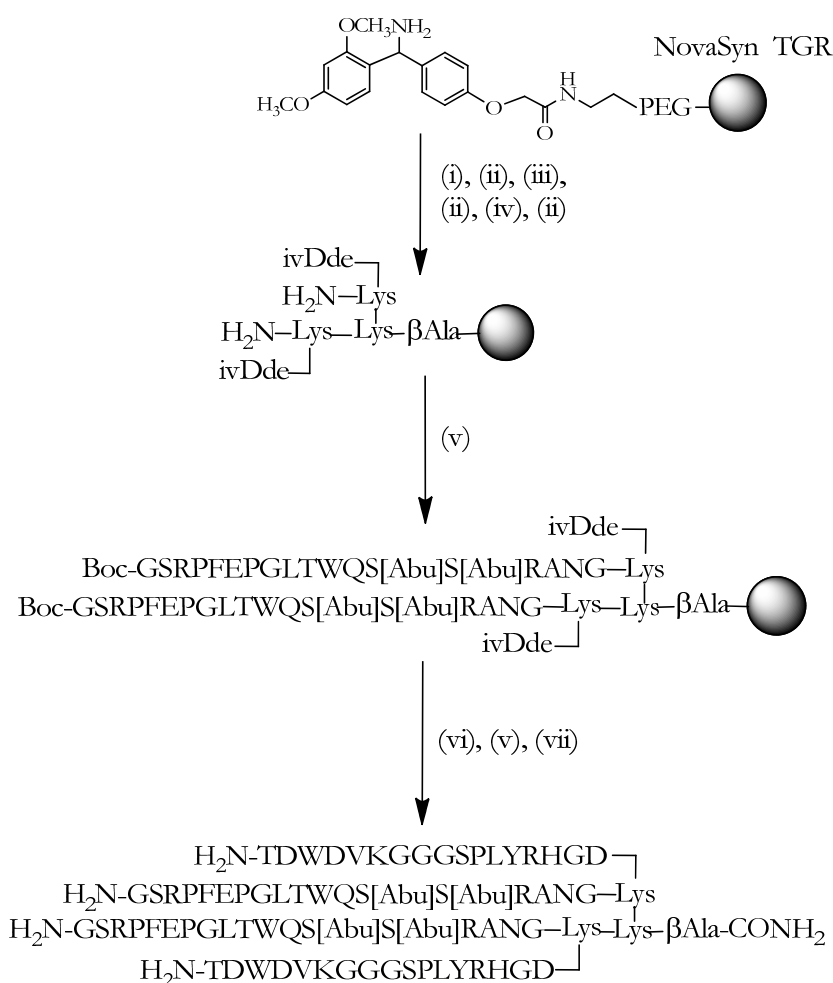


Figura 2.20. Esquema de síntesis del MAP tetramérico de tipo lineal heterogéneo.

CONDICIONES: (i) Fmoc-βAla-OH, HOBT, DIPCDI en DMF, 1 h 30 min; (ii) 20% piperidina/DMF; (iii), Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, HOBT, DIPCDI en DMF, 1 h 30 min; (iv) Fmoc-Lys(ivDde)-OH, HOBT, DIPCDI, en DMF, 1 h 30 min; (v) síntesis en fase sólida (SPPS); (vi) 2% NH₂ NH₂/DMF, 20 min; (vii) TFA/H₂O/TIS, 3 h.

Posteriormente, se eliminaron los grupos protectores ivDde en presencia de 2% de hidracina en DMF. La reacción de eliminación de este grupo se siguió por UPLC-MS tras el proceso de desanclaje y desprotección de varias alícuotas de peptidil-resina. Este proceso se repitió cinco veces, hasta que no se observó la presencia del grupo ivDde en el péptido dimérico. Una vez quedó libre el extremo N^ε del núcleo de lisinas, se sintetizaron simultáneamente las dos cadenas correspondientes a la secuencia peptídica NS4a(27-43). Como activadores de los grupos α -carboxilo de los aminoácidos se emplearon HOBt/DIPCDI, y en los casos en que el acoplamiento fue incompleto, se repitió la reacción empleando como activador TBTU en presencia de DIEA. Las reacciones de acoplamiento y desprotección del extremo α -amino de los aminoácidos se controlaron con los test colorimétricos de ninhidrina, TNBS y cloranilo, según correspondiera.

Finalizada la síntesis, se eliminó el grupo protector Fmoc del último aminoácido de la secuencia, se secó la resina y se separó la molécula peptídica de ésta, eliminando simultáneamente los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos y los dos grupos Boc terminales. El MAP tetramérico así obtenido se purificó mediante HPLC semipreparativo y se analizó por HPLC analítico y espectrometría de masas MALDI-TOF y electrospray en modo positivo (ES⁺). La masa experimental se calculó como la mediana de la masa obtenida para cada relación masa/carga, a partir del correspondiente espectro de ES⁺. El rendimiento tras la purificación del péptido fue del 12%. En la figura 2.21 se muestra la caracterización del MAP₄[E2(7-26),NS4a(27-43)] (MAP_{E2/NS4}).

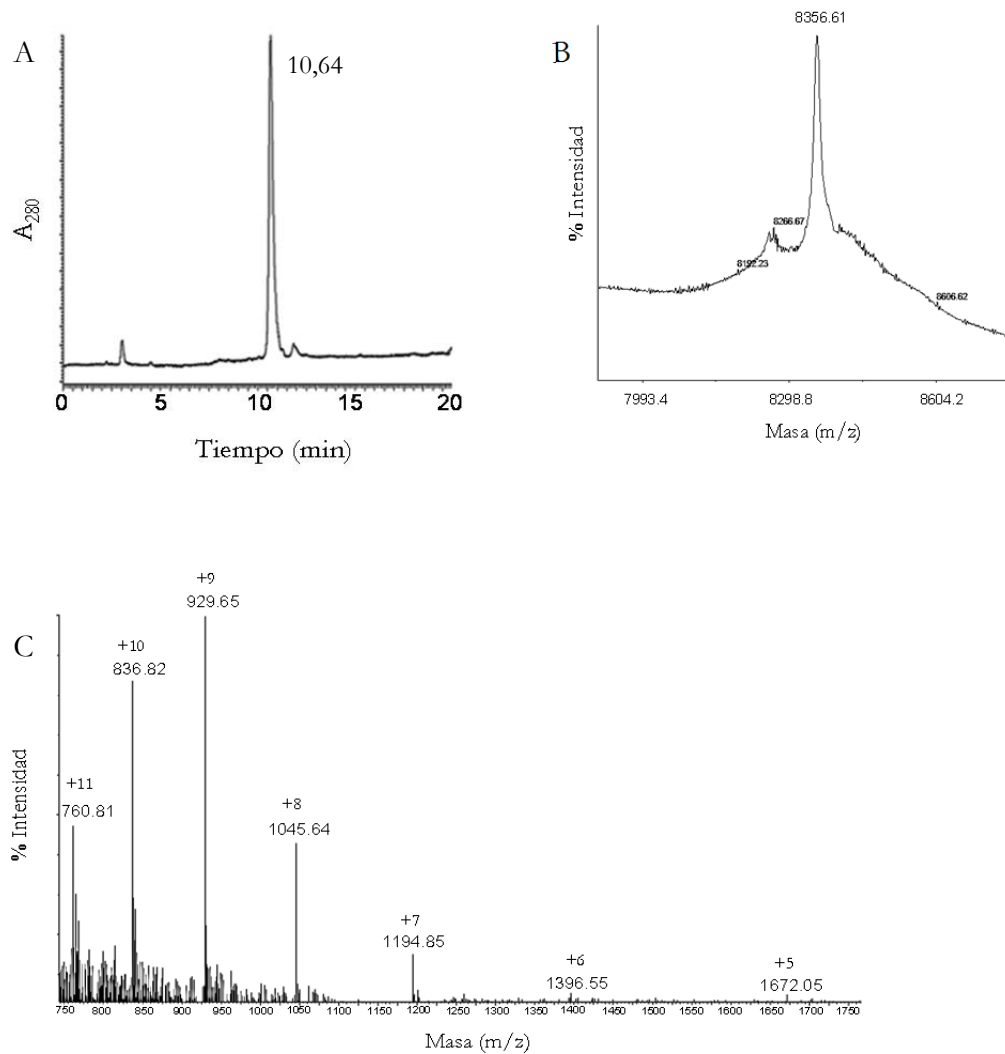


Figura 2.21. A) Espectro de HPLC MAP₄[E2(7-26),NS4a(27-43)]. Columna fase reversa Poroshell 300-SB C₁₈ (2,1 x 75 mm) 5 μ m, gradiente lineal de 95% a 5% de A en 20 minutos, flujo de 1 ml/min, detección 280 nm (A: H₂O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA); t_R = 10,64 min. B) Espectro de masas MALDI-TOF del péptido purificado. Matriz HCCA, método lineal positivo. C) Espectro de masas ES⁺, masa calculada = 8356,0 g/mol; masa experimental = 8357,8 g/mol.

2.2.1.2. Péptidos ramificados de tipo lineal homogéneo

Se sintetizaron tres MAPs tetraméricos homogéneos de tipo lineal que contenían los epítomos E2(17-26), E2(11-26) y E2(7-26), respectivamente. Las síntesis se llevaron a cabo a partir del núcleo de lisinas tetramérico, sintetizando simultáneamente las cuatro secuencias peptídicas correspondientes en cada caso, tal y como se indica en los apartados 4.11, 4.12 y 4.13 de Materiales y métodos. Debido a la dificultad experimentada durante la síntesis y purificación del MAP_{E2/NS4} por la complejidad del crudo peptídico, los activadores del grupo α -carboxilo de los aminoácidos empleados en este caso fueron HATU/DIEA, ya que se ha demostrado que esta sal de uronio proporciona mejores resultados en la eficiencia del acoplamiento de los aminoácidos y reduce el tiempo de reacción¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Las reacciones de acoplamiento y desprotección del extremo α -amino de los aminoácidos se controlaron con los ensayos colorimétricos de ninhidrina, TNBS y cloranilo, según correspondiera.

Finalizada la síntesis, se secó la resina y se separó la molécula peptídica de ésta, eliminando simultáneamente los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos. El rendimiento de reacción tras la SPPS fue del 58% en el caso del MAP₄E2(7-26) (MAP_{LP1}), del 68% en el caso del MAP₄E2(11-26) (MAP_{LP2}), y del 72% para el MAP₄E2(17-26) (MAP_{LP3}). El esquema de síntesis se muestra en la figura 2.22. En las figuras 2.23-2.25 se muestra la caracterización tanto por HPLC como por espectrometría de masas (ES⁺ y MALDI-TOF) de las moléculas ramificadas sintetizadas (MAP_{LP1}, MAP_{LP2} y MAP_{LP3}).

Los MAP se desalaron mediante la utilización de cartuchos de extracción en fase sólida, tal y como se describe en el apartado 3.10.2 de Materiales y métodos. Una vez desalados, se purificaron mediante HPLC semipreparativo, siendo el rendimiento tras la purificación del 14% para el MAP_{LP3}, del 10% para el MAP_{LP2} y del 5% en el caso del MAP_{LP1}.

Se analizó cada una de las moléculas sintetizadas por HPLC analítico y con las técnicas de espectrometría de masas MALDI-TOF y electrospray en modo positivo. Las masas experimentales se calcularon como la mediana de la masa obtenida para cada relación masa/carga, a partir del correspondiente espectro de ES⁺. Las diferencias existentes entre la masa experimental y calculada de algunos de los espectros de MALDI-TOF se encuentra dentro de lo esperado, ya que las medidas se adquirieron con el método lineal de tiempo de vuelo.

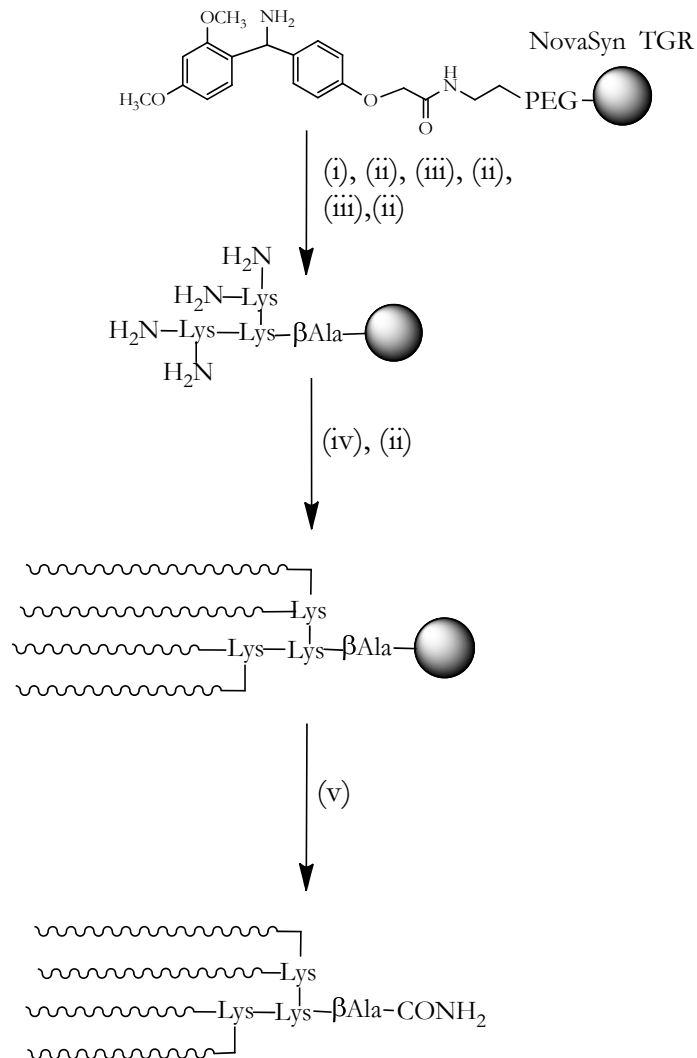


Figura 2.22. Esquema de síntesis de los MAPs tetraméricos de tipo lineal homogéneo.

CONDICIONES: (i) Fmoc-βAla-OH, HATU, DIEA en DMF 30 min; (ii) 20% piperidina/DMF; (iii) Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, HATU, DIEA en DMF, 30 min; (iv) síntesis en fase sólida (SPPS); (v) TFA/H₂O/TIS, 3 h.

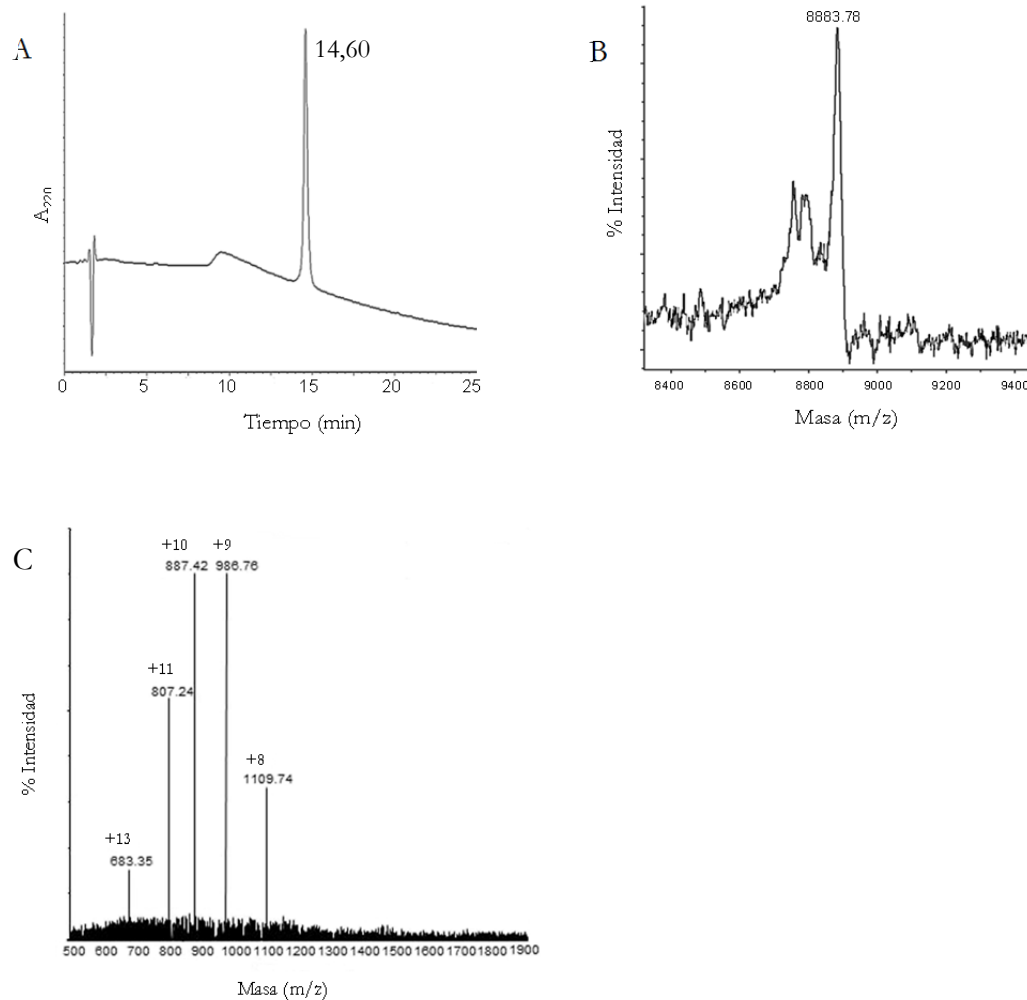


Figura 2.23. A) Espectro de HPLC del MAP_{LP1}. Columna fase reversa Poroshell 300-SB C₁₈ (2,1 x 75 mm) 5 μ m, gradiente lineal de 95% a 5% de A en 25 minutos, flujo de 1 ml/min, detección 220 nm (A: H₂O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA), $t_R = 14,60$ min. B) Espectro de masas MALDI-TOF del péptido purificado. Matriz HCCA, método lineal positivo. C) Espectro de masas ES⁺. Masa calculada = 8869,7 g/mol; masa experimental = 8869,9 g/mol.

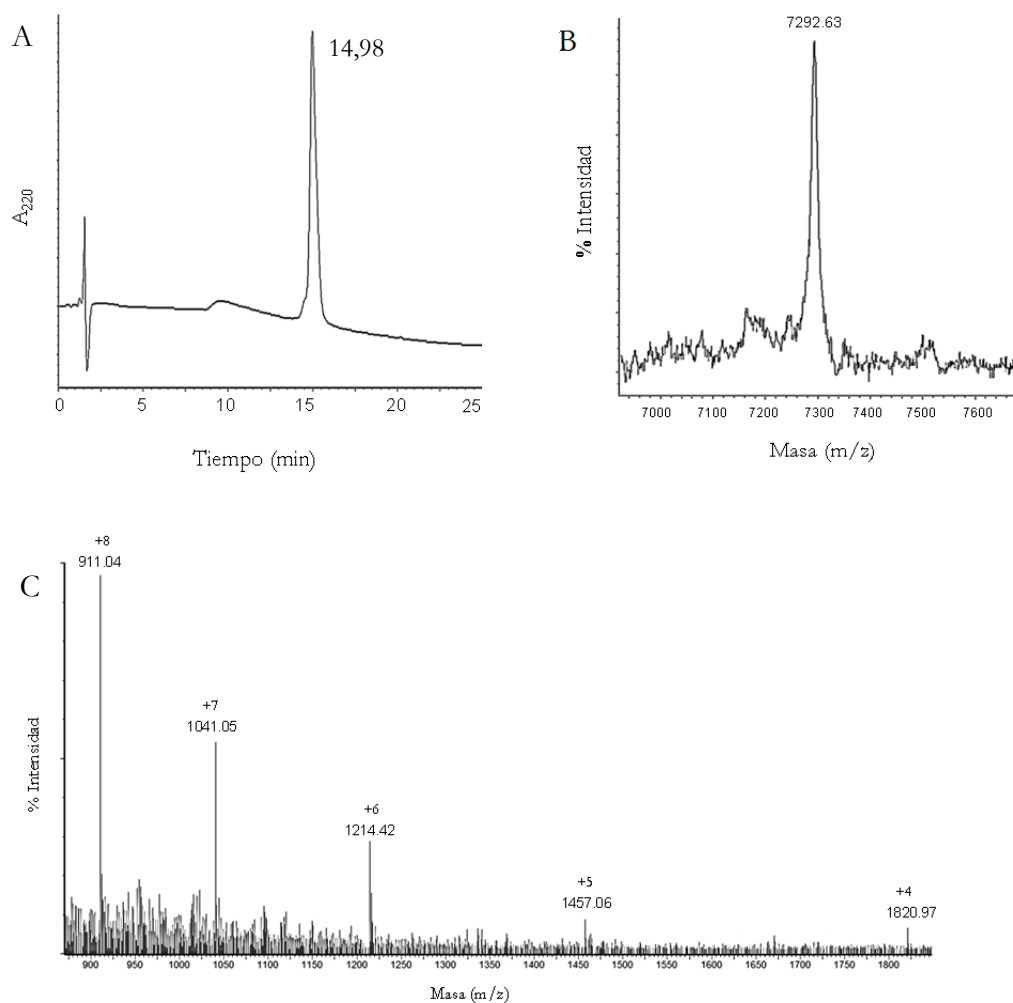


Figura 2.24. A) Espectro de HPLC del MAP_{LP2}. Columna fase reversa Poroshell 300-SB C₁₈ (2,1 x 75 mm) 5 μ m, gradiente lineal de 95% a 5% de A en 25 minutos, flujo de 1 ml/min, detección 220 nm (A: H₂O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA), t_R = 14,98 min. B) Espectro de masas ES⁺. Masa calculada = 7280,0 g/mol; masa experimental = 7280,2 g/mol. C) Espectro de masas MALDI-TOF del péptido purificado. Matriz HCCA, método lineal positivo.

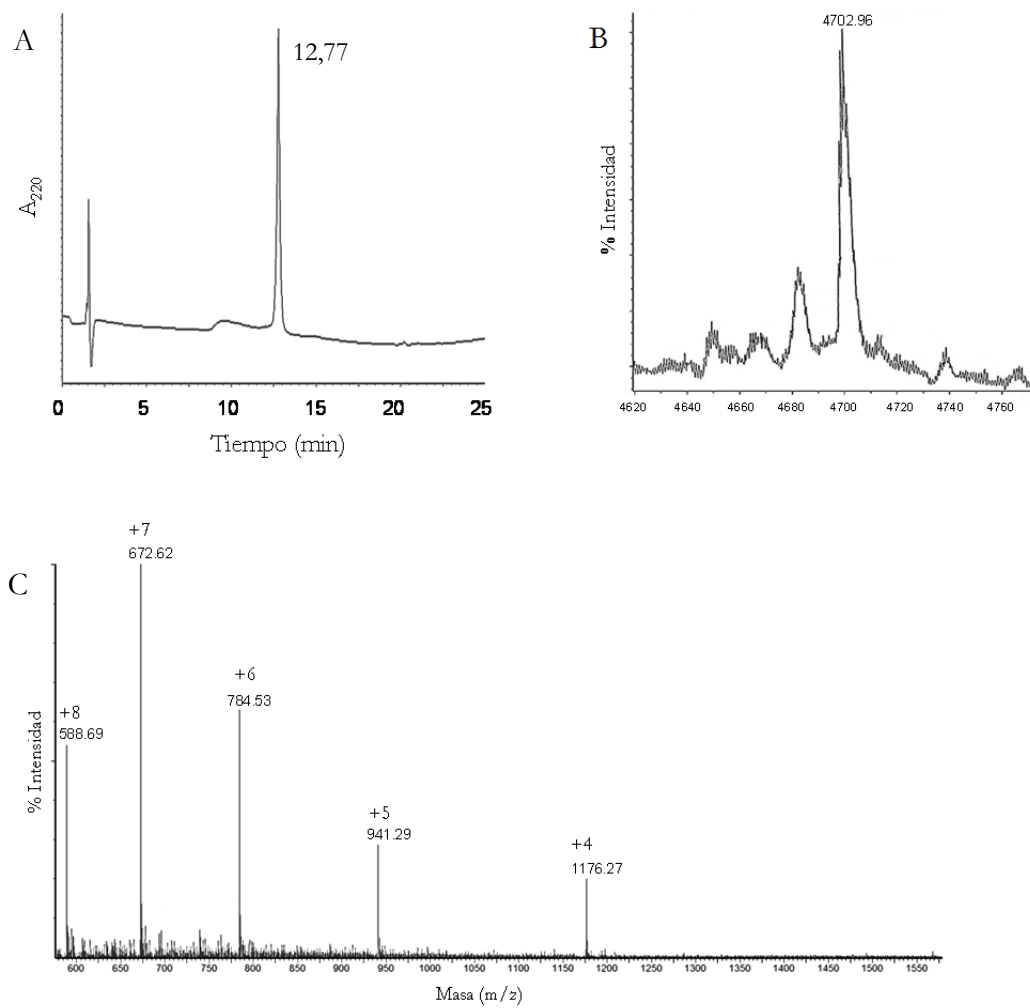


Figura 2.25. A) Espectro de HPLC del $\text{MAP}_{\text{LP}3}$. Columna fase reversa Poroshell 300-SB C_{18} (2,1 x 75 mm) 5 μm , gradiente lineal de 95% a 5% de A en 25 minutos, flujo de 1 ml/min, detección 220 nm (A: H_2O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA); $t_{\text{R}} = 12,77$ min. B) Espectro de masas ES^+ . Masa calculada = 4701,1 g/mol; masa experimental = 4701,3 g/mol. C) Espectro de masas MALDI-TOF del péptido purificado. Matriz HCCA, método lineal positivo.

2.2.2. Péptidos ramificados de tipo cíclico

Aunque existen en la literatura diversos tipos de macromoléculas peptídicas ramificadas, los dendrímeros peptídicos de tipo cíclico han sido particularmente investigados con el fin de diseñar moléculas que mimeticen las conformaciones de la proteína nativa de la mejor manera posible, dado que pueden adoptar características conformacionales similares a las de las zonas antigénicas originales de la proteína nativa.

De esta manera, diversos grupos de investigación han sintetizado y estudiado dendrímeros peptídicos cíclicos con aplicaciones biológicas. Por ejemplo, se han utilizado estrategias sintéticas, tanto en fase sólida como en solución, para preparar dendrímeros lipopeptídicos multivalentes que contienen cuatro copias de epítomos cíclicos, formados a través de puentes disulfuro, ensayados con éxito en una prueba de vacunación experimental contra el virus de la fiebre aftosa¹⁸⁸. Asimismo, se han obtenido dendrímeros cíclicos del péptido RGD como potenciales agentes para dianas tumorales, sintetizándose el tripéptido RGD en fase sólida y reaccionando a continuación mediante una ligación quimioselectiva por la formación de un enlace oxima, para de este modo obtener la construcción multimérica¹⁸⁹. El tripéptido RGD también ha sido utilizado para formar este tipo de construcciones enlazando los péptidos con la cicloadición 1,3-dipolar, conocida como *Click Chemistry*^{190,191}.

La preparación de los dendrímeros cíclicos es complicada ya que, si se realiza la reacción de ciclación de forma directa sobre el núcleo de la construcción ramificada se producen reacciones secundarias inter- e intra-cadenas. En el caso de la formación de MAPs, estas reacciones secundarias no pueden minimizarse con elevadas diluciones. Además, la unión convergente de los péptidos cíclicos, previamente formados, al núcleo del MAP tiene la limitación de la insolubilidad de los precursores protegidos. Como consecuencia, se han desarrollado alternativas sintéticas basadas en el enlace de los precursores desprotegidos al núcleo del dendrímero propiamente funcionalizado¹⁹². Una de estas estrategias sintéticas es la formación previa de los péptidos cíclicos mediante la reacción intramolecular quimioselectiva conocida como Ligación Química Nativa, introducida por Kent *et al.*¹⁹³ Consiste en una reacción espontánea entre el grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína y un tioéster, para finalmente formar un enlace amida como resultado de una transferencia *S,N*-acilo. Esta reacción puede ocurrir tanto de forma intermolecular, lo que permite unir dos o más segmentos peptídicos

desprotegidos¹⁹⁴⁻¹⁹⁶; como de manera intramolecular¹⁹⁷, dando lugar a una ciclación de tipo cabeza-cola.

En esta tesis, se utilizó esta metodología de síntesis para llevar a cabo la ciclación de los péptidos. Se incorporó un residuo de cisteína en el extremo amino-terminal de cada secuencia peptídica y se derivatizó el extremo carboxilo-terminal formando un tioéster. Posteriormente, tras la conjugación de estos monómeros cíclicos al núcleo del MAP funcionalizado, se obtuvieron las moléculas ramificadas objeto del posterior estudio antigénico.

2.2.2.1. Obtención de péptidos cíclicos

Los péptidos cíclicos han demostrado ser una aproximación útil en el desarrollo de péptidos con utilidad diagnóstica y terapéutica. También, se han utilizado como inmunógenos sintéticos^{198, 199}, ya que la ciclación da lugar a una reducción de la libertad conformacional respecto a su precursor lineal, favoreciendo en muchos casos la afinidad de unión a su receptor. Esta restricción de la movilidad en ocasiones mejora su reactividad frente a anticuerpos, ya que puede conseguirse una mimetización antigénica más eficaz en comparación con sus correspondientes versiones lineales²⁰⁰. Además, la ciclación de péptidos puede incluso aumentar la estabilidad de las secuencias frente a la proteólisis²⁰¹.

Como se ha mencionado anteriormente, la ciclación de los péptidos desprotegidos, es decir, una vez eliminados los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos, se llevó a cabo mediante la reacción quimioselectiva intramolecular conocida como Ligación Química Nativa. Se trata de una reacción de transtioesterificación reversible en la que se produce un ataque nucleofílico por parte del grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína, introducido en el extremo N-terminal del segmento peptídico, al grupo tioéster de otro segmento peptídico (o del extremo C-terminal, en este caso). En primer lugar, se forma un intermedio inestable y seguidamente se produce una ordenación espontánea entre el S y el N que, tras la reacción de transtioesterificación, se encuentran en proximidad. De esta manera, tiene lugar la formación de un enlace amida y como consecuencia la obtención del péptido cíclico.

Según se describe en la literatura²⁰², esta reacción es muy eficiente en un ambiente reductor y nucleofílico que contenga tris(carboxietil)fosfina (TCEP), que actúa como reductor de puentes disulfuro evitando la formación de dímeros²⁰³ y cataliza el intercambio tiol-tioéster. Por otro

lado, se ha descrito que la presencia de un alquiltiol en el medio de reacción cataliza también la reacción de ciclación²⁰².

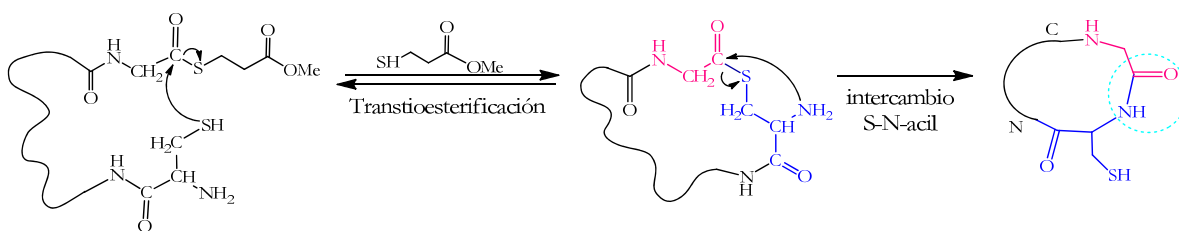


Figura 2.26. Mecanismo de reacción de la ciclación mediante Ligación Química Nativa.

Con la finalidad de obtener péptidos cíclicos del tipo cabeza-cola que contuvieran un grupo sulfhidrilo, el cual permitiera su unión a los núcleos de lisinas funcionalizados, se llevó a cabo la síntesis en fase sólida de los péptidos LP1_{E2}, LP2_{E2}, LP3_{E2} y NS4a(27-43) utilizando la resina Cl-trt, tal y como se indica en los apartados 4.1-4.4 de Materiales y métodos. De esta manera, se obtuvieron los péptidos lineales totalmente protegidos excepto en su extremo carboxilo terminal, lo que permitió funcionalizarlos convenientemente para la posterior reacción de Ligación Química Nativa intramolecular, como se indica en los apartados 4.5-4.8 de Materiales y métodos. El esquema seguido se indica en la figura 2.27.

Se añadió al extremo N-terminal de cada secuencia un residuo de cisteína, protegido en su extremo N α con un grupo Boc y en la cadena lateral con el grupo tritilo. Una vez sintetizada la secuencia, se trató la resina con 1% de TFA en DCM, separándose el péptido de la resina manteniéndose protegidos los grupos funcionales de las cadenas laterales de los aminoácidos. Dada la dificultad de caracterizar los péptidos protegidos, debido a su insolubilidad, se caracterizaron los péptidos totalmente desprotegidos, tanto por HPLC analítico como por espectrometría de masas UPLC-MS (tabla 2.2; figura A.9-A.12 del apartado A.4 del Anexo). Las masas experimentales se calcularon como la mediana de la masa obtenida para cada relación masa/carga, a partir del correspondiente espectro de ES⁺.

Posteriormente, se funcionalizó el extremo C-terminal con el éster 3-mercaptopropanoato de metilo con el fin de obtener un enlace tioéster. Esta derivatización y la reacción de ciclación se pusieron a punto con la tiolamida 3-mercaptopropanamida, molécula no comercial sintetizada en colaboración con el Prof. Weng C. Chan, en el *Centre for Biomolecular Science* de la Universidad

de Nottingham en Reino Unido, tal y como se detalla en el apartado A.3 del Anexo y en el apartado 3.7.1 de Materiales y métodos.

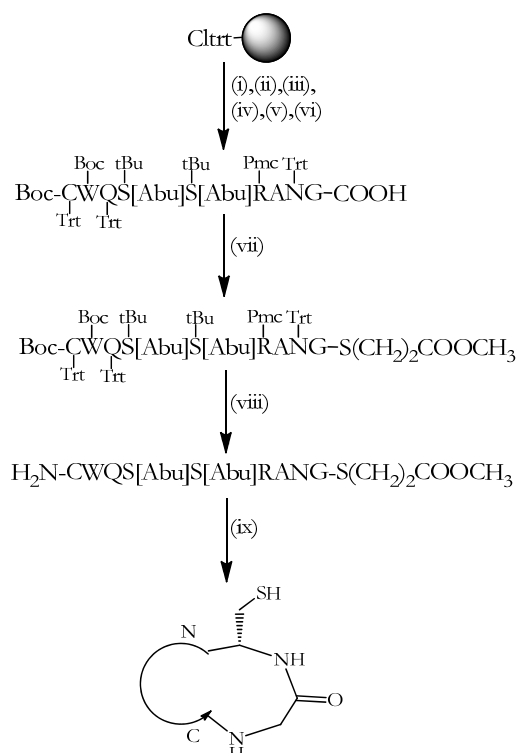


Figura 2.27. Esquema de síntesis de los péptidos cíclicos.

CONDICIONES: (i) Fmoc-Gly-OH, DIEA, CH_2Cl_2 1h; (ii) DCM:MeOH:DIEA (17:2:1); (iii) 20% piperidina/DMF; (iv) síntesis en fase sólida (SPPS); (v) Boc-Cys(trt)-OH, HATU, DIEA, 30 min; (vi) 1% TFA/ CH_2Cl_2 , 20 min (vii) $\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{COOCH}_3$, WSCDI, HOBT en DMF, 24h, 4°C; (viii) TFA/ H_2O /TIS, 3 h; (ix) 0,2 M Na_2HPO_4 /0,1M ácido cítrico (pH 7.5), TCEP, $\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{COOCH}_3$, 48 h.

Tabla 2.2. Caracterización de los péptidos lineales mediante UPLC-MS.

Péptido	Secuencia primaria	Masa calc.	Masa exp.
Cys-NS4a(27-43)	CTDWDVKGGGSPLYRHGDG	2020,1	2019,9
Cys-LP1 _{E2}	CGSRPFEPGLTWQS[Abu]S[Abu]RANG	2219,1	2219,4
Cys-LP2 _{E2}	CFEPGLTWQS[Abu]S[Abu]RANG	1821,8	1822,1
Cys-LP3 _{E2}	CWQS[Abu]S[Abu]RANG	1177,5	1177,7

La reacción de tioesterificación del extremo carboxilo terminal se realizó utilizando carbodiimida soluble en agua (WSCDI) y HOBt como activadores, siguiendo el procedimiento del apartado 3.7.2 de Materiales y métodos. Finalizada la reacción, se aislaron los péptidos lineales derivatizados como tioéster en el extremo carboxilo terminal y se caracterizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF (figura A.13, apado. A.5 del Anexo).

Se eliminaron los grupos protectores presentes en el péptido y seguidamente, se llevó a cabo la reacción de ciclación en medio tamponado a pH 7,5 en presencia de 3-mercaptopropanamida o de 3-mercaptopropanoato de metilo, en función del reactivo utilizado en la reacción de tioesterificación anterior.

La reacción de Ligación Química Nativa se siguió mediante HPLC analítico. El producto final obtenido en cada caso se caracterizó mediante UPLC-MS y se purificó por HPLC semipreparativo. En la figura 2.28, se muestra el progreso de la reacción de ciclación del péptido Cys-LP1_{E2} monitorizado por HPLC a tiempo inicial y tras 24 horas de reacción, observándose un cambio en el tiempo de retención tras la ciclación del péptido lineal. Los rendimientos obtenidos tras la purificación, así como las masas calculadas y experimentales, se muestran en la tabla 2.3. Por otro lado, la caracterización de los péptidos cíclicos mediante HPLC y ES⁺ se ilustra en las figuras 2.29-2.32.

Tabla 2.3. Caracterización de los péptidos cíclicos mediante espectrometría de masas (ES⁺). R(%), rendimiento obtenido tras la purificación

Péptido	Secuencia primaria	Masa calc.	Masa exp.	R(%)
Cyc-HT-CysNS4a(27-43)	CTDWDVKGGGSPLYRHGDG	2002,1	2002,7	23
Cyc-HT-CysE2(7-26) (CP1)	CGSRPFEPGLTWQS[Abu]S[Abu]RANG	2201,0	2201,1	21
Cyc-HT-CysE2(11-26) (CP2)	CFEPGLTWQS[Abu]S[Abu]RANG	1805,0	1804,8	17
Cyc-HT-CysE2(17-26) (CP3)	CWQS[Abu]S[Abu]RANG	1159,5	1159,6	26

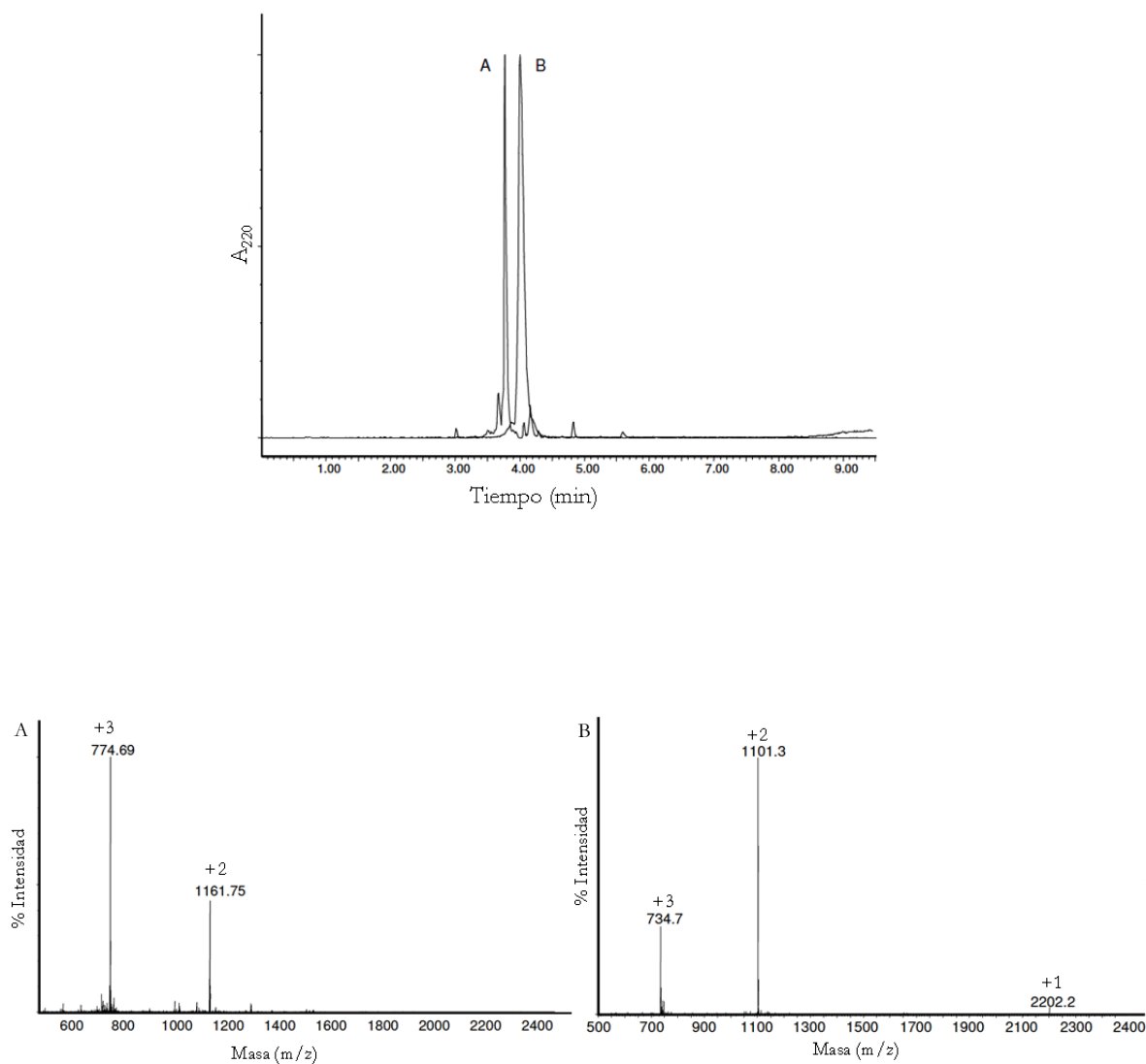


Figura 2.28. Espectro de UPLC-MS del progreso de la reacción de ciclación del péptido E2(7-26) (Cys-LP1_{E2}). Columna fase reversa ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 100 mm) 1,7 μ m, gradiente lineal de 95% a 5% de A en 10 minutos, flujo de 0,3 ml/min, detección 220 nm. (A: H₂O con 20 mM HCOOH; B: ACN con 20 mM HCOOH). A) Cys-E2(7-26)-SCH₂CH₂COOCH₃, t_R = 3,78 min, masa calculada: 2321,1 g/mol, masa experimental: 2321,3 g/mol; B) E2(7-26) cíclico (CP1), t_R = 4,00 min, masa calculada: 2201,0 g/mol, masa experimental: 2201,1 g/mol.

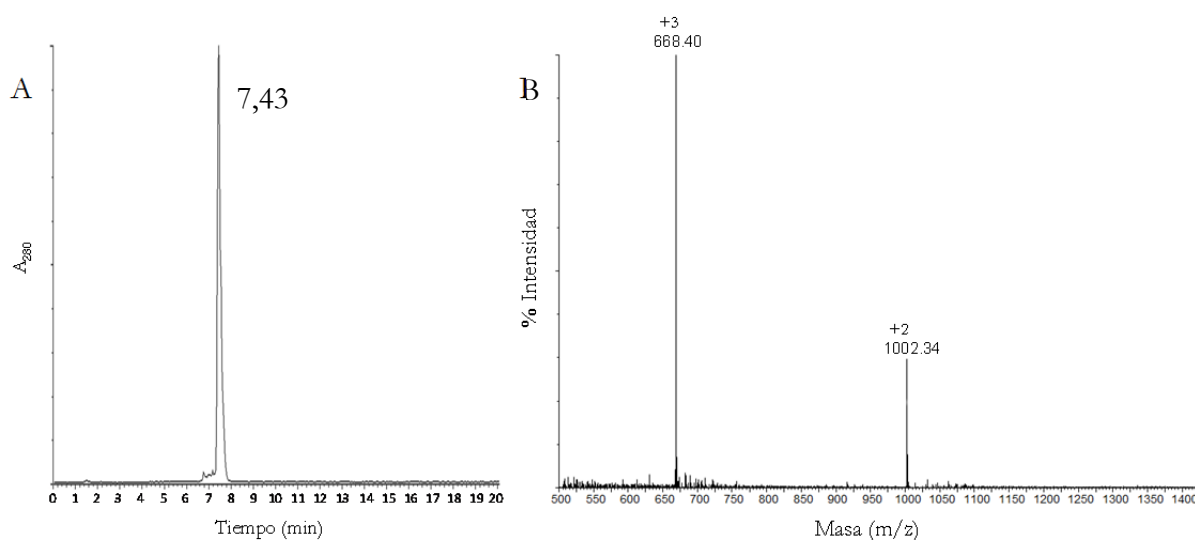


Figura 2.29. A) Espectro de HPLC del péptido Cyc-HT-CysNS4a(27-43). Columna fase reversa Kromasil C₁₈ (250 x 4,6 mm) 5 μm, gradiente lineal de 95% a 5% de A en 20 minutos, flujo de 1 ml/min, detección 220 nm. A: H₂O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA); t_R = 7,43 min. B) Espectro de masas (ES+). Masa calculada: 2002,1 g/mol; masa experimental: 2002,7 g/mol.

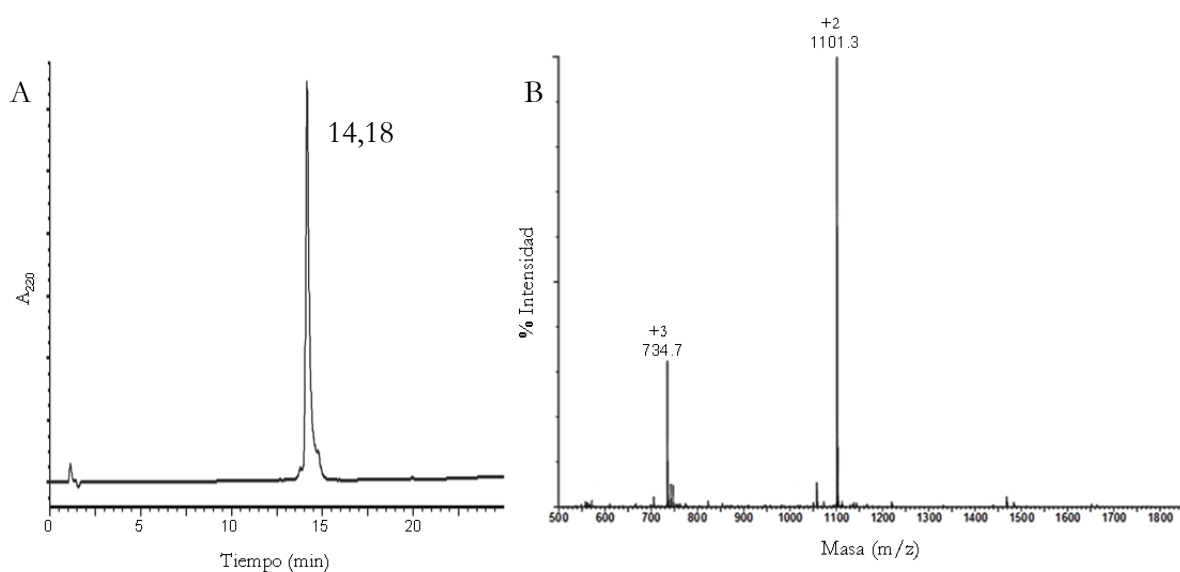


Figura 2.30. A) Espectro de HPLC el péptido CP1. Columna fase reversa Kromasil C₁₈ (250 x 4,6 mm) 5 μm, gradiente lineal de 95% a 5% de A en 25 minutos, flujo de 1 ml/min, detección 220 nm (A: H₂O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA); t_R = 14,18 min. B) Espectro de masas (ES+). Masa calculada: 2201,0 g/mol; masa experimental: 2201,0 g/mol.

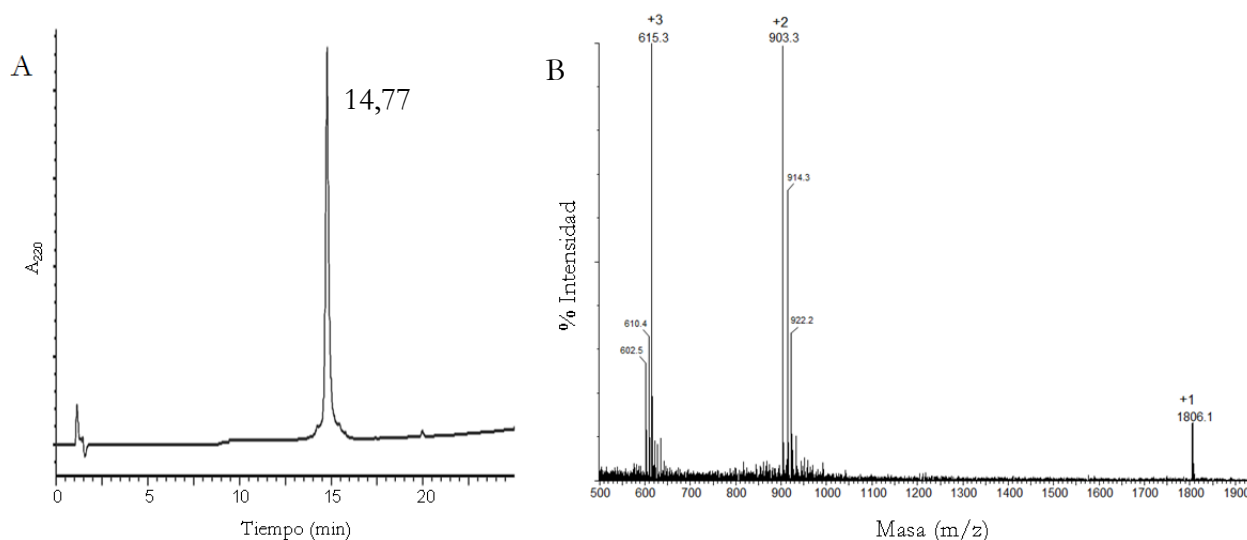


Figura 2.31. A) Espectro de HPLC del péptido CP2. Columna fase reversa Kromasil C_{18} (250 x 4,6 mm) 5 μ m, gradiente lineal de 95% a 5% de A en 25 minutos, flujo de 1 ml/min, detección 220 nm (A: H_2O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA); $t_R = 14,77$ min. B) Espectro de masas (ES+). Masa calculada: 1805,0 g/mol; masa experimental: 1804,8 g/mol.

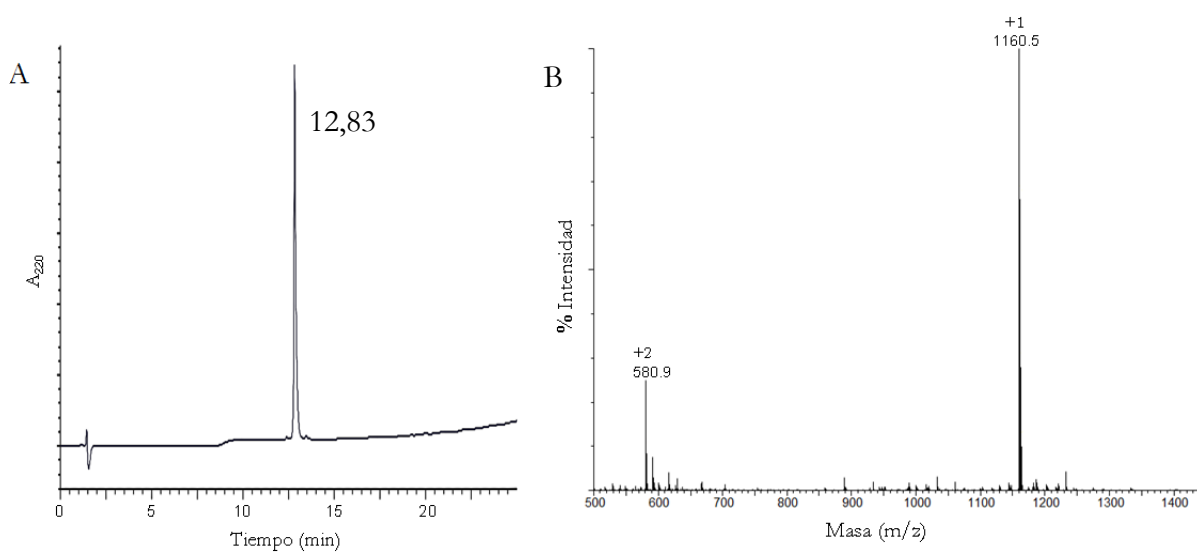


Figura 2.32. A) Espectro de HPLC del péptido CP3. Columna fase reversa Kromasil C_{18} (250 x 4,6 mm) 5 μ m, gradiente lineal de 95% a 5% de A en 25 minutos, flujo de 1 ml/min, detección 220 nm (A: H_2O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA); $t_R = 12,83$ min. B) Espectro de masas (ES+). Masa calculada: 1159,5 g/mol; masa experimental: 1159,6 g/mol.

2.2.2.2. Síntesis de péptidos ramificados de tipo lineal-cíclico

Los péptidos ramificados de tipo lineal-cíclico constan de dos cadenas lineales sintetizadas en fase sólida sobre el extremo $N\alpha$ del núcleo de lisinas y dos secuencias peptídicas cíclicas sintetizadas paralelamente, que se unirían a los extremos $N'\epsilon$ del núcleo de lisinas mediante una reacción de tioeterificación en solución. En la figura 2.33 se muestra el esquema de síntesis.

a) Síntesis del MAP dimérico derivatizado con ácido cloroacético.

En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis del núcleo tetramérico siguiendo la metodología indicada en el apartado 4.10 de Materiales y métodos. Sobre el extremo $N\alpha$, se sintetizaron simultáneamente dos cadenas correspondientes a la secuencia peptídica E2(7-26), incorporando el último aminoácido protegido en su extremo $N\alpha$ con el grupo Boc. Posteriormente, se separó el MAP dimérico de la resina a partir de una alícuota de peptidil-resina, eliminando simultáneamente los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos y el grupo Boc de los extremos $N\alpha$, y se analizó tanto por HPLC analítico como por espectrometría de masas. El crudo peptídico se obtuvo con un rendimiento del 83%.

Una vez controlada la síntesis del MAP dimérico, se procedió a la eliminación del grupo ivDde con 2% de hidracina en DMF. La eliminación total de este grupo protector se controló mediante la caracterización del MAP dimérico por UPLC-MS tras desanclar una pequeña porción de peptidil-resina. Finalmente, se llevó a cabo la derivatización del extremo $N'\epsilon$ con ácido cloroacético en presencia de los activadores HATU/DIEA y se separó el péptido de la resina en presencia de TFA, eliminando simultáneamente los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos y el grupo Boc de los extremos $N\alpha$. El MAP dimérico derivatizado, MAP[E2(7-26)₂(COCH₂Cl)₂], se analizó tanto por HPLC analítico como por espectrometría de masas MALDI-TOF y ES⁺ (figura 2.34). La masa experimental a partir del espectro de masas ES⁺ se calculó de igual manera que en casos anteriores. La diferencia existente entre la masa experimental determinada mediante MALDI-TOF y la calculada se encuentra dentro de lo esperado, ya que la medida se realizó con el método lineal de tiempo de vuelo.

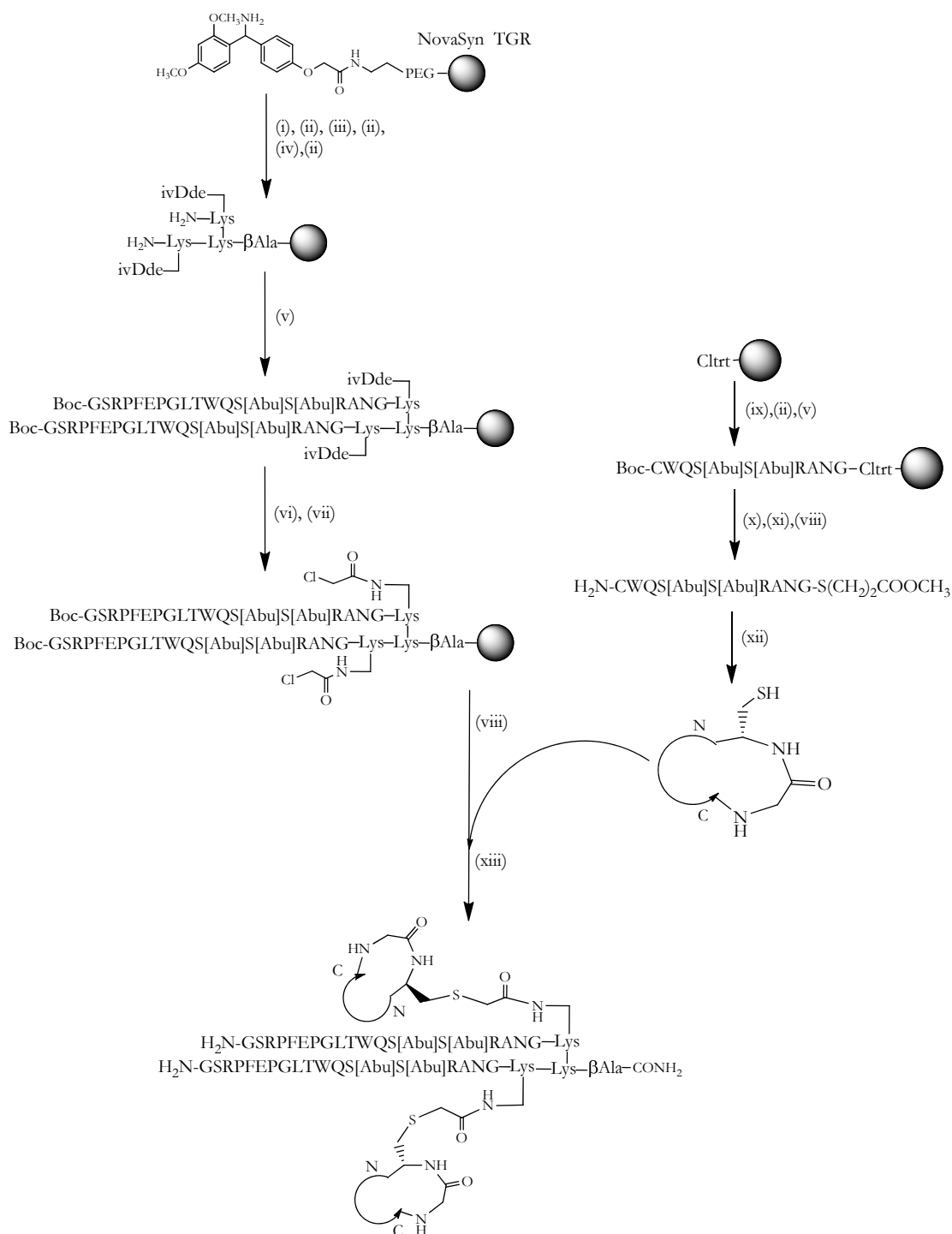


Figura 2.33. Esquema de síntesis del MAP tetramérico de tipo lineal-cíclico.

CONDICIONES: (i) Fmoc-βAla-OH, HATU, DIEA en DMF, 30 min; (ii) 20% piperidina/DMF; (iii), Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, HATU, DIEA en DMF, 30 min; (iv) Fmoc-Lys(ivDde)-OH, HATU, DIEA en DMF, 30 min; (v) síntesis en fase sólida (SPPS); (vi) 2% NH₂ NH₂/DMF, 20 min; (vii) Cl-CH₂COOH, HATU, DIEA en DMF, 30 min; (viii) TFA/H₂O/TIS, 3 h; (ix) Fmoc-Gly-OH, DIEA, CH₂Cl₂ 1h; (x) 1% TFA/CH₂Cl₂, 20 min; (xi) HS(CH₂)₂COOCH₃, WSCDI, HOBT en DMF, 24h, 4°C; (xii) 0,2 M Na₂HPO₄/0,1M ácido cítrico (pH 7.5), TCEP, HS(CH₂)₂COOCH₃, 48 h; (xiii) 0,2M Tris/ 2M Guan·Cl o 0,2M Na₂HPO₄/0,01M EDTA en DMF, Ar.

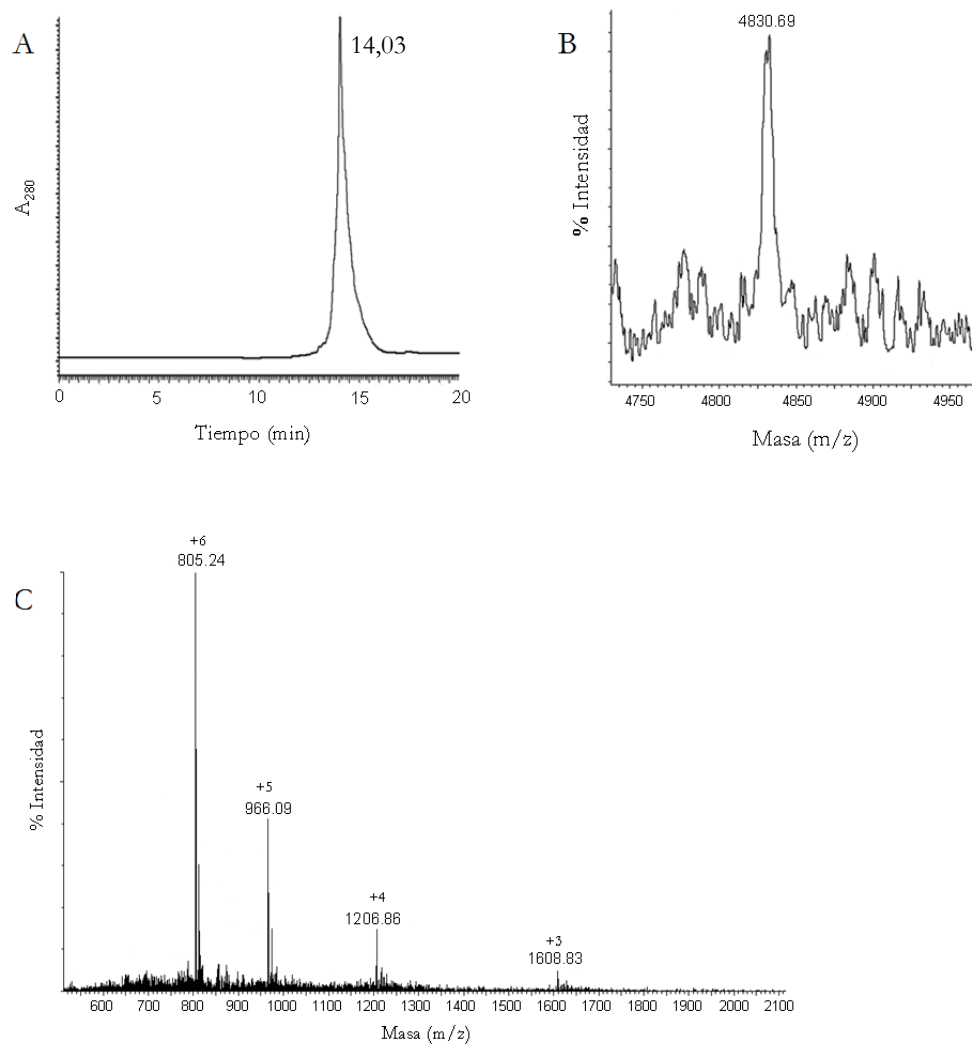


Figura 2.34. A) Espectro de HPLC del MAP[E2(7-26)₂,(COCH₂Cl)₂]. Columna fase reversa Poroshell 300-SB C₁₈ (2,1 x 75 mm) 5 μ m, gradiente lineal de 95% a 5% de A en 20 minutos, flujo de 1 ml/min, detección 280 nm (A: H₂O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA); t_R = 14,03 min. B) Espectro de masas MALDI-TOF del péptido purificado. Matriz HCCA, método lineal positivo. Masa calculada = 4824,4 g/mol; masa experimental = 4824,5 g/mol.

b) Reacción de tioeterificación.

Se procedió a la unión de los péptidos cíclicos a los extremos N^ε del MAP dimérico mediante la formación de un enlace tioéter con la finalidad de obtener el MAP tetramérico de tipo lineal-cíclico.

La reacción de tioeterificación se llevó a cabo con los péptidos Cyc-HT-CysNS4a(27-43), Cyc-HT-CysE2(7-26) (CP1) y Cyc-HT-CysE2(17-26) (CP3) en dos medios tamponados (apdo. 3.9 de Materiales y métodos). En primer lugar, las condiciones de reacción ensayadas fueron tampón 0,2 M Na₂HPO₄/0,01 M EDTA, pH 7,5, en presencia de DMF y atmósfera inerte¹⁹⁷. En todos los casos, la reacción se monitorizó mediante HPLC analítico. Sin embargo, no fue posible la identificación de ninguno de los MAPs de tipo lineal-cíclico mediante espectrometría de masas, siendo los productos mayoritarios de la reacción los dímeros obtenidos por formación de puentes disulfuro entre los péptidos cíclicos correspondientes en cada caso.

Con el fin de evitar estos problemas, se llevó a cabo la reacción en otro medio tamponado incluyendo agentes caotrópicos (0,2 M Tris/ 2 M Guanidinio·Cl^{204, 205}, pH 7,6)^{204, 205}, como el cloruro de guanidinio, que previene la agregación y favorece la reacción de sustitución, según se ha descrito en la bibliografía^{206, 207}. No obstante, en este caso, tampoco se obtuvieron los resultados deseados, siendo de nuevo mayoritaria la formación de dímeros, posiblemente debido a impedimentos estéricos entre las cadenas lineales y los ciclos, ambos de elevado tamaño. Además, el posible plegamiento de las cadenas lineales del MAP dimérico, podría disminuir la accesibilidad de los extremos N^ε del núcleo de lisinas, impidiéndose así la unión entre las moléculas peptídicas.

Considerando estos resultados, se sintetizaron MAPs tetraméricos cíclicos a partir de la unión entre el núcleo de lisinas tetracloroacetilado en sus grupos amino y los péptidos cíclicos empleando esta misma reacción de tioeterificación. De esta forma, se podrían eliminar los impedimentos estéricos en los extremos N^ε del núcleo de oligolisinas debidos a las cadenas peptídicas lineales situadas en los extremos N^α del MAP dimérico, quedando ahora los cuatro grupos amino derivatizados del núcleo igualmente accesibles a la unión de los péptidos cíclicos¹⁹⁷ (apdo. 2.2.2.3).

Por otro lado, los impedimentos estéricos en los extremos N^ε podrían también minimizarse mediante la incorporación de un espaciador en dicho núcleo de lisinas, lo que aumentaría la

flexibilidad global del péptido ramificado^{204, 208}. Ejemplos de espaciadores son el ácido 6-aminohexanoico (Ahx) o el ácido 3,6-dioxaoctanoico (O₂Oc), que además aumentaría la solubilidad en medio acuoso de la construcción sintética²⁰⁹.

2.2.2.3. Péptidos ramificados de tipo cíclico homogéneos

La síntesis de los péptidos ramificados de tipo cíclico se llevó a cabo partiendo del núcleo de lisinas derivatizado con ácido cloroacético tanto en sus extremos N α como N' ϵ , y su posterior reacción con cada uno de los diferentes péptidos cíclicos previamente obtenidos y descritos en el apartado 2.2.2.1, derivados del extremo N-terminal de la proteína de envoltura E2 del GBV-C: Cyc-HT-CysE2(7-26) (CP1), Cyc-HT-CysE2(11-26) (CP2), Cyc-HT-CysE2(17-26) (CP3). En la figura 2.35 se muestra el esquema de síntesis.

Una vez sintetizado el núcleo de lisinas derivatizado (tabla 2.4, figura 2.36), como se indica en el apartado 4.14.1 de Materiales y métodos, se llevó a cabo la reacción de tioeterificación utilizando tres medios de reacción diferentes y los péptidos cíclicos CP1, CP2 y CP3, con el fin de encontrar unas condiciones óptimas de reacción (apdo. 3.9 de Materiales y métodos). Las reacciones se monitorizaron mediante HPLC analítico.

En primer lugar, se ensayó la reacción con los tres péptidos cíclicos siguiendo el protocolo especificado por L. Zhang y J.P. Tam¹⁹⁷, es decir, en medio tamponado Na₂HPO₄/EDTA, pH 7,5, en presencia de DMF, para favorecer la solubilidad del péptido, y en atmósfera inerte. Tras purificar los productos obtenidos mediante HPLC semipreparativo y analizarlos mediante UPLC-MS y MALDI-TOF (figuras 2.37) no se observó la presencia de los MAPs tetraméricos deseados sino únicamente aquéllos constituidos por una o dos copias de los ciclos. El producto mayoritario encontrado fue el dímero del péptido cíclico correspondiente en cada caso, formado mediante puente disulfuro. A pesar de repetir la reacción aumentando el tiempo de reacción de 48 a 72 horas, los resultados no variaron.

De esta manera, se llevó a cabo la reacción empleando únicamente medio orgánico, disolviendo así los péptidos en DMF anhidro²¹⁰ y en presencia del catalizador yoduro de tetrabutilamonio (TBAI)^{211, 212} (figuras 2.37). Los productos de reacción se purificaron mediante HPLC semipreparativo y caracterizaron mediante UPLC-MS y MALDI-TOF, identificándose el MAP tetramérico con cuatro copias del péptido CP3, correspondiente a la secuencia peptídica E2(17-

26) de la proteína de envoltura E2 del GBV-C. Sin embargo, la reacción no fue cuantitativa, obteniéndose un crudo peptídico complejo donde nuevamente el producto mayoritario fue el dímero del ciclo formado mediante puente disulfuro, junto con diferentes moléculas ramificadas correspondientes a la unión de uno, dos y tres péptidos cíclicos al núcleo de lisinas (MAP_{CP3-1}, MAP_{CP3-2} y MAP_{CP3-3}, respectivamente). La formación del MAP tetramérico no se observó en el caso de los ciclos de mayor tamaño CP1 y CP2, aún aumentando los tiempos de reacción, obteniéndose en ambos casos únicamente los péptidos ramificados con una o dos copias de los ciclos correspondientes.

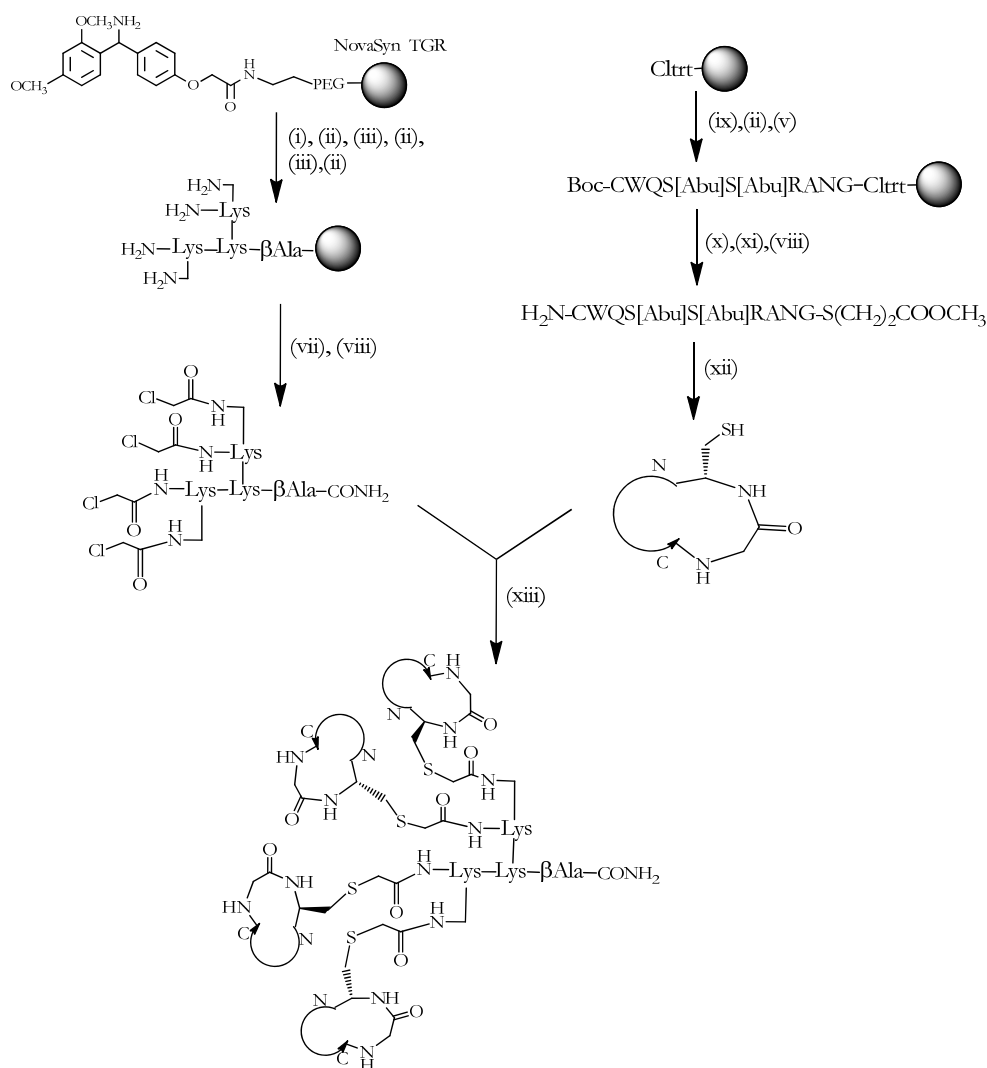


Figura 2.35. Esquema de síntesis del MAP tetramérico de tipo lineal-cíclico.

CONDICIONES: (i) Fmoc-βAla-OH, HATU, DIEA en DMF, 30 min; (ii) 20% piperidina/DMF; (iii), Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, HATU, DIEA en DMF, 30 min; (v) síntesis en fase sólida (SPPS); (vii) Cl-CH₂COOH, HATU, DIEA en DMF, 30 min; (viii) TFA/H₂O/TIS, 3 h; (ix) Fmoc-Gly-OH, DIEA, CH₂Cl₂ 1h; (x) 1% TFA/CH₂Cl₂, 20min; (xi) HS(CH₂)₂COOCH₃, WSCDI, HOBT en DMF, 24h, 4°C; (xii) 0,2 M Na₂HPO₄/0,1M ácido cítrico (pH 7.5), TCEP, HS(CH₂)₂COOCH₃, 48 h; (xiii) Tris-HCl, pH 8,2, N₂²¹³.

Tabla 2.4. Rendimiento (R%) y masa experimental y calculada del núcleo de lisinas derivatizado.

Péptido	Secuencia primaria	Masa calc.	Masa exp.	R%
Núcleo de lisinas	$(\text{ClCH}_2\text{CO})_4(\text{K})_2\text{K}-\beta\text{A}$	778,5	778,3	78

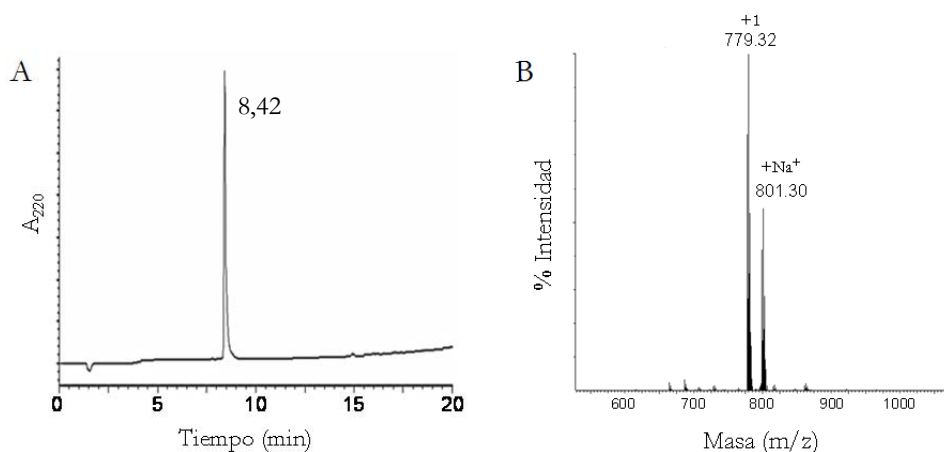


Figura 2.36. A) Espectro de HPLC del núcleo de lisinas derivatizado con ácido cloroacético. Columna fase reversa Kromasil C_{18} (250 x 4,6 mm) 5 μm , gradiente lineal de 95% a 5% de A en 20 minutos, flujo de 1 ml/min, detección 220 nm (A: H_2O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA); $t_R = 8,42$ min. B) Espectro de masas (ES^+). Masa calculada = 778,5 g/mol; masa experimental = 778,3 g/mol.

Con el fin de mejorar la reacción de tioeterificación, ésta se ensayó teniendo en cuenta las condiciones propuestas por G. Mezö^{213, 214}, en medio tamponado 0,1M Tris-HCl, pH 8,2 en atmósfera inerte (apdos 3.9 y 4.14.2 de Materiales y métodos). En primer lugar, se disolvió el núcleo de lisinas en el tampón, y posteriormente se fueron añadiendo pequeñas alícuotas de péptido cíclico en estado sólido, con el fin de evitar la formación de puentes disulfuro. Esta reacción se repitió con todos los ciclos, se monitorizó por HPLC y MALDI-TOF, y se finalizó acidificando el medio con TFA hasta un $\text{pH} \sim 3$. De nuevo, en el caso de las reacciones llevadas a cabo con los péptidos CP1 y CP2, de mayor tamaño, se obtuvieron sólo los MAPs con una y dos copias del ciclo correspondiente (figuras 2.37-2.39), junto con los péptidos cíclicos dimerizados. Únicamente en el caso de la reacción entre el núcleo de lisinas y el ciclo CP3, se identificó el $\text{MAP}_{\text{CP3-4}}$ que contenía cuatro copias del péptido cíclico (figura 2.37). En la figura 2.40, se muestran los espectros de MALDI-TOF y ES^+ de los MAPs con diferentes copias del péptido CP3. Las masas experimentales indicadas se calcularon como la mediana de la masa

obtenida para cada relación masa/carga, a partir del correspondiente espectro de ES⁺. En la tabla 2.5, se resumen los tipos de MAPs encontrados con cada tipo de ciclo, junto con su masa teórica y experimental según los espectros de masas MALDI-TOF.

Tabla 2.5. Masas experimentales y calculadas para cada uno de los MAPs obtenidos mediante MALDI-TOF (matriz SA, método LP).

MAP cíclico	Tipo de MAP	Masa calculada	Masa encontrada
MAP ₄ (17-26)	MAP _{CP3-1}	1903,34	1903,12
	MAP _{CP3-2}	3027,14	3027,93
	MAP _{CP3-3}	4150,94	4150,97
	MAP _{CP3-4}	5274,42	5276,93
MAP ₄ (11-26)	MAP _{CP2-1}	2547,07	2547,94
	MAP _{CP2-2}	4315,58	4307,07
	MAP _{CP2-3}	6084,11	-
	MAP _{CP2-4}	7852,62	-
MAP ₄ (7-26)	MAP _{CP1-1}	2944,50	2947,64
	MAP _{CP1-2}	5110,45	5113,91
	MAP _{CP1-3}	7276,40	-
	MAP _{CP1-4}	9442,34	-

Finalmente, se llevó a cabo la purificación del MAP_{CP3-4} por HPLC semipreparativo obteniéndose con una pureza de aproximadamente el 75% y presencia del MAP_{CP3-3}. Debe señalarse la dificultad de purificación de este tipo de crudos peptídicos, que presentan estructuras ramificadas con diferente número de copias de los péptidos cíclicos. De esta manera, el rendimiento de obtención del MAP_{CP3-4} fue del 8%.

Cabe destacar, que con este procedimiento de reacción, propuesto por G. Mezö^{213, 214}, en el caso del péptido CP3 se observó una menor presencia del MAP monomérico, aumentando así la formación de los MAPs con más de una copia del ciclo, como se observa al comparar los cromatogramas de las diferentes tioeterificaciones (figura 2.37). De esta manera, puede concluirse que, de los métodos de reacción empleados, éste es con el que se obtuvieron mejores resultados, disminuyéndose la formación de puentes disulfuro y favoreciendo la reacción de tioeterificación.

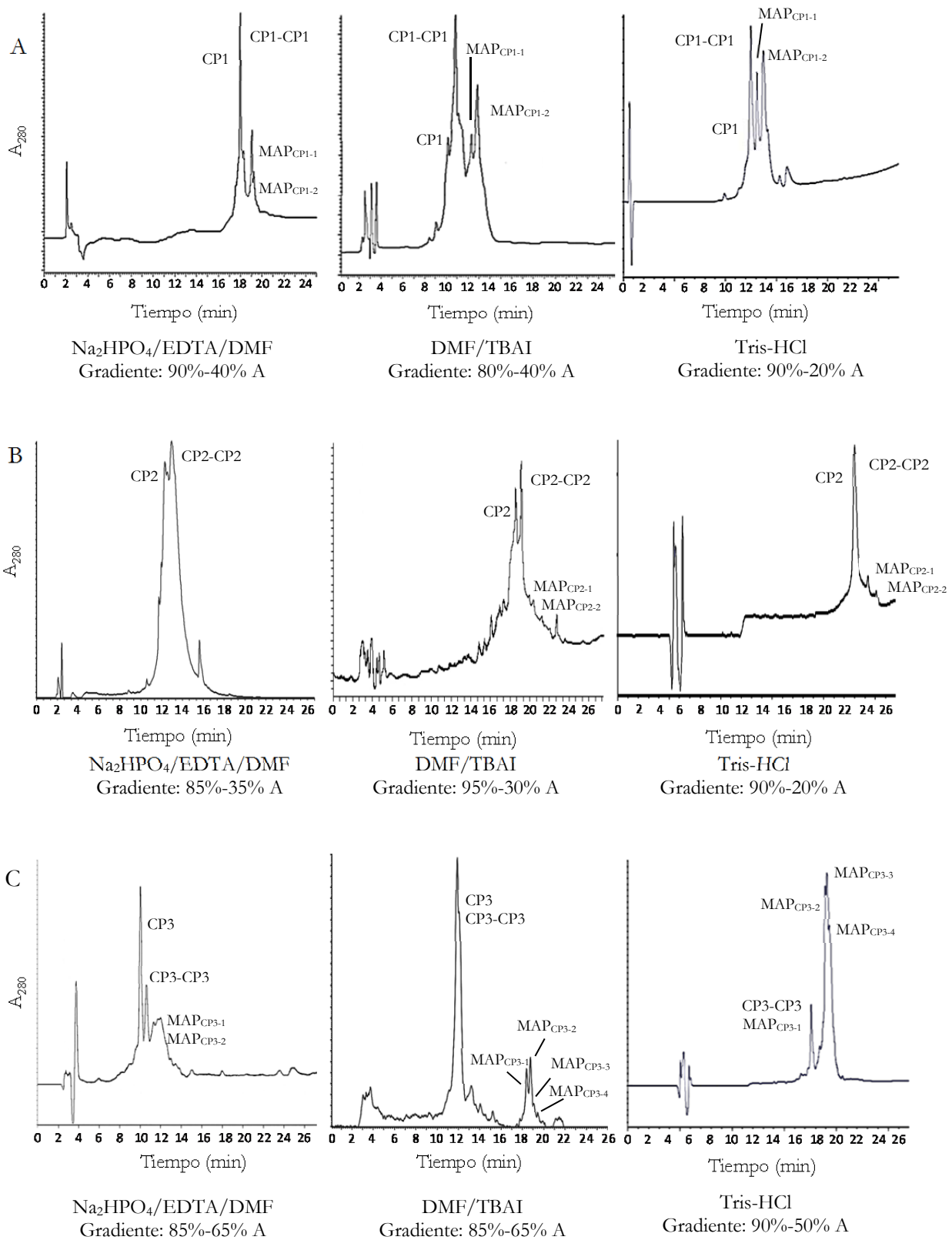


Figura 2.37. Espectros de HPLC de los crudos peptídicos MAP_{CP1} (A), MAP_{CP2} (B) y MAP_{CP3} (C) en tampón Na₂HPO₄/EDTA/DMF, en DMF/TBAI y en tampón 0,1M Tris-HCl. Condiciones HPLC: Columna fase reversa Poroshell 300-SB C₁₈ (2,1 x 75 mm) 5 μm, gradiente lineal de A en 25-27 minutos, flujo de 1 ml/min, detección 280 nm (A: H₂O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA).

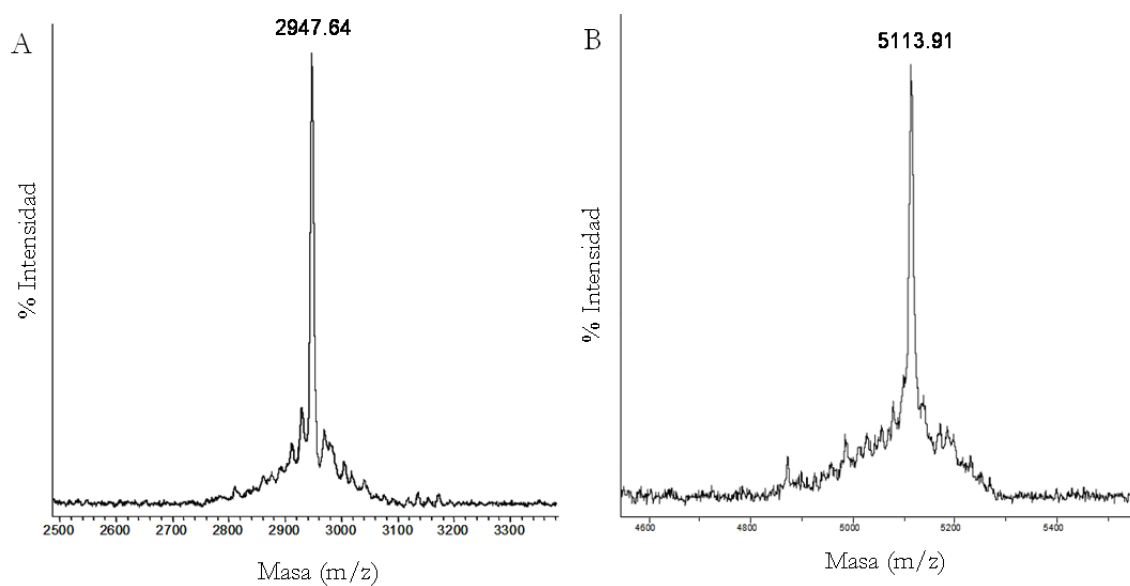


Figura 2.38. Espectros de masas (MALDI-TOF) de las construcciones MAP_{CP1-X}. A) MAP_{CP1-1}, masa calculada = 2944,50 g/mol, masa experimental = 2947,64 g/mol; B) MAP_{CP1-2}, masa calculada = 5110,45 g/mol, masa experimental = 5113,91 g/mol. Matriz SA, método LP.

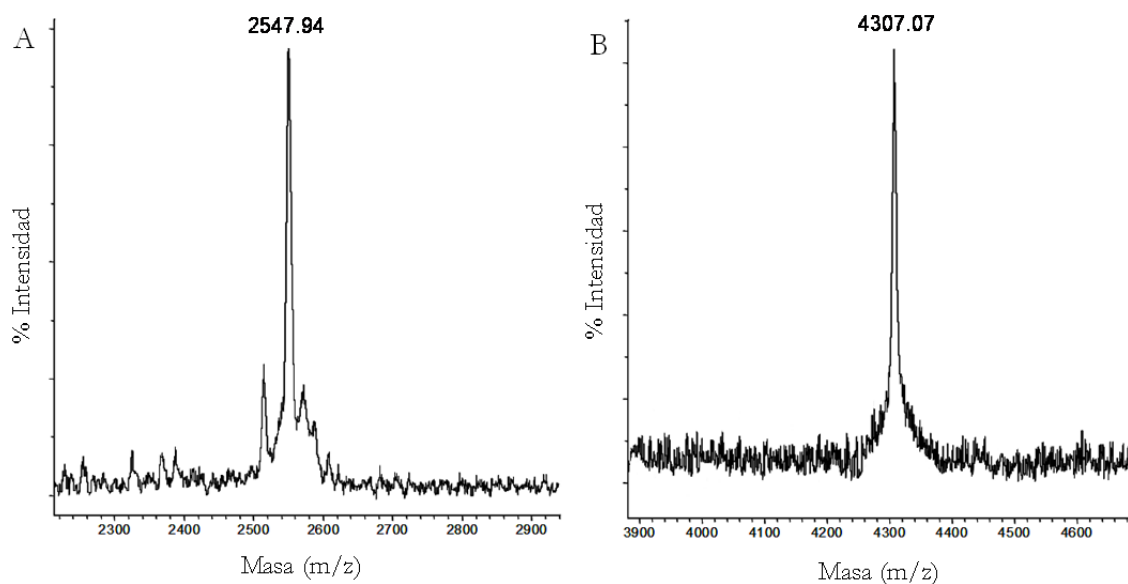


Figura 2.39. Espectros de masas (MALDI-TOF) de las construcciones MAP_{CP2-X}. A) MAP_{CP2-1}, masa calculada = 2547,07 g/mol, masa experimental = 2547,94 g/mol; B) MAP_{CP2-2}, masa calculada = 4315,58 g/mol, masa experimental = 4307,07 g/mol. Matriz SA, método LP.

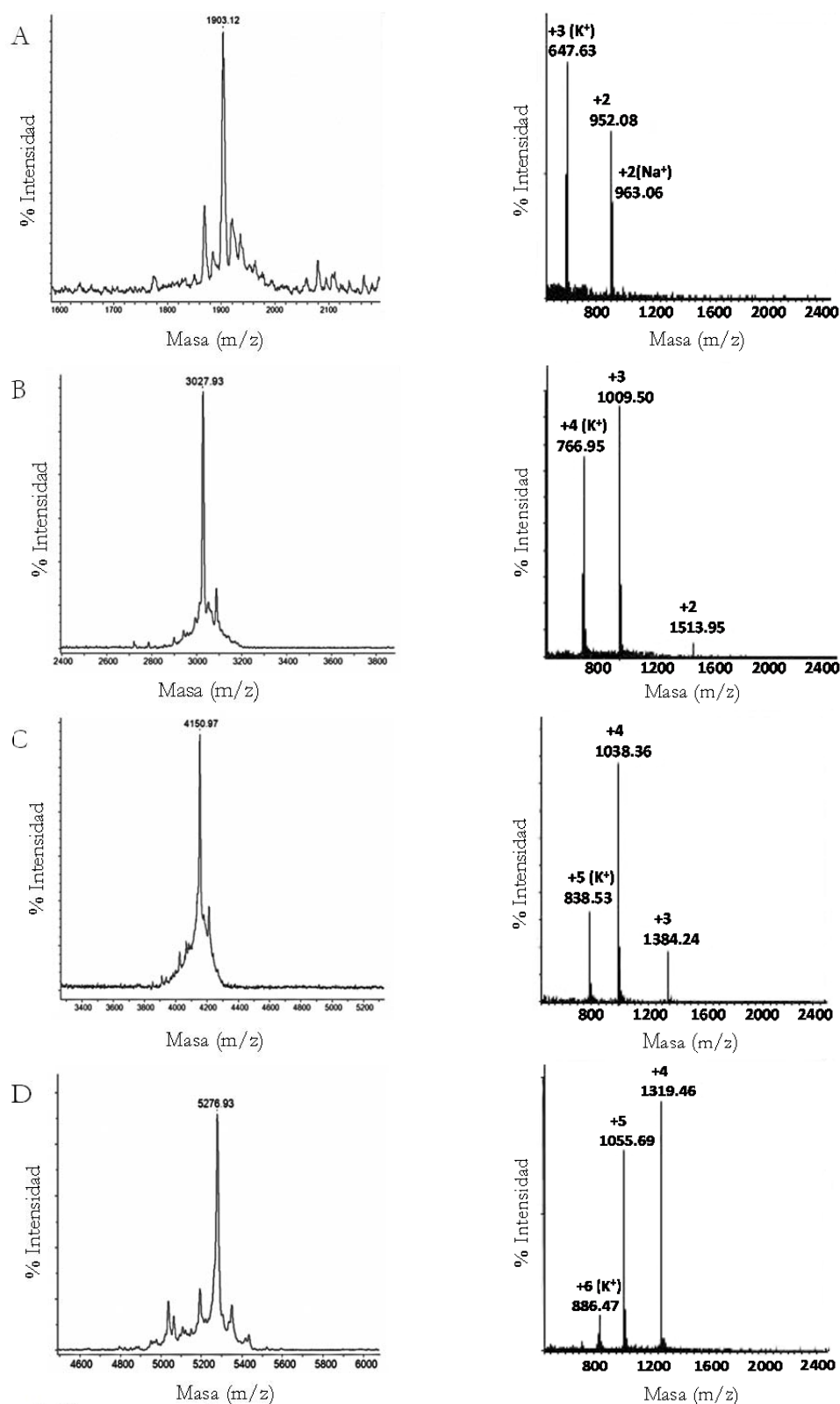


Figura 2.40. Espectros de masas MALDI-TOF y ES⁺ del MAP_{CP3-X}. A) MAP_{CP3-1}, masa calculada = 1903,34 g/mol, masa experimental = 1903,12 g/mol; B) MAP_{CP3-2}, masa calculada = 3027,14 g/mol, masa experimental = 3027,93 g/mol; C) MAP_{CP3-3}, masa calculada = 4150,94 g/mol, masa experimental = 4150,97 g/mol; D) MAP_{CP3-4}, masa calculada = 5274,42 g/mol, masa experimental = 5274,93 g/mol. Matriz SA; método LP.

Las dificultades encontradas en la síntesis de moléculas ramificadas mediante la unión en solución de los fragmentos peptídicos podrían estar relacionadas con impedimentos estéricos, como ya se apuntó en la síntesis de los MAPs de tipo lineal-cíclico (apdo. 2.2.2.2). Por lo que, de la misma manera, éstos podrían minimizarse con la incorporación de un espaciador en dicho núcleo de lisinas, como el Ahx o el O₂Oc. Dichas dificultades también han sido descritas por otros autores^{188, 204, 208}, los cuales obtuvieron perfiles heterogéneos y complicados en la síntesis de estas moléculas ramificadas.

Resumiendo, en este apartado se han sintetizado una serie de moléculas peptídicas ramificadas, lineales y cíclicas derivadas del extremo N-terminal de la proteína de envoltura E2, así como de la proteína no estructural NS4a de dicho virus.

Por un lado, se llevó a cabo la síntesis del MAP_{E2/NS4}, péptido ramificado de tipo lineal-heterogéneo con dos copias de cada una de las secuencias peptídicas E2(7-26) y NS4a(27-43). Seguidamente, se sintetizaron los MAPs homogéneos de tipo lineal con cuatro copias de los epítomos E2(7-26), E2(11-26) y E2(17-26), es decir el MAP_{LP1}, el MAP_{LP2} y el MAP_{LP3} respectivamente. Finalmente, tras probar diversas condiciones de reacción, se logró la síntesis del MAP tetramérico homogéneo de tipo cíclico, MAP_{CP3}, derivado de la región E2(17-26) de la proteína E2 del GBV-C.

Todas estas moléculas, como ya se ha indicado, se basan en un núcleo de lisinas inmunológicamente inerte. En el caso de los MAP_{E2/NS4}, MAP_{LP1}, MAP_{LP2} y MAP_{LP3}, las secuencias peptídicas se sintetizaron en fase sólida sobre dicho núcleo; y en el caso del MAP_{CP3}, se sintetizaron las secuencias peptídicas en fase sólida, se ciclaron en solución y posteriormente, se ligaron al núcleo de lisinas mediante una reacción de tioeterificación en solución.

La síntesis de los péptidos cíclicos, constó de varios pasos. En primer lugar, se sintetizaron los correspondientes péptidos lineales, que tras separarlos protegidos de la resina, se derivatizaron en su extremo C-terminal y se eliminaron los grupos protectores, para posteriormente llevar a cabo la ciclación mediante una reacción de transtioesterificación intramolecular. Esta reacción es quimioselectiva y cuantitativa, no observándose la formación de puentes disulfuro entre los péptidos lineales. Por tanto, puede decirse que es un buen método para la formación de péptidos cíclicos.

La unión de los ciclos al núcleo de lisinas se llevó a cabo en solución. Esta reacción estuvo limitada fundamentalmente por dos factores: los impedimentos estéricos y la formación de dímeros. La primera limitación era debida al tamaño de los péptidos. Dichos impedimentos estéricos podrían disminuirse incorporando espaciadores en el núcleo de lisinas. La segunda limitación, la formación de dímeros mediante puentes disulfuro, se evitó en gran medida añadiendo el ciclo a la disolución en pequeñas alícuotas en estado sólido. Otra alternativa para evitar estas dos limitaciones podría ser la unión de los ciclos mediante *Click Chemistry*, derivatizando por un lado el núcleo de lisinas con un espaciador funcionalizado con un grupo azida y por otro, los ciclos con un grupo alquino.

3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTI-VIH-1 DE LAS CONSTRUCCIONES SINTÉTICAS DERIVADAS DEL DOMINIO N-TERMINAL DE LA PROTEÍNA E2 DEL GBV-C

El ensayo de fusión celular mimetiza la entrada del VIH-1 a la célula, lo que permite seleccionar de manera rápida potenciales inhibidores de la fusión del VIH-1 sin necesidad de manipular el virus²¹⁵⁻²¹⁸.

Estos estudios se realizaron en el Servicio de Cultivos Celulares del IQAC (CSIC) con los péptidos lineales, cíclicos y MAPs derivados de las secuencias peptídicas E2(7-26), E2(11-26) y E2(17-26), descritos en los apartados 2.2.1.2 y 2.2.2. Se examinó su capacidad para inhibir la formación de sincitios⁴³ (células plurinucleadas que resultan de la fusión de varias células uninucleadas) siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 8 de Materiales y métodos.

Las líneas celulares empleadas fueron la HeLa-env (donadas por el Dr. Blanco de la Fundació IRSI Caixa), que expresan la proteína de la envoltura del VIH-1 e integran en su genoma el promotor LTR (*Long Terminal Repeats*), implicado en la replicación viral; y la línea celular TZM-bl, que expresa el receptor de membrana de los linfocitos CD4 y los correceptores CCR5 y CXCR4 e integra en su genoma los genes de las enzimas luciferasa y β -galactosidasa, que se sobreexpresan al producirse la fusión celular entre ambas líneas celulares.

3.1. ESTUDIO DE TOXICIDAD

Previamente a la realización del ensayo de fusión celular, se evaluó la citotoxicidad de los péptidos en las células HeLa-env mediante el ensayo MTT^{219, 220}, que permite determinar la viabilidad celular. Se trata de un ensayo colorimétrico basado en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, dando lugar a un compuesto coloreado derivado del formazán^{221, 222}, 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazán (figura 3.1), que permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas, siendo la cantidad de células vivas proporcional a la cantidad de formazán producido. Como consecuencia de la reacción, se

produce un cambio de coloración del amarillo al azul, que puede medirse empleando un espectrofotómetro ($\lambda = 590$ nm).

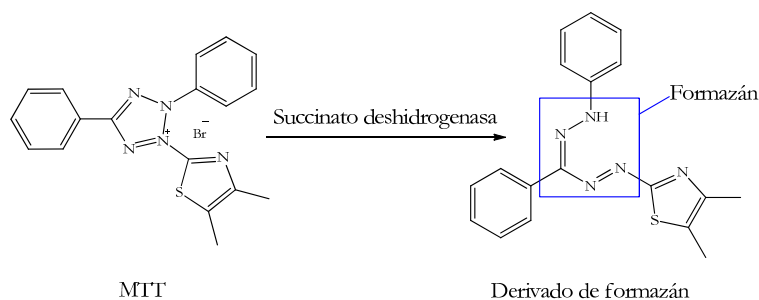


Figura 3.1. Reducción metabólica del MTT al derivado de formazán mediante la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa.

El ensayo de citotoxicidad se realizó a una concentración de péptidos de $300 \mu\text{M}$ y se compararon los valores de absorbancia a 590 nm (A_{590}) obtenidos con los valores de la absorbancia control, es decir, de las células sin péptido, no observándose toxicidad en ninguno de los péptidos monoméricos estudiados. Sin embargo, las moléculas ramificadas (MAP_{LP1} , MAP_{LP2} , MAP_{LP3} y MAP_{CP3}) precipitaron a esta concentración. Así, se repitió el ensayo a concentraciones inferiores, resultando $40 \mu\text{g/ml}$ la máxima concentración no-citotóxica determinada. Todas las medidas se realizaron por triplicado. En la figura 3.2 se muestran los resultados obtenidos a la concentración de $40 \mu\text{g/ml}$, representando la media de la A_{590} de los triplicados y la desviación estándar correspondiente en cada caso.

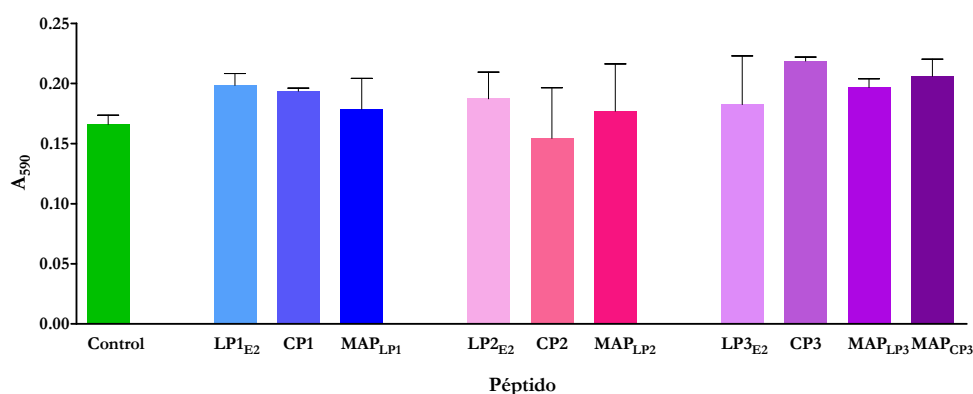


Figura 3.2. Toxicidad representada en función de la A_{590} de los péptidos estudiados a $40 \mu\text{g/ml}$ en HeLa-env tras 24 horas de incubación. Control: células sin péptido. LP1_{E2}: E2(7-26) lineal; LP2_{E2}: E2(11-26) lineal; LP3_{E2}: E2(17-26) lineal; CP1: E2(7-26) cíclico; CP2: E2(11-26) cíclico; CP3: E2(17-26) cíclico; MAP_{LP1}: MAP₄E2(7-26) lineal; MAP_{LP2}: MAP₄E2(11-26) lineal; MAP_{LP3}: MAP₄E2(17-26) lineal; MAP_{CP3}: MAP₄E2(17-26) cíclico.

3.2. ESTUDIO DE FUSIÓN CELULAR

Se estudió el efecto de los diferentes péptidos lineales, cíclicos y ramificados en los ensayos de fusión celular. Para ello, se analizó su capacidad de inhibir la fusión celular mediada por la proteína de envoltura del VIH-1, es decir, su capacidad para bloquear la formación de sincitios entre las células HeLa-env y las células T_{ZM}-bl, a diferentes concentraciones de péptido, determinando, para ello, la actividad de la β -galactosidasa. Como control positivo del ensayo se utilizó el péptido C-34²²³, donado por el NIH (*AIDS Research and Reference Reagent Program*) y el NIAID (*Division of AIDS*) capaz de inhibir la fusión celular; el control negativo fueron las células sin péptido (formación 100% de sincitios).

Se realizó el ensayo por triplicado utilizando la máxima concentración no citotóxica previamente determinada (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$). En la figura 3.3 se muestran, a modo de ejemplo, tres imágenes del ensayo en las que se observan las células con el control positivo (A) y por tanto la formación de gran cantidad de sincitios, señalados por una flecha; las células en presencia del péptido CP3 (B), donde se observa una reducción del número de sincitios formados debido a la actividad inhibitoria del péptido; y las células en presencia del inhibidor C-34, en donde no se observa la formación de sincitios (C).

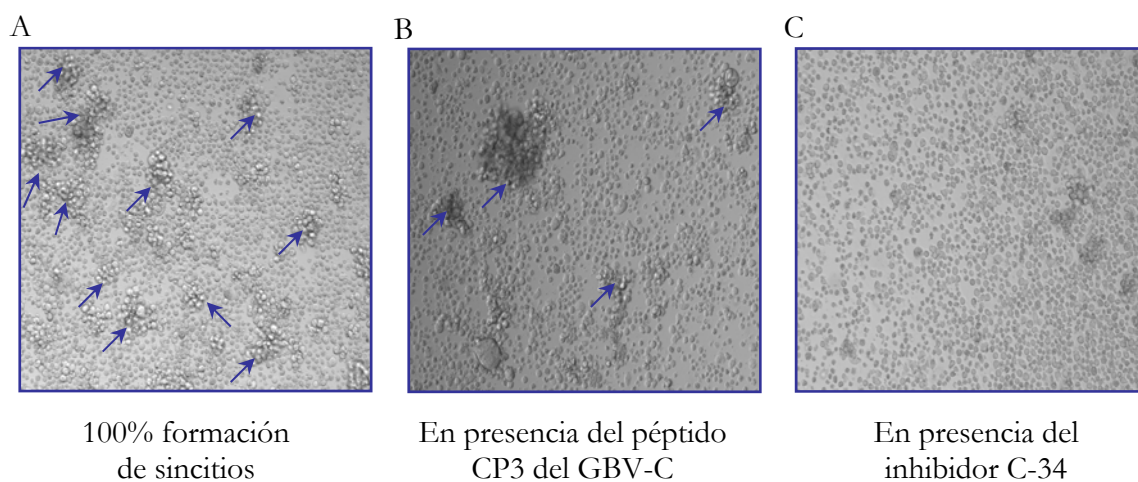


Figura 3.3. Comparación de imágenes en el ensayo de fusión celular.

En la figura 3.4, se muestran los resultados cuantitativos obtenidos de la actividad de la β -galactosidasa tras realizar el ensayo. Como se observa en la figura, en todos los casos, la

inhibición de la fusión de celular es inferior al 50%. Comparando los péptidos derivados de las secuencias E2(7-26), E2(11-26) y E2(17-26), existe cierta tendencia de las construcciones de tipo cíclico hacia unos mayores valores de inhibición. Sin embargo, como se observa en la tabla 3.1, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de inhibición alcanzados por cada una de las construcciones peptídicas ($p > 0,05$).

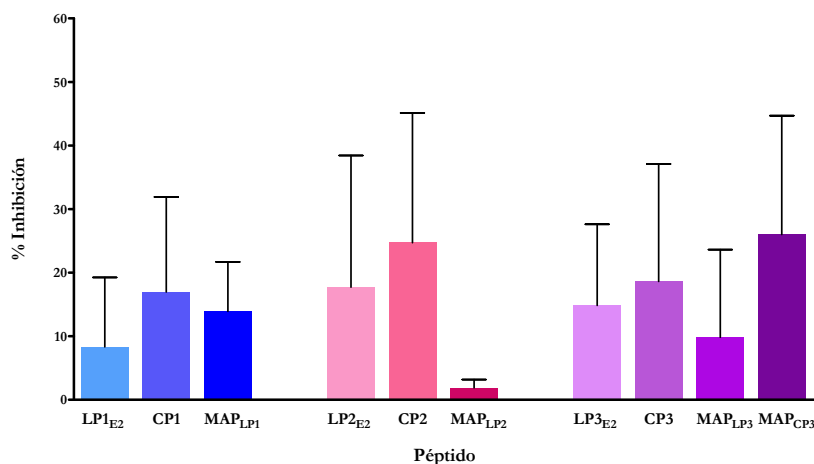
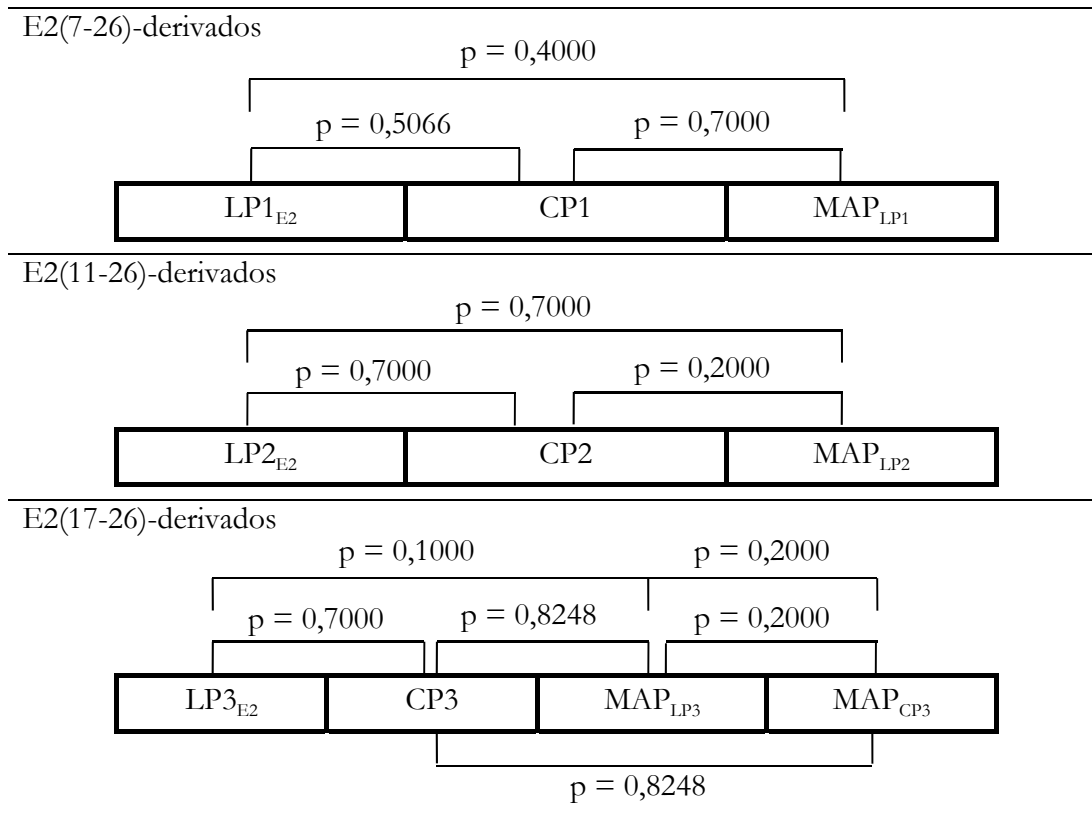


Figura 3.4. Actividad inhibitoria de los péptidos lineales cíclicos y MAPs derivados de la proteína E2 en el ensayo de fusión celular a una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$, indicando la desviación estándar de las medidas realizadas. LP1_{E2}: E2(7-26) lineal; LP2_{E2}: E2(11-26) lineal; LP3_{E2}: E2(17-26) lineal; CP1: E2(7-26) cíclico; CP2: E2(11-26) cíclico; CP3: E2(17-26) cíclico; MAP_{LP1}: MAP₄E2(7-26) lineal; MAP_{LP2}: MAP₄E2(11-26) lineal; MAP_{LP3}: MAP₄E2(17-26) lineal; MAP_{CP3}: MAP₄E2(17-26) cíclico.

Además, la inhibición de la fusión celular no fue dosis-dependiente, por lo que no pudo calcularse el valor de IC_{50} , es decir, la cantidad necesaria de péptido para inhibir al 50% de ésta. Por ello, no pudieron compararse estos resultados con los anteriormente publicados por E. Herrera *et al.*⁴³, donde se muestra que varias regiones de la proteína E2 del GBV-C (GBV-C E2₃₁₋₄₈, GBV-C E2₅₅₋₇₈, GBV-C E2₁₀₀₋₁₁₈, GBV-C E2₁₃₃₋₁₅₆, GBV-C E2₂₈₉₋₃₀₆, GBV-C E2₃₂₅₋₃₄₂ y GBV-C E2₃₇₀₋₃₈₇) pueden estar implicadas en la inhibición de la entrada del VIH-1 en la célula. En dichos estudios, la capacidad de inhibición de infección del VIH-1 de las secuencias peptídicas seleccionadas es moderada (valores de IC_{50} del orden de micromolar) en comparación con la obtenida para otros inhibidores de la entrada del VIH-1 en la célula^{44, 224, 225}, como son el T20 y el C-34 (del orden de nanomolar).

Tabla 3.1. Valores p calculados con el test de Mann-Whitney a partir de los valores de actividad inhibitoria obtenidos al comparar los diferentes derivados de las secuencias peptídicas E2(7-26), E2(11-26) y E2(17-26). Se estableció un intervalo de confianza del 95%, por lo que los valores de $p < 0,05$ indican diferencias significativas entre los grupos comparados.



Finalmente, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, puede concluirse que las diferentes formas de presentación de la región E2(7-26) del GBV-C no dan lugar a una disminución sustancial de la concentración necesaria para inhibir la entrada del virus en la célula. Por lo tanto, deben estudiarse otro tipo de construcciones que contengan alguna o algunas de las regiones de la proteína E2 del GBV-C anteriormente mencionadas. No obstante, puede señalarse que la ciclación cabeza-cola podría incrementar la capacidad de las secuencias lineales de inhibir la entrada del VIH-1 a la célula y, de esta manera, ser considerada como una estrategia sintética útil en el desarrollo de potenciales agentes terapéuticos contra el VIH-1.

4. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIGÉNICA DE LAS CONSTRUCCIONES PEPTÍDICAS DERIVADAS DEL DOMINIO N-TERMINAL DE LA PROTEÍNA E2 DEL GBV-C POR ELISA

Se estudió la capacidad para detectar anticuerpos anti-GBV-C de todas las secuencias y construcciones sintéticas (péptidos lineales, cíclicos y ramificados), descritas en la sección 2, por el ensayo inmunoenzimático de ELISA, del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. Este tipo de ensayos son la base de la mayoría de las pruebas inmunodiagnósticas para la detección, por ejemplo del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida⁴⁸, la artritis reumatoide²²⁶, alergias²²⁷, entre otras enfermedades.

El ensayo de ELISA se basa en la detección de anticuerpos tras la inmovilización de un antígeno (el péptido, en este caso) a un soporte sólido, bien por adsorción o bien mediante un enlace covalente. En esta tesis, se unió el péptido a la placa mediante adsorción y de forma covalente a través de los grupos amino. Para ello, se utilizaron placas preactivadas con el éster de N-oxisuccinimida (Costar Corp. DNA-Bind), que reacciona con nucleófilos, como las aminas primarias, a pH ligeramente básico (figura 4.1). En el caso de los ciclos sintetizados, el ensayo también se realizó con las placas Nunc Immobilizer™ Amino (Nunc), que permiten la unión covalente con el grupo tiol libre de la cisteína presente en dichos péptidos.

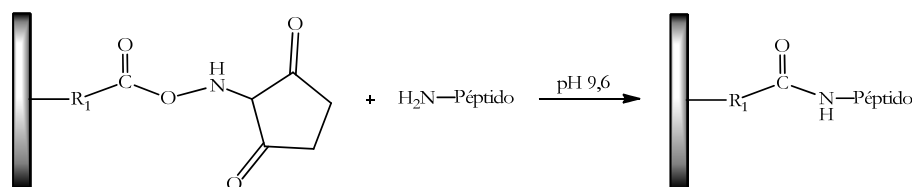


Figura 4.1. Esquema de la superficie de las placas preactivadas con el éster de N-oxisuccinimida.

El ensayo inmunoenzimático de ELISA puede ser de tipo directo, indirecto, competitivo o de tipo sándwich. En el ELISA directo, el anticuerpo marcado se une directamente al antígeno específico a analizar unido previamente a la placa. En el ELISA indirecto el anticuerpo marcado se une al anticuerpo problema, que a su vez está unido al antígeno. El ELISA competitivo se basa en la competencia por la unión con el anticuerpo de captura, unido a la placa, entre el antígeno de la muestra y un antígeno marcado con una enzima. Cuanto mayor sea la absorbancia

medida con el espectrofotómetro, mayor será la concentración de antígeno en la muestra problema. Las concentraciones de antígeno en la muestra se calculan a partir de una muestra patrón construída con concentraciones conocidas de antígeno. Por último, en el caso del ensayo de ELISA tipo sándwich, también denominado de captura de antígenos, se inmoviliza primeramente un anticuerpo anti-antígeno, al que se unirá el antígeno presente en la muestra problema y que posteriormente será reconocido por el anticuerpo secundario marcado.

El ensayo de ELISA utilizado en los estudios de antigenicidad de esta tesis es el de tipo indirecto (figura 4.2), que además es el más empleado en los sistemas de diagnóstico comerciales. Esta modalidad fue descrita por Engvall y Perlmann en 1972²²⁸. Se trata de una técnica no competitiva en la detección de anticuerpos y está basada en la unión del antígeno específico a la microplaca. Tras la incubación de la muestra problema diluida, se lava la microplaca y se adiciona una anti-inmunoglobulina marcada específicamente, dirigida contra la especie a la que pertenece la muestra. Tras lavar de nuevo, el último paso consiste en añadir un sustrato enzimático que genera un cambio de color en aquellos sitios donde se ha unido el anticuerpo secundario, que se mide con ayuda de un espectrofotómetro. En el ensayo, se incluyen controles negativos, es decir, muestras en las que se tenga la certeza de la ausencia del anticuerpo anti-antígeno buscado (apdo. 7, de Materiales y métodos).

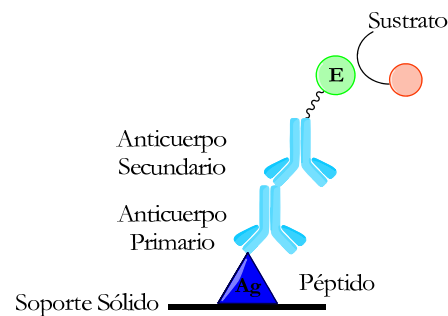


Figura 4.2. Esquema del ensayo de ELISA indirecto.

Las muestras estudiadas fueron sueros procedentes de bancos de sangre (control negativo), sueros de pacientes con hepatitis C crónica (VHC), sueros de pacientes sometidos a hemodiálisis (HD) y sueros de pacientes infectados por el VIH-1. Estos pacientes se encuentran dentro de los grupos considerados de riesgo ya que tienen una probabilidad elevada de sufrir coinfección con otros virus. El GBV-C comparte las vías de transmisión (parenteral, sexual y vertical) con otros virus, como son el VHB, el VHC y el VIH-1. Así, se ha descrito que los pacientes

enfermos de SIDA o que sufren algún tipo de hepatitis tienen más posibilidades de estar infectados por el GBV-C.

Como se ha explicado anteriormente en la introducción de esta tesis, la presencia de anticuerpos anti-E2 se considera un indicador de la infección pasada. Sin embargo, en la actualidad no existe en el mercado ningún sistema que permita diagnosticar la presencia de anticuerpos contra el GBV-C una vez pasada la infección. Esto hace necesario el desarrollo de un nuevo sistema para el diagnóstico de dicho virus, así como la evaluación de la relevancia de los anticuerpos dirigidos contra las diferentes proteínas del GBV-C.

En esta tesis, se ha investigado la habilidad de las diferentes moléculas peptídicas sintetizadas para reconocer anticuerpos anti-GBV-C en sueros de pacientes con hepatitis C crónica y hemodializados, así como en pacientes infectados por el VIH-1, con el fin de entender mejor el efecto de la exposición al GBV-C en la progresión de la enfermedad causada por el VIH-1, así como el posible papel en el pronóstico de otras infecciones virales.

4.1. CRITERIO DE POSITIVIDAD DE LAS MUESTRAS

Con el fin de establecer un criterio para considerar la reactividad de los sueros, se estudió el comportamiento de los sueros de donantes voluntarios sanos con todas las moléculas peptídicas sintetizadas. Estos sueros proceden de la población general y se consideraron controles negativos debido a la baja probabilidad de presentar anticuerpos anti-GBV-C.

El valor de corte (*cut-off*, CO) se calculó para cada péptido a partir del promedio de las absorbancias obtenidas más dos veces la desviación estándar (Materiales y métodos, apdo. 7.5). Las muestras que presentaron valores de absorbancia (A_{492}) superiores a este *cut-off* se consideraron positivas. Debido a que cada péptido presenta un valor de corte diferente, para poder comparar los resultados de manera sencilla, se dividió el valor de A_{492} de cada muestra entre el valor de *cut-off* correspondiente. Así, se consideraron como muestras positivas aquellas en que la relación A_{492}/CO era igual o mayor que uno.

En los ensayos realizados con sueros previamente caracterizados en cuanto a la presencia o ausencia de anticuerpos anti-E2 del GBV-C, se calculó el *cut-off* a partir de la representación de las curvas ROC a un determinado porcentaje de especificidad. También se determinó el área bajo dichas curvas.

Como ya se ha mencionado (apdo. 1.3.3), la curva ROC es una representación global de la exactitud diagnóstica¹⁵⁵; mientras que el AUC es un indicador de rendimiento diagnóstico y cuanto mayor es su valor, mayor es la utilidad diagnóstica¹⁵⁷. Así, comparando el área bajo la curva ROC de diferentes pruebas diagnósticas puede seleccionarse la prueba más exacta y precisa.

Para construir las curvas ROC, se emplearon como controles negativos los sueros procedentes de donantes voluntarios sanos, ya que como se ha dicho anteriormente, se trata de un grupo poblacional con un menor riesgo de haber estado en contacto con el virus y, por tanto, de haber pasado la infección. Por otro lado, los sueros analizados procedentes de pacientes infectados por el VIH-1, pacientes infectados por el VHC y pacientes hemodializados pertenecen a un grupo de la población con un riesgo elevado de haber estado en contacto con el GBV-C, y como consecuencia, de haber pasado la infección y desarrollado anticuerpos contra dicho virus. Por este motivo, pueden considerarse estas muestras como potencialmente positivas.

4.2. COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD DIAGNÓSTICA DE LOS PÉPTIDOS MAP₄[E2(7-26),NS4a(27-43)] Y MAP₄[E2(99-118),NS5a(112-126)] EN PACIENTES HEMODIALIZADOS E INFECTADOS POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

Se estudió y comparó la capacidad antigénica del MAP_{E2/NS4a}, cuya síntesis se describe en el apartado 2.2.1.1, y el MAP_{E2/NS5a}, que había sido previamente sintetizado y estudiado en el grupo por Teresa Pérez durante su tesis doctoral^{160, 229, 230}. Esta construcción peptídica contiene dos copias lineales de la región (99-118), perteneciente a la proteína de envoltura E2 del GBV-C; y dos copias lineales de la región (112-126) de la proteína no estructural NS5a del GBV-C.

En el estudio de la antigenicidad de ambas moléculas ramificadas se emplearon tres paneles de sueros: un panel de 95 sueros de pacientes hemodializados (HD), otro de 65 sueros de pacientes con VHC y otro de 50 sueros donantes voluntarios sanos (BS), como control negativo. Estos sueros procedían del Hospital Clínic de Barcelona. En treinta y cinco de las muestras de sueros de pacientes HD y en 36 de las muestras de sueros del panel de hepatitis C crónica se conocía la presencia de anticuerpos contra la proteína E2 anti-GBV-C (test de Roche Diagnostics + GmbH).

A partir de los valores de absorbancia obtenidos en los ensayos de ELISA, se representaron las curvas de ROC de ambos péptidos para los distintos paneles de sueros (figura 4.3) y, en cada caso, se calculó el AUC (tabla 4.1).

En el caso del $\text{MAP}_{\text{E2/NS4}}$, el AUC tuvo un valor de 0,626 para el panel de sueros de pacientes HD, y por encima de 0,7 en el caso del panel de sueros de pacientes infectados por el VHC. Sin embargo, en el caso del $\text{MAP}_{\text{E2/NS5}}$, el valor del AUC es mayor en ambos casos, por lo que puede decirse que el péptido ramificado que contiene un dominio peptídico de la proteína estructural NS5a tiene una mayor capacidad diagnóstica que el $\text{MAP}_{\text{E2/NS4}}$. Además, en el caso del panel de sueros de pacientes infectados por el VHC, el valor del AUC es mayor que 0,9; indicando que se trata de una prueba diagnóstica muy exacta.

Comparando las áreas bajo la curva de cada péptido ramificado para los dos paneles de sueros, puede afirmarse que existen diferencias estadísticamente significativas entre la reactividad de ambas construcciones peptídicas (tabla 4.1). En la figura 4.3, se observa cómo las curvas correspondientes al $\text{MAP}_{\text{E2/NS5}}$ se sitúan claramente por encima de las correspondientes al $\text{MAP}_{\text{E2/NS4}}$.

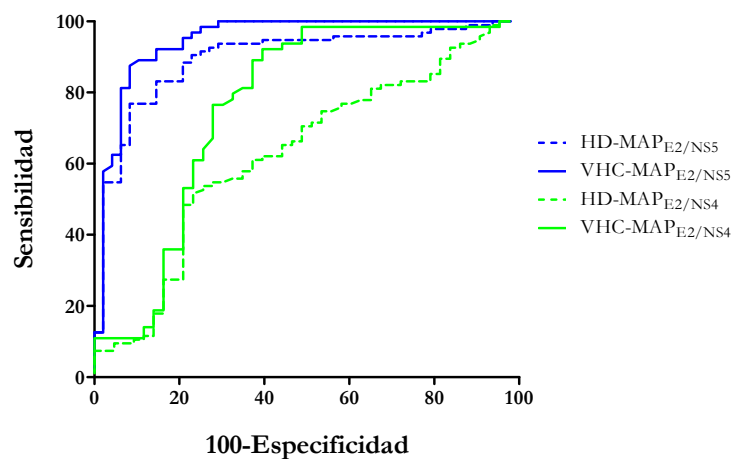


Figura 4.3. Curvas ROC obtenidas para el $\text{MAP}_{\text{E2/NS5}}$ (azul) y el $\text{MAP}_{\text{E2/NS4}}$ (verde) con los sueros de pacientes de hepatitis C crónica (línea sólida) y sueros de pacientes hemodializados (línea punteada).

Tabla 4.1. Área bajo la curva ROC y error estándar calculados para el MAP_{E2/NS4} y el MAP_{E2/NS5} con los sueros de pacientes de hepatitis C crónica (VHC) y con sueros de pacientes hemodializados (HD). Comparación de las áreas bajo la curva y nivel de significación de las diferencias. I.C., Intervalo de Confianza.

Péptido	AUC		Error estándar		95% I.C.	
	VHC	HD	VHC	HD	VHC	HD
MAP _{E2/NS4}	0,764	0,626	0,053	0,052	0,660-0,868	0,524-0,728
MAP _{E2/NS5}	0,947	0,896	0,023	0,029	0,902-0,992	0,839-0,953

Construcciones comparadas		Diferencias entre áreas	Error estándar	Nivel de significación (p)
VHC	MAP _{E2/NS4} vs MAP _{E2/NS5}	0,183	0,048	0,0000
HD	MAP _{E2/NS4} vs MAP _{E2/NS5}	0,270	0,055	< 0,0001

Se calcularon los valores de corte o *cut-off* en cada caso a partir de las curvas ROC para un 98% de especificidad y se comparó la reactividad de los dos péptidos ramificados. En la figura 4.4, se representan los valores de A₄₉₂/CO de los tres paneles de sueros estudiados y se consideraron positivos aquellos valores de A₄₉₂/CO mayores que uno. Mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney, se calculó también si existían o no diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos con cada péptido ramificado (tabla 4.2).

Como puede observarse en la figura 4.4, la reactividad del MAP_{E2/NS5}, tanto en el caso de los pacientes HD como en el caso de los de VHC, es significativamente mayor que la encontrada con el MAP_{E2/NS4}. Así, se obtuvieron porcentajes de positividad del 55% (HD) y 58% (VHC) con el MAP_{E2/NS5}, frente al 7% (HD) y 9% (VHC) para el MAP_{E2/NS4}.

Por tanto, puede decirse que el MAP_{E2/NS5} tiene una capacidad significativamente superior para detectar anticuerpos anti-péptidos del GBV-C presentes en el suero de estos pacientes ($p < 0,0001$ en ambos paneles de suero, tabla 4.2). Estos resultados indican que la presencia de péptidos pertenecientes a la proteína no estructural NS5a pueden ser necesarios para asegurar un buen balance sensibilidad/especificidad de la prueba diagnóstica.

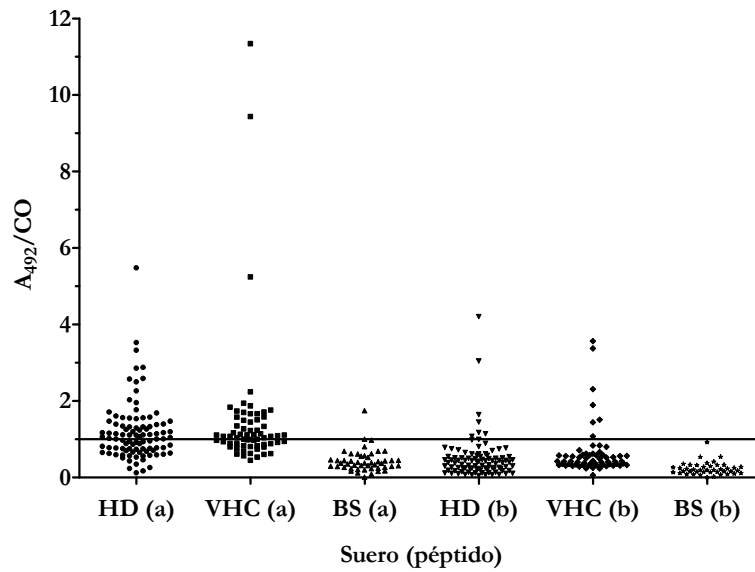
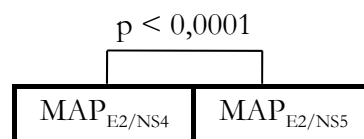


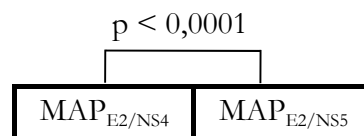
Figura 4.4. Reactividad en ELISA del $\text{MAP}_{\text{E2/NS5}}$ (a) y el $\text{MAP}_{\text{E2/NS4}}$ (b) con el panel de sueros de pacientes hemodializados (HD), hepatitis C crónica (VHC) y bancos de sangre (BS). Los sueros se consideran positivos para valores de $A_{492}/\text{CO} \geq 1$.

Tabla 4.2. Valores p calculados con el test de Mann-Whitney a partir de las reactividades obtenidas para los dos paneles de sueros estudiados al comparar el $\text{MAP}_{\text{E2/NS4}}$ y el $\text{MAP}_{\text{E2/NS5}}$. Se estableció un intervalo de confianza del 95%. Valores de $p < 0,05$ indican diferencias significativas entre los grupos comparados.

Sueros de pacientes hemodializados



Sueros de pacientes con hepatitis C crónica



4.3. CAPACIDAD DIAGNÓSTICA DE LA SECUENCIA PEPTÍDICA E2(7-26)

Con el fin de tratar de conocer la exposición al GBV-C en la progresión de la enfermedad causada por el VIH-1, así como su posible papel en el pronóstico de otras enfermedades virales, se ha investigado la presencia de anticuerpos anti-péptidos del GBV-C en pacientes infectados por VIH-1.

Para ello, tras realizar los experimentos de ELISA, siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 7.3 de Materiales y métodos, se llevó a cabo el estudio de antigenicidad del péptido LP1_{E2} con 95 sueros de pacientes infectados por el VIH-1 procedentes de la Escuela de Medicina de Hannover (Alemania), de los que se conocía la presencia o ausencia de anticuerpos anti-E2 del GBV-C (VIH E2+ y VIH E2-, respectivamente), determinada mediante el test de Abbott. Como control negativo se emplearon 97 sueros procedentes del banco de sangre del Hospital Clínic de Barcelona.

Así, con los valores de A_{492} obtenidos, se representó la curva ROC (figura 4.5) y se calculó el área bajo la curva (tabla 4.3). Como se observa, el AUC tiene un valor de 0,708; lo que indica que se trata de una prueba diagnóstica exacta, y puede decirse que el péptido LP1_{E2} tiene una buena capacidad diagnóstica. A partir de la curva ROC (figura 4.5), se calculó el valor de corte para LP1_{E2} correspondiente a una especificidad del 94,8%, obteniéndose un *cut-off* de 0,357. Este valor permitirá evaluar la infección por el GBV-C en un nuevo panel de sueros de pacientes infectados por el VIH-1, de los que se desconoce su coinfección con el GBV-C.

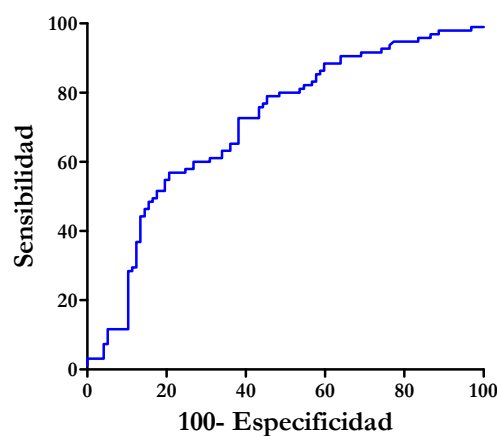


Figura 4.5. Curva ROC obtenida para el LP1_{E2} con los sueros de pacientes infectados por el VIH-1 y con presencia de anticuerpos anti-E2 del GBV-C, determinado por el test de Abbott.

Tabla 4.3. Área bajo la curva ROC y error estándar calculados para el LP1_{E2} con los sueros de pacientes infectados por el VIH-1 y con presencia de anticuerpos anti-E2 del GBV-C. I.C., Intervalo de Confianza.

Péptido	AUC	Error estándar	95% I.C.
LP1 _{E2}	0,708	0,377	0,634-0,782

De esta manera, se llevó a cabo el ensayo de ELISA con un panel de 45 sueros de pacientes infectados por el VIH-1 procedentes del Hospital de Bellvitge, de los que no se conocía si estaban coinfectados por el GBV-C. Considerando el valor de *cut-off* calculado, se identificaron 7 sueros como positivos, con un valor de A_{492} mayor o igual que el valor del *cut-off* (0,357). En la figura 4.6 se representa la reactividad obtenida con el panel de sueros de pacientes infectados por el VIH-1 y con el panel de sueros de pacientes voluntarios sanos. Como se observa, existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos paneles de sueros, determinadas por el test no paramétrico de Mann-Whitney. Por tanto, el péptido LP1_{E2} fue capaz de reconocer como positivos 7 de los 45 sueros estudiados, lo que corresponde con un 16% de los sueros.

Con la finalidad de tratar de mejorar la capacidad diagnóstica del péptido LP1_{E2}, se llevó a cabo el diseño y la síntesis de las distintas formas de presentación peptídica de este dominio antigénico, descritas en el apartado 2.2. Posteriormente, se estudió la habilidad de las diferentes construcciones peptídicas derivadas del extremo N-terminal de la proteína de envoltura E2 del GBV-C para reconocer anticuerpos anti-GBV-C en pacientes infectados por el VIH-1.

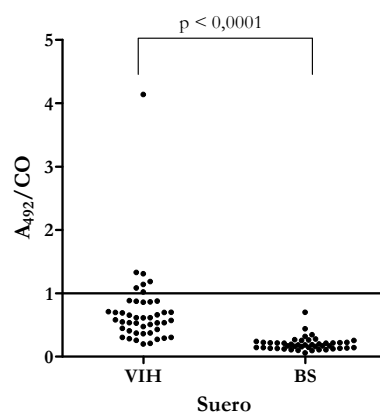


Figura 4.6. Reactividad del péptido LP1_{E2} con el panel de sueros de pacientes infectados por el VIH-1 y con el panel de sueros de donantes voluntarios sanos (BS). Sueros positivos para valores de $A_{492}/CO \geq 1$. Se estableció un intervalo de confianza del 95%. Valor p calculado a partir de las reactividades obtenidas, $p < 0,05$ indican diferencias significativas entre los grupos comparados.

Dado el escaso volumen del que se disponía de las muestras de sueros de pacientes infectados por el VIH-1 que estaban caracterizados en cuanto a la presencia o ausencia de anticuerpos anti-E2 del GBV-C, no fue posible llevar a cabo el estudio de antigenicidad de las diferentes moléculas peptídicas mediante el tratamiento estadístico de las curvas ROC. Por este motivo, se llevó a cabo un estudio comparativo de todas las construcciones sintéticas relativas a la secuencia E2(7-26) frente al péptido de referencia, LP1_{E2}. Como se detalla en el siguiente apartado, este ensayo se realizó con los 7 sueros procedentes del panel de pacientes infectados por el VIH-1 que habían resultado positivos para el péptido LP1_{E2}.

4.4. COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD DIAGNÓSTICA DE LAS DIFERENTES CONSTRUCCIONES PEPTÍDICAS QUE CONTIENEN LA SECUENCIA E2(7-26) EN PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH-1

Se comparó la capacidad diagnóstica de las construcciones peptídicas sintetizadas en el apartado 2.2, derivadas de la secuencia E2(7-26). Para ello, se estudió su reactividad con los 7 sueros procedentes del panel de pacientes infectados por el VIH-1 que habían resultado positivos para el péptido LP1_{E2}. Se analizaron los péptidos lineales E2(7-26), E2(11-26) y E2(17-26) (LP1_{E2}, LP2_{E2} y LP3_{E2}, respectivamente) y sus correspondientes péptidos cíclicos (CP1, CP2 y CP3), y los análogos ramificados (MAP_{LP1}, MAP_{LP2} y MAP_{LP3}), así como el MAP heterogéneo MAP_{E2/NS4}. Como referencia, se tomó el péptido LP1_{E2} ya que, como se describió en el apartado 1.3.3, se trata de una región potencialmente antigénica de la proteína E2 del GBV-C y con buena capacidad diagnóstica, según se ha descrito en el apartado 4.3.

Los experimentos de ELISA se realizaron siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 7.3 de Materiales y métodos. Para ello, se utilizaron las Microplacas DNA-Bind™ (Costar). Como control negativo, se utilizó el panel de 45 sueros de donantes voluntarios sanos y, a partir de ellos, se calculó el valor de corte para cada una de las moléculas peptídicas como la media de las densidades ópticas obtenidas más dos veces la desviación estándar. Finalmente, para poder comparar las reactividades de los péptidos, se trabajó con la relación A_{492}/CO , y se consideraron muestras positivas cuando esta relación era mayor o igual que la unidad.

Los resultados de reactividad obtenidos para cada molécula peptídica se muestran en la tabla 4.4. Se observa que únicamente el péptido cíclico derivado de la secuencia más corta de la proteína

E2 del GBV-C, el CP3, dio positivo con todos los sueros ensayados. Además, 7 de los 10 péptidos dieron positivo para más de la mitad de estos sueros.

Tabla 4.4. Reactividad de diferentes moléculas peptídicas sintetizadas derivadas de la proteína E2 contra 7 sueros de pacientes infectados por VIH-1. LP1_{E2}: E2(7-26) lineal; LP2_{E2}: E2(11-26) lineal; LP3_{E2}: E2(17-26) lineal; CP1: E2(7-26) cíclico; CP2: E2(11-26) cíclico; CP3: E2(17-26) cíclico; MAP_{LP1}: MAP₄E2(7-26) lineal; MAP_{LP2}: MAP₄E2(11-26) lineal; MAP_{LP3}: MAP₄E2(17-26) lineal; MAP_{E2/NS4}: MAP₄[E2(7-26),NS4a(27-43)].

Suero	LP1 _{E2}	LP2 _{E2}	LP3 _{E2}	CP1	CP2	CP3	MAP _{LP1}	MAP _{LP2}	MAP _{LP3}	MAP _{E2/NS4}
S1	+	-	-	+++	-	+	++	+	-	-
S12	++	+++	++	+	-	+	-	+	-	+++
S16	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
S30	+	++	+	+	+	+	++	+++	+	-
S39	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
S40	+	++	-	+	+	+	+	+	+	-
S41	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Total	7/7	5/7	4/7	5/7	3/7	7/7	5/7	6/7	3/7	1/7

- $1 > A_{492} / CO$; + $2,5 > A_{492} / CO \geq 1$; +++ $4 > A_{492} / CO \geq 2,5$; +++ $4 \geq A_{492} / CO$

Considerando estos resultados, se decidió profundizar en la comparación de las reactividades de las moléculas sintetizadas. Para ello, se llevaron a cabo los experimentos de ELISA con 45 de los sueros del panel de pacientes infectados por el VIH-1, y se determinaron las reactividades en cada caso, teniendo en cuenta los valores de *cut-off* anteriormente calculados. Para cada secuencia peptídica, se compararon los diferentes análogos y se estudió, mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney, si había o no diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Los resultados se muestran en la figura 4.7.

Como se observa en dicha figura, el péptido lineal LP1_{E2} es significativamente más reactivo con los sueros de los pacientes infectados por el VIH-1, que su correspondiente análogo cíclico o que el péptido ramificado. Comparando la actividad serológica del péptido LP1_{E2} con el MAP_{E2/NS4}, se observa que también existen diferencias estadísticamente significativas, siendo superior la reactividad del péptido lineal frente a la de la molécula ramificada, en la que

únicamente 9 de los 45 sueros estudiados podían considerarse positivos en cuanto a la presencia de anticuerpos anti-E2 del GBV-C.

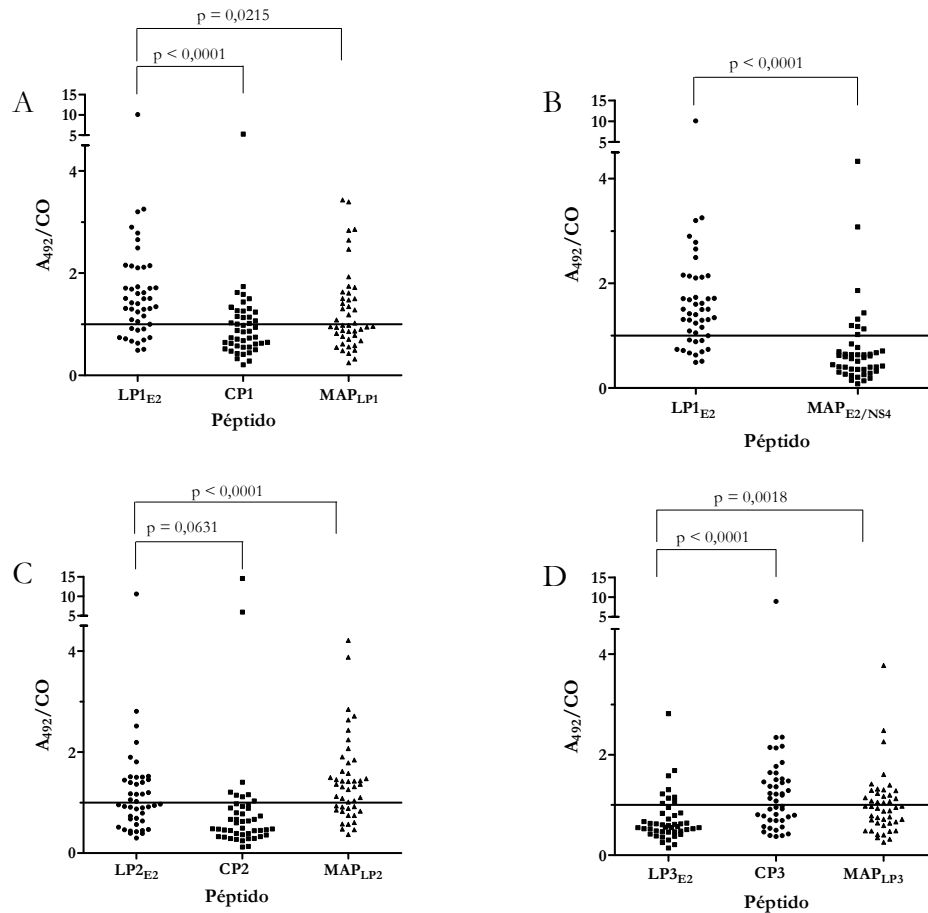


Figura 4.7. Reactividad de los péptidos lineales, cíclicos y ramificados análogos de los péptidos LP1_{E2} (A, B), LP2_{E2} (C) y LP3_{E2} (D) con el panel de sueros de pacientes infectados por el VIH-1. Sueros positivos para valores de $A_{492}/CO \geq 1$. Se estableció un intervalo de confianza del 95%. Valores p calculados a partir de las reactividades obtenidas, $p < 0,05$ indica diferencias significativas entre los grupos comparados. LP1_{E2}: E2(7-26) lineal; LP2_{E2}: E2(11-26) lineal; LP3_{E2}: E2(17-26) lineal; CP1: Cyc-HT-CysE2(7-26); CP2: Cyc-HT-CysE2(11-26); CP3: Cyc-HT-CysE2(17-26); MAP_{LP1}: MAP₄E2(7-26) lineal; MAP_{LP2}: MAP₄E2(11-26) lineal; MAP_{LP3}: MAP₄E2(17-26) lineal, MAP_{E2/NS4}: MAP₄[E2(7-26),NS4a(27-43)].

En cuanto a los péptidos más cortos LP2_{E2} y LP3_{E2}, algunos de sus correspondientes derivados resultaron ser más reactivos frente a los sueros estudiados, observándose un aumento de la reactividad estadísticamente significativo en ambos casos, al comparar el péptido lineal con su

correspondiente estructura ramificada. Este aumento de la reactividad confirma que el aumento del número de copias de los epítomos en la misma molécula mejora su sensibilidad, influyendo de manera positiva en la detección de anticuerpos, de acuerdo con lo que describen diversos autores^{30, 231-234}. Sin embargo, no ocurre lo mismo cuando se compara el LP1_{E2} con sus correspondientes MAPs, posiblemente porque, debido al aumento del número de aminoácidos en los epítomos que lo forman, se producen mayores interacciones no covalentes entre las cadenas, favoreciendo el plegamiento de la molécula, lo que podría dificultar el reconocimiento de la molécula peptídica por las inmunoglobulinas. Así, estos resultados reflejan la dificultad de lograr una ordenación espacial adecuada de las secuencias peptídicas del MAP que permitan el reconocimiento óptimo de los epítomos por los anticuerpos del suero.

Por otro lado, en el caso de los péptidos cíclicos, se repitió el ensayo de ELISA, siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 7.3 de Materiales y métodos, con los dos paneles de sueros utilizando las placas Nunc Immobilizer™ Amino, que permiten la unión covalente entre el grupo tiol libre de cada ciclo y la placa. El objetivo de estos ensayos era comparar los resultados con los obtenidos anteriormente con las Microplacas DNA-Bind™ (Costar), donde la inmovilización se produjo fundamentalmente mediante adsorción, ya que los péptidos cíclicos no contienen un grupo amino-terminal libre en su estructura.

En la figura 4.8, se muestra la comparación de los valores A_{492}/CO para cada ciclo y cada tipo de placa, y los p-valores obtenidos con el test no paramétrico de Mann-Whitney, estableciendo un intervalo de confianza del 95%, por lo que los valores de $p < 0,05$ indican diferencias significativas entre los grupos comparados.

Como se observa, se obtienen mejores resultados cuando el ensayo inmunoenzimático con los péptidos cíclicos se realiza mediante adsorción. Las diferencias entre las placas no son diferencias estadísticamente significativas, excepto en el péptido CP3, en el que se obtienen mejores resultados cuando éste se une mediante adsorción. Se observa también que los resultados obtenidos siguen la misma tendencia, es decir, el péptido CP3 sigue siendo el más reactivo de los tres ciclos, reconociendo 15 de los 45 sueros estudiados.

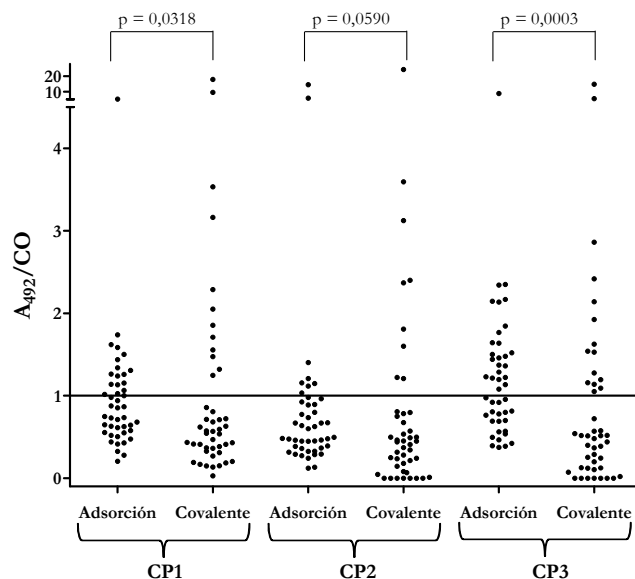


Figura 4.8. Comparación de la reactividad de los péptidos cíclicos en función del tipo de inmovilización. Valores p calculados con el test de Mann-Whitney, estableciendo un intervalo de confianza del 95%, $p < 0,05$ indica diferencias significativas entre los grupos comparados.

Cabe destacar que, de todas las formas de presentación del dominio E2(7-26), el péptido cíclico CP3 fue la molécula más reactiva. Esto coincidiría con lo apuntado por otros autores²⁰⁰, que los péptidos cíclicos podrían mimetizar de una mejor manera la conformación que adoptan en la proteína nativa.

Considerando estos resultados, se comparó el péptido cíclico CP3 con su correspondiente MAP de tipo cíclico, MAP_{CP3} . Para ello, se realizó el ensayo de ELISA con el panel de sueros de pacientes infectados por el VIH-1, así como el panel de sueros de donantes voluntarios sanos. Se calculó el valor de corte de igual manera que en los péptidos anteriores y se representó la relación A_{492}/CO . La comparación de las dos construcciones se muestra en la figura 4.9. Como se observa, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los péptidos, siendo el valor p , calculado con el test no paramétrico de Mann-Whitney, mayor que 0,05 ($p = 0,5504$).

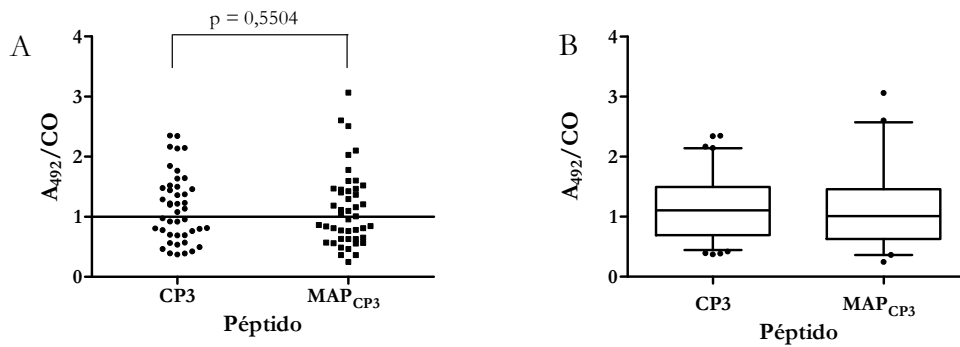


Figura 4.9. A) Reactividad de los péptidos CP3 y MAP_{CP3} con el panel de 45 sueros de pacientes infectados por VIH-1. Valor p calculado con el test de Mann-Whitney, estableciendo un intervalo de confianza del 95%, $p < 0,05$ indica diferencias significativas entre los grupos comparados. Sueros positivos para valores de $A_{492}/CO \geq 1$. CP3: Cyc-HT-CysE2(17-26); MAP_{CP3}: MAPE2(17-26)_{cíclico}. B) Distribución de los valores A_{492}/CO . Las cajas representan la mediana y el rango intercuartílico (distancia entre los percentiles 25 y 75). Los puntos aislados representan los valores atípicos y extremos. CP3: media 1,148, desviación estándar 0,562; MAP_{CP3}: media 1,125, desviación estándar 0,624.

No obstante, como se ha dicho anteriormente, estos resultados no mejoran los encontrados con el péptido LP1_{E2}. Dada la complejidad en el proceso de síntesis y la dificultad de purificación de este tipo de estructuras cíclicas ramificadas, la utilización de estas moléculas como reactivos de inmunodiagnóstico no parece aportar ninguna ventaja respecto a la monomérica lineal en cuanto al reconocimiento específico de anticuerpos anti-GBV-C, utilizando la técnica de ELISA.

Recapitulando, en este apartado se ha estudiado la habilidad de las construcciones peptídicas sintetizadas para reconocer anticuerpos anti-GBV-C en diferentes paneles de sueros, con el fin de encontrar un sistema de diagnóstico de la infección causada por el GBV-C.

En primer lugar, se estudió la antigenicidad del MAP_{E2/NS4} con sueros de pacientes hemodializados y de pacientes infectados por el VHC, debido al alto riesgo de infección por el GBV-C en estos pacientes. Como control negativo se emplearon sueros de personas voluntarias sanas. Los resultados se compararon con los obtenidos para el MAP_{E2/NS5}, previamente sintetizado en el grupo y que estaba formado por dos epítomos de la proteína estructural E2, región E2(99-118), y dos epítomos de la proteína no estructural NS5a, región NS5a(112-126), del GBV-C. De esta comparación, se concluyó que el MAP_{E2/NS5} tenía una mayor capacidad diagnóstica en estos paneles de sueros.

Posteriormente, se evaluó la capacidad diagnóstica del péptido E2(7-26) (LP1_{E2}) con el panel de sueros de pacientes infectados por VIH-1, en los que se conocía la presencia de anticuerpos anti-E2 (VIH E2+), y el panel de sueros control de donantes voluntarios sanos. Para ello, se calculó la curva ROC y el AUC, adquiriendo ésta un valor de 0,708, lo que indica que el péptido LP1_{E2} tiene una moderada capacidad discriminatoria entre sueros de pacientes infectados por el VIH-1 con anticuerpos anti-E2 del GBV-C y sueros de personas sanas. Se calculó así el *cut-off* para un 94,8% de especificidad.

De esta manera, y debido a la escasa disponibilidad de sueros de VIH-1 caracterizados en cuanto a la presencia o ausencia de anticuerpos anti-GBV-C, el epítomo LP1_{E2} se utilizó como péptido de referencia en el estudio comparativo de todas las construcciones sintéticas derivadas de la secuencia E2(7-26). Esta comparación se realizó con una selección de 7 de los 45 sueros del panel de pacientes infectados por el VIH-1, de los que no se conocía si estaban coinfectados por el GBV-C, y que habían resultado positivos para el péptido LP1_{E2}. Finalmente, 7 de los 10 péptidos dieron positivo para más de la mitad de los sueros.

Se estudió la reactividad serológica de las moléculas peptídicas sintetizadas con el panel de 45 sueros de pacientes infectados por el VIH-1, de los que no se conocía la presencia o ausencia de anticuerpos anti-E2 del GBV-C, y se comparó con el péptido de referencia LP1_{E2}. Sin embargo, ninguna de las construcciones sintéticas logró mejorar los resultados encontrados con dicho péptido.

Por último, puede concluirse que ni los péptidos de menor tamaño derivados de la secuencia peptídica E2(7-26), ni sus correspondientes ciclos o los péptidos ramificados alcanzan las propiedades diagnósticas del péptido LP1_{E2} de la proteína E2 del GBV-C. No obstante, estos resultados refuerzan la potencial utilidad de la versión lineal de la región E2(7-26), el péptido LP1_{E2}, para el desarrollo de nuevos sistemas de diagnóstico basados en péptidos para la detección de anticuerpos anti-GBV-C de pacientes coinfectados enfermos de SIDA.

Así, con la finalidad de desarrollar un ensayo inmunodiagnóstico para la infección causada por el GBV-C, se consideró de interés la utilización de la técnica de los microarrays peptídicos. En este sentido, partiendo del estudio antigénico de la proteína E2 del GBV-C, realizado con esta metodología en la sección 1, se procedió a la evaluación de la capacidad diagnóstica de las moléculas peptídicas lineales seleccionadas como ya se ha indicado con anterioridad. Este formato miniaturizado permite la evaluación simultánea de varios epítomos antigénicos de la proteína E2 del GBV-C.

5. VALOR DIAGNÓSTICO DE ANTICUERPOS ANTI-PÉPTIDOS DEL GBV-C EN PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH-1

Se realizó el experimento de microarrays con las 11 moléculas potencialmente antigénicas seleccionadas en el apartado 1.3.3 y un panel de 60 sueros de pacientes infectados por el VIH-1 procedente del Hospital de Bellvitge, del cual no se disponía de información acerca de la infección por el GBV-C. Se siguió el mismo procedimiento experimental que en los ensayos anteriores, tal y como se indica en el apartado 6.4 de Materiales y métodos; se representaron los valores de fluorescencia obtenidos y se comparó la reactividad de los péptidos teniendo en cuenta los puntos de corte hallados a partir de las curvas ROC (tabla 1.10) para una especificidad del 94,74%.

En la figura 5.1 se muestra la distribución de los valores de fluorescencia de los 11 péptidos, tanto para el panel de donantes voluntarios como para el grupo de sueros VIH E2+, estudiados en el apartado 1.3, y el panel de sueros de infectados por VIH-1 de los que se desconocía la presencia de anticuerpos anti-E2 del GBV-C. Se consideraron valores de fluorescencia positivos aquéllos mayores o iguales al punto de corte en cada caso.

Con el objetivo de clasificar los 60 sueros estudiados como sueros positivos (coinfección VIH-1/GBV-C) o negativos (no coinfección VIH-1/GBV-C), se utilizaron los 11 péptidos para definir un patrón en cada suero.

Así, para cada suero estudiado, se definió al péptido (P) como P_{CO} cuando el valor de la fluorescencia del suero era mayor o igual que el *cut-off* (CO) de dicho péptido. La unión de los P_{CO} configura el patrón de un suero. Este patrón identifica todos los péptidos en los que el suero tuvo valores de fluorescencia por encima de los correspondientes *cut-offs*.

En la tabla 5.1, se muestra un ejemplo para un suero problema. Para ese suero, su valor de fluorescencia podría estar por encima del *cut-off* de todos los péptidos (todos P_{CO}), ser mayor que el *cut-off* de 9 de los péptidos (9 P_{CO}), o mayor que el *cut-off* de 7 péptidos (7 P_{CO}), etc.

Por tanto, el patrón de un suero informa de aquellos epítomos en los que la fluorescencia del suero fue superior o igual al punto de corte correspondiente a cada péptido.

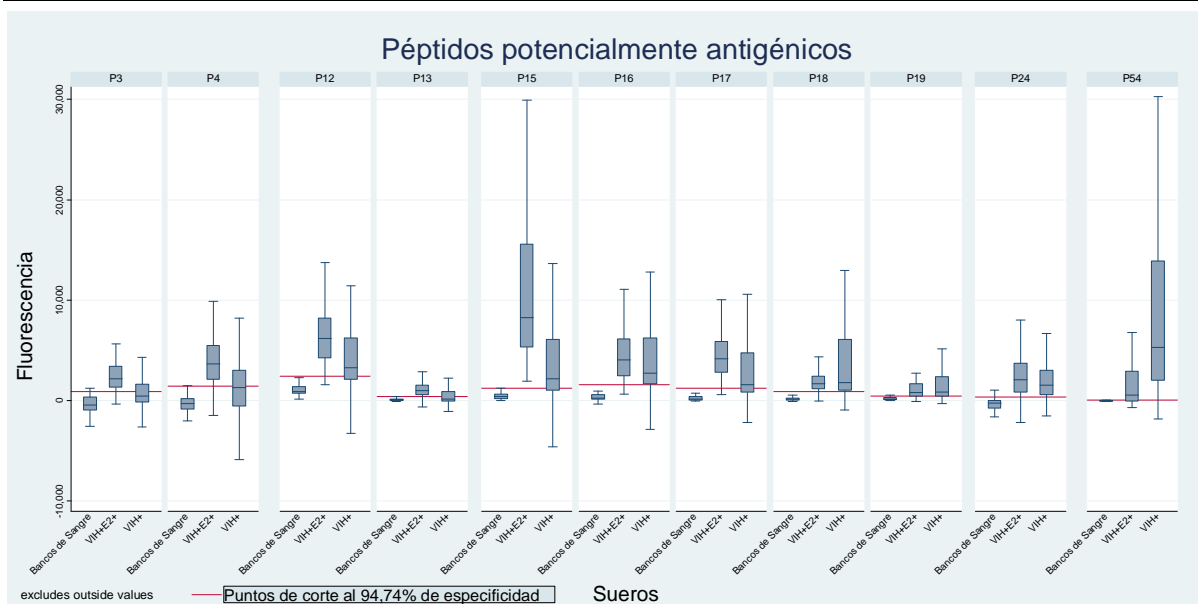


Figura 5.1. Distribución de la fluorescencia de los péptidos potencialmente antigénicos para el panel de sueros de donantes voluntarios (bancos de sangre), el grupo de sueros VIH E2+ y el panel de sueros de pacientes infectados por VIH-1 sin información sobre la presencia o no de anticuerpos anti-E2 del GBV-C (VIH+). La línea horizontal representa el *cut-off* en cada péptido y la altura de las cajas el rango intercuartílico.

Tabla 5.1 Ejemplo de patrones para un suero problema. P_{CO}, péptido en el que el valor de fluorescencia del suero fue mayor o igual al *cut-off*.

Patrón	Zona I	Zona II									Zona III
Todos P _{CO}	P3 _{CO} P4 _{CO}	P12 _{CO}	P13 _{CO}	P15 _{CO}	P16 _{CO}	P17 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}	
9 P _{CO}	P3 _{CO} P4	P12	P13 _{CO}	P15 _{CO}	P16 _{CO}	P17 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}	
7 P _{CO}	P3 P4 _{CO}	P12 _{CO}	P13	P15 _{CO}	P16 _{CO}	P17	P18 _{CO}	P19	P24 _{CO}	P54 _{CO}	

El número de P_{CO} en cada suero varió entre 1 y 11 péptidos, por lo que se establecieron dos condiciones. En primer lugar, se consideró que aquellos sueros con 6 o más P_{CO} tenían una alta probabilidad de proceder de pacientes coinfectados por VIH/GBV-C; y en segundo lugar, se estableció que al menos debía haber un P_{CO} de cada una de las tres zonas inicialmente identificadas (zona I, zona II y zona III). El listado de patrones para estos sueros se resume en la tabla 5.2.

La tabla 5.3 muestra la distribución de P_{CO} diferenciando aquellos sueros con algún P_{CO} en cada zona (29 sueros) de aquellos en los que no se cumplía esta condición (31 sueros).

Tabla 5.2. Listado de los patrones de los sueros identificados como positivos por 6 o más péptidos, existiendo al menos un péptido de cada zona.

Sueros con 7 P_{CO}

	Suero	Patrón								
		Zona I		Zona II						Zona III
1.	31	P4 _{CO}	P12 _{CO}	P16 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}		
2.	33	P4 _{CO}	P12 _{CO}	P15 _{CO}	P16 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}		
3.	46	P4 _{CO}	P12 _{CO}	P15 _{CO}	P16 _{CO}	P18 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}		
4.	51	P3 _{CO}	P4 _{CO}	P15 _{CO}	P16 _{CO}	P18 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}		
5.	55	P4 _{CO}		P16 _{CO}	P17 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}	

Sueros con 8 P_{CO}

	Suero	Patrón								
		Zona I		Zona II						Zona III
1.	29	P4 _{CO}	P12 _{CO}	P15 _{CO}	P16 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}	
2.	36	P3 _{CO}	P4 _{CO}	P12 _{CO}	P15 _{CO}	P16 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}	
3.	54	P4 _{CO}		P13 _{CO}	P15 _{CO}	P16 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}

Sueros con 9 P_{CO}

	Suero	Patrón									
		Zona I		Zona II						Zona III	
1.	14	P3 _{CO}		P12 _{CO}	P15 _{CO}	P16 _{CO}	P17 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}
2.	21		P4 _{CO}	P12 _{CO}	P15 _{CO}	P16 _{CO}	P17 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}
3.	35		P4 _{CO}	P12 _{CO}	P15 _{CO}	P16 _{CO}	P17 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}
4.	49	P3 _{CO}		P13 _{CO}	P15 _{CO}	P16 _{CO}	P17 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}

Sueros con 10 P_{CO}

	Suero	Patrón										
		Zona I		Zona II						Zona III		
1.	1	P3 _{CO}		P12 _{CO}	P13 _{CO}	P15 _{CO}	P16 _{CO}	P17 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}
2.	3	P3 _{CO}	P4 _{CO}	P12 _{CO}		P15 _{CO}	P16 _{CO}	P17 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}
3.	7	P3 _{CO}	P4 _{CO}	P12 _{CO}		P15 _{CO}	P16 _{CO}	P17 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}
4.	16		P4 _{CO}	P12 _{CO}	P13 _{CO}	P15 _{CO}	P16 _{CO}	P17 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}
5.	26	P3 _{CO}	P4 _{CO}	P12 _{CO}		P15 _{CO}	P16 _{CO}	P17 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}
6.	27	P3 _{CO}	P4 _{CO}	P12 _{CO}		P15 _{CO}	P16 _{CO}	P17 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}
7.	28	P3 _{CO}	P4 _{CO}	P12 _{CO}		P15 _{CO}	P16 _{CO}	P17 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}
8.	34	P3 _{CO}	P4 _{CO}	P12 _{CO}		P15 _{CO}	P16 _{CO}	P17 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}
9.	38	P3 _{CO}	P4 _{CO}	P12 _{CO}	P13 _{CO}	P15 _{CO}	P16 _{CO}	P17 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}

Sueros con 11 P_{CO}

	Suero	Patrón										
		Zona I		Zona II						Zona III		
1.	5	P3 _{CO}	P4 _{CO}	P12 _{CO}	P13 _{CO}	P15 _{CO}	P16 _{CO}	P17 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}
2.	6	P3 _{CO}	P4 _{CO}	P12 _{CO}	P13 _{CO}	P15 _{CO}	P16 _{CO}	P17 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}
3.	30	P3 _{CO}	P4 _{CO}	P12 _{CO}	P13 _{CO}	P15 _{CO}	P16 _{CO}	P17 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}
4.	39	P3 _{CO}	P4 _{CO}	P12 _{CO}	P13 _{CO}	P15 _{CO}	P16 _{CO}	P17 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}
5.	41	P3 _{CO}	P4 _{CO}	P12 _{CO}	P13 _{CO}	P15 _{CO}	P16 _{CO}	P17 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}
6.	48	P3 _{CO}	P4 _{CO}	P12 _{CO}	P13 _{CO}	P15 _{CO}	P16 _{CO}	P17 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}
7.	53	P3 _{CO}	P4 _{CO}	P12 _{CO}	P13 _{CO}	P15 _{CO}	P16 _{CO}	P17 _{CO}	P18 _{CO}	P19 _{CO}	P24 _{CO}	P54 _{CO}

Tabla 5.3. Número de sueros con valores de fluorescencia por encima del *cut-off* (sueros positivos) de cada péptido (P_{CO}).

Nº de P_{CO}	Sueros positivos con péptidos de las 3 zonas	Sueros positivos con péptidos de alguna/s de las 3 zonas	Total
1	0	1	1
2	0	4	4
3	1	5	6
4	0	2	2
5	0	2	2
6	0	4	4
7	5	5	10
8	3	2	5
9	4	5	9
10	9	1	10
11	7	0	7
Total	29	31	60

Como se observa en la tabla 5.3 sombreado (en gris), 28 de los 60 sueros (47%) del panel de VIH-1 sin información sobre la coinfección por el GBV-C fueron reactivos frente a 6 o más péptidos, siendo al menos un péptido de cada una de las zonas. Estos resultados coinciden con los encontrados en la bibliografía, donde la prevalencia del GBV-C en personas infectadas por el VIH-1 se encuentra entre un 14 y un 43%²³.

Finalmente, teniendo en cuenta tanto los análisis estadísticos realizados como todos los estrictos criterios tomados en la selección de los 11 péptidos, puede decirse que la elección de estos epítomos de la proteína E2 del GBV-C es adecuada. Por tanto, estos péptidos potencialmente antigénicos pueden considerarse una puerta a la construcción de un nuevo sistema de diagnóstico basado en la técnica de microarrays, que permita determinar la presencia o no de anticuerpos anti-E2 del GBV-C en sueros de pacientes infectados por el VIH-1.

Como se comentó al finalizar la primera sección de esta tesis, los péptidos P3 y P4 de la zona I coinciden en un 90% y un 85%, respectivamente, en su secuencia primaria con el péptido LP1_{E2}, por lo que se compararon los resultados obtenidos para estos péptidos por las dos técnicas estudiadas, ELISA y microarrays, utilizando los mismos paneles de sueros (pacientes infectados por el VIH-1 procedentes de la Escuela de Medicina de Hannover y del Hospital de Bellvitge).

Respecto a la capacidad diagnóstica del dominio N-terminal, estudiado con el panel de sueros de pacientes infectados por el VIH-1, caracterizados en cuanto a la presencia o ausencia de anticuerpos anti-E2 del GBV-C, cabe destacar que el área bajo la curva ROC obtenida con la técnica de ELISA para el péptido LP1_{E2} fue menor (0,708) que el área obtenida por la técnica de microarrays (0,992 para el P3 y 0,942 para el P4). Las curvas ROC de cada péptido se representan en la figura 5.2. De esta manera, aunque las secuencias peptídicas ensayadas no son 100% coincidentes, los resultados obtenidos parecen indicar que la capacidad discriminatoria es excelente cuando la prueba diagnóstica se realiza utilizando la metodología de los microarrays peptídicos, siendo ésta más moderada cuando se utiliza la técnica del inmunoensayo clásico.

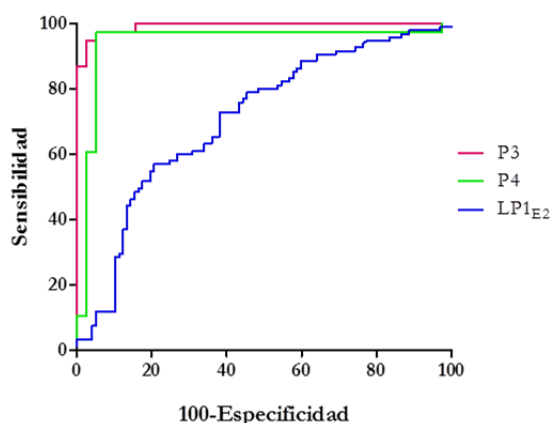


Figura 5.2. Comparación de las curvas ROC de los péptidos P3, P4 y LP1_{E2}

Asimismo, se llevó a cabo la comparación del valor diagnóstico de anticuerpos anti-péptido del GBV-C con el panel de 60 sueros de pacientes infectados por el VIH-1 procedentes del Hospital de Bellvitge, de los que no se conocía la coinfección con el GBV-C. Para ello, se realizó el ensayo de ELISA con el péptido LP1_{E2} utilizando este panel de 60 sueros, 45 de los cuales ya habían sido previamente estudiados, tal y como se detalla en el apartado 4.4. Considerando el valor del *cut-off* calculado a partir de la curva ROC, se indentificaron 12 sueros como positivos, lo que corresponde con un 20% de los sueros ensayados.

Se compararon las reactividades obtenidas por el péptido LP1_{E2}, utilizando la técnica de ELISA, y los péptidos P3 y P4, utilizando la técnica de microarrays. Estos dos péptidos se analizaron de forma conjunta (P3+P4) para mimetizar en un 95% el dominio E2(7-26) (tabla 5.5). En la tabla 5.6 se muestran los resultados de reactividad del panel de 60 sueros de pacientes infectados por VIH-1 frente a los péptidos LP1_{E2} y P3+P4.

Tabla 5.5. Secuencia primaria del dominio E2(7-26) del GBV-C y de los péptidos P3 y P4 de la proteína E2 del GBV-C.

Péptidos	Secuencia primaria
E2(7-26) (LP1 _{E2})	GSRPFEPGLTWQSCSCRANG
P3	GSRPFEPGLTWQSCSCRA
P4	PFEPGLTWQSCSCRANGS

Tabla 5.6. Comparación de las reactividades obtenidas por el péptido LP1_{E2} y los péptidos P3 y P4, que mimetizan la secuencia E2(7-26) del GBV-C con el panel de sueros de pacientes infectados por el VIH-1, del que no se conocía la presencia o ausencia de anticuerpos anti-E2 del GBV-C.

Técnica	Péptido	Sueros positivos	Reactividad (%)
ELISA	LP1 _{E2}	12	20
Microarrays	P3+P4	18	30

Como se observa en la tabla 5.6, la reactividad en ambos casos es inferior a la obtenida utilizando 6 o más péptidos, correspondientes a las tres zonas antigénicas de la proteína E2 del GBV-C, donde la reactividad fue del 47%. Por tanto, se demuestra la necesidad de una combinación de epítomos potencialmente antigénicos de diferentes zonas de la proteína E2 del GBV-C para el desarrollo de un sistema de diagnóstico más exacto y preciso.

Resumiendo, puede decirse que la técnica de microarrays en el estudio de la antigenicidad de péptidos de la proteína E2 del GBV-C, ha permitido la miniaturización de la técnica del ensayo inmunoenzimático de ELISA, reduciendo considerablemente la cantidad de suero y péptido necesaria, así como el tiempo de ensayo.

Se valoró la capacidad diagnóstica de los 11 epítomos seleccionados a partir del estudio de los 124 péptidos de la proteína E2 del GBV-C. Para ello, se utilizaron los *cut-offs*, calculados en el apartado 1.3.2.3, para la creación de una serie de patrones y se analizaron con ellos los sueros de pacientes infectados por el VIH-1 de los que no se tenía información sobre la presencia o no de anticuerpos anti-E2 del GBV-C, consiguiendo su clasificación. Finalmente, estos 11 péptidos potencialmente antigénicos permitieron establecer una reactividad del 47% en cuanto a la detección de anticuerpos anti-péptidos del GBV-C en personas infectadas por el VIH-1, resultado que coincide con los datos publicados en la bibliografía (entre 14 y un 43%)²³.

De esta manera, puede decirse que el estudio de antigenicidad de la proteína E2 del GBV-C se ha realizado con éxito mediante la técnica de microarrays, con la que se han seleccionado 11 de los 124 péptidos estudiados, lo que corresponde con el 9% de los epítomos, como posibles candidatos para la elaboración futura de un sistema de diagnóstico de la infección causada por el GBV-C.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos tanto realizando el estudio empleando el ensayo inmunoenzimático de ELISA, como mediante la técnica de microarrays, puede decirse que es necesaria una combinación de epítomos de diferentes zonas de la proteína E2 del GBV-C para desarrollar un sistema diagnóstico más exacto y preciso. Por tanto, la técnica de microarrays puede ser una alternativa al ensayo de ELISA, ya que la reactividad observada con la tecnología de microarrays y con el conjunto de péptidos seleccionados es mayor a la encontrada con cualquiera de las construcciones peptídicas sintetizadas y ensayadas mediante ELISA.

ANEXO

A.1. ESTUDIO DE FIABILIDAD DEL ENSAYO DE MICROARRAYS

La calidad de una medida depende tanto de la fiabilidad²³⁵, es decir, hasta qué punto se obtienen los mismos valores al efectuar varias mediciones bajo condiciones similares; como de la validez o el grado en el que realmente se mide el fenómeno de interés.

Cuando el objetivo es la fiabilidad de una medición, se repite el proceso de medida para evaluar la concordancia entre las distintas mediciones, pudiendo valorarse:

- Repetibilidad, que indica hasta qué punto un instrumento proporciona resultados similares cuando se aplica a una misma persona en más de una ocasión, pero en idénticas condiciones.
- Concordancia intraobservador, que tiene como objetivo evaluar el grado de consistencia al efectuar la medición de un observador consigo mismo
- Concordancia interobservador, que se refiere a la consistencia entre dos observadores distintos cuando evalúan una misma medida en un mismo individuo.
- Concordancia entre métodos de medición, cuando existen diferentes métodos de medida para un mismo fenómeno, es interesante estudiar hasta qué punto los resultados obtenidos con ambos instrumentos son equivalentes.

Sin embargo, la concordancia entre mediciones puede alterarse por la variabilidad de los observadores, por la variabilidad del instrumento de medida y/o por el proceso de medición si se realiza en momentos diferentes. Las técnicas de análisis de la concordancia dependen de la naturaleza de la variable a estudiar. En nuestro caso, ya que el interés era evaluar la repetibilidad de las medidas y la variable fluorescencia era cuantitativa, se utilizó como medida de repetibilidad el Coeficiente de Correlación Intraclase (CCI)^{235, 236}. Éste se calcula a partir de un Modelo de Análisis de la Varianza (ANOVA) de 1 Factor²³⁷. El objetivo es descomponer la variabilidad total de la fluorescencia en:

- la variabilidad debida a las diferencias *entre* los distintos sueros,
- la variabilidad *dentro* de un mismo suero, debida a las diferencias entre las medidas independientes realizadas a un mismo suero. Ésta variabilidad a su vez depende de la variabilidad real entre las medidas y la variabilidad residual o aleatoria asociada al error que conlleva cualquier medición.

El CCI se define como la proporción de la variabilidad total que se debe a la variabilidad dentro de los sueros y toma valores entre 0 y 1. La máxima repetibilidad corresponde a un valor de CCI igual a 1, es decir, cuando la variabilidad total observada es explicada por las diferencias entre los sueros y no por las diferencias dentro de las medidas de los sueros. La mínima repetibilidad corresponde a un valor CCI igual a cero, es decir, cuando la variabilidad total observada es la misma que se observaría debido al azar. Así, se consideran indicadores de una buena repetibilidad valores de CCI que están por encima de 0,70²³⁶.

En esta tesis, se estudió la fiabilidad de los ensayos realizados analizando si los valores de la primera medición eran o no significativamente diferentes a los de la segunda medición para cada uno de los 38 péptidos principales de estudio y para los 2 péptidos utilizados como control negativo. Por otro lado, se estudió cómo era la variabilidad entre los triplicados de la primera y la segunda medición para un mismo suero, así como la variabilidad total teniendo en cuenta todas las mediciones. En este análisis, el CCI se interpretó como la correlación promedio entre las 6 mediciones de fluorescencia obtenidas para un suero.

Se creó otra base de datos formada por los resultados obtenidos tras repetir el experimento con 16 sueros del grupo VIH E2+ y 16 sueros del grupo VIH E2-, seleccionados al azar por muestreo aleatorio simple. A esta selección, se añadieron otros 4 sueros del primer grupo y otros 2 del segundo, ya que sus mediciones (triplicados) en el ensayo anterior presentaban gran variabilidad. Las distribuciones de fluorescencia obtenidas se muestran en la figura A.1.

Esta nueva base de datos constaba de 4.560 mediciones:

$$(16+4) \text{ sueros VIH E2+} \times 40 \text{ péptidos} \times 3 \text{ triplicados} = 2.400 \text{ mediciones}$$

$$(16+2) \text{ sueros VIH E2-} \times 40 \text{ péptidos} \times 3 \text{ triplicados} = 2.160 \text{ mediciones}$$

Los resultados obtenidos se añadieron con los triplicados correspondientes a estos mismos sueros de la primera medición realizada (apdo. 1.3.1). Finalmente, se trabajó con un total de 9.120 mediciones. La comparación de la distribución de dichos valores para los 38 péptidos más los dos péptidos considerados control negativo (C1 y C2) se muestra en la figura A.2. En la tabla A.1, se muestran los resultados numéricos para cada péptido y triplicado mostrando el número de medidas (n), los valores mínimo y máximo, así como la mediana, el percentil 25 (P25), el percentil 75 (P75) y el rango intercuartílico (P75-P25).

Tanto en la gráfica como en la tabla, se observa cómo al repetir la medición de la fluorescencia, la distribución de los datos fue similar en algunos péptidos, pero distinta en otros, existiendo diferencias en los valores centrales (mediana) de la fluorescencia y/o en los valores de variabilidad (rango intercuartílico). En algunos de los epítomos se encontró que los datos en las 3 primeras medidas (primer triplicado) eran mayores que los datos de las 3 segundas medidas (segundo triplicado); sin embargo, en otros, las diferencias se produjeron en sentido contrario, no existiendo un patrón sistemático que indicase que los datos del primer o del segundo triplicado fueran sistemáticamente mayores o menores.

Observando la figura A.2 y la tabla A.1, pueden distinguirse tres grupos de péptidos. Un grupo en el que el rango intercuartílico y la mediana de la primera y la segunda medición son similares entre sí, como por ejemplo en los péptidos P3, P23 y P51. Otro grupo donde el rango intercuartílico es diferente entre la primera y la segunda medición pero los valores de las medianas son similares P4, P24 y P53, como ocurre en los péptidos. Y un tercer grupo en el que el rango intercuartílico y la mediana de la primera y la segunda medición son diferentes entre sí, como en los péptidos P10, P15 y P54.

Por tanto, puede decirse que estos resultados muestran una alta variabilidad en los valores de fluorescencia en algunos de los péptidos, principalmente en aquéllos donde dichos valores eran también elevados.

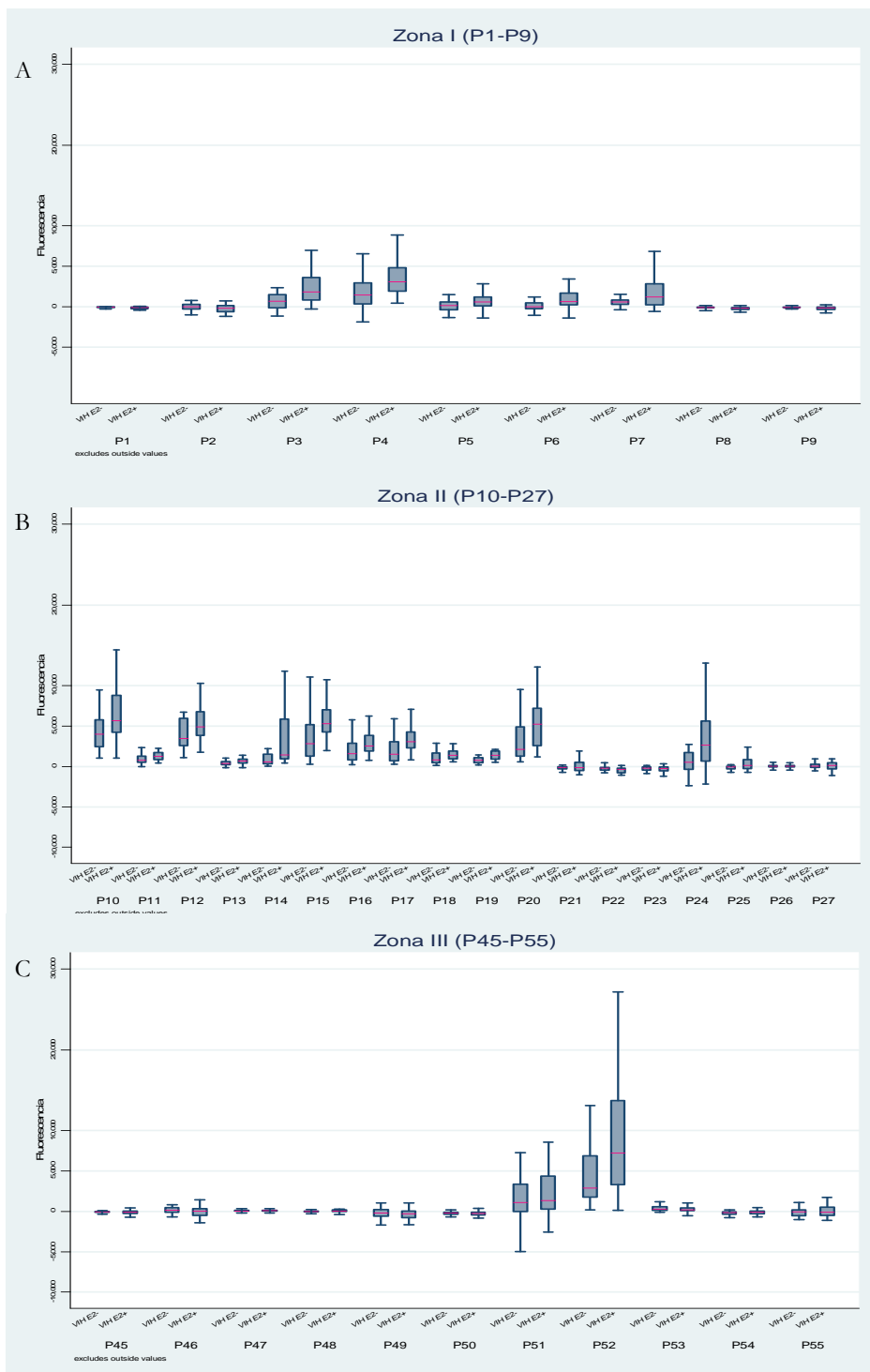


Figura A.1. Distribución de los valores de fluorescencia obtenidos en el segundo ensayo (repetibilidad). La línea horizontal (roja) corresponde con la mediana de fluorescencia y la altura de las cajas con el rango intercuartílico (Percentil 25-Percentil 75). Los valores extremos se han excluido. A) Zona I: P1-P9; B) Zona II: P10-P27; C) Zona III: P45-P55.

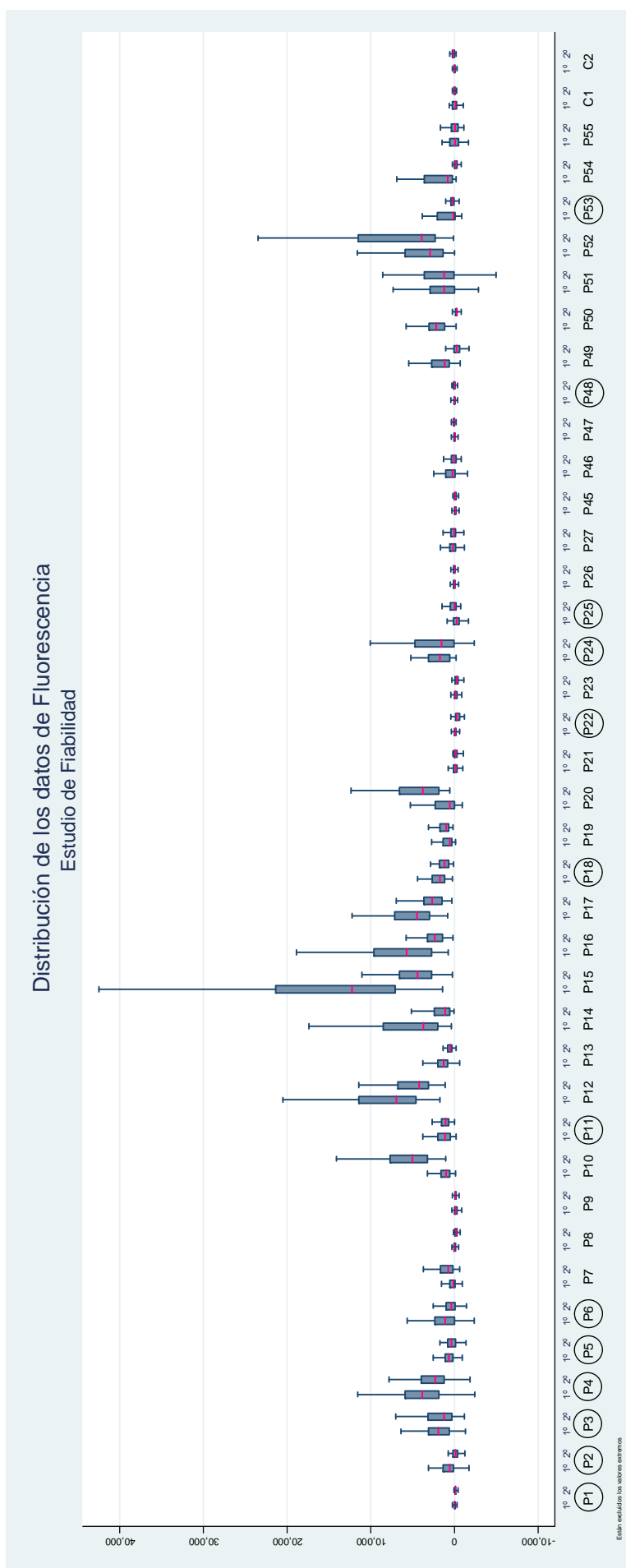


Figura A.2. Distribución de la fluorescencia de los péptidos para la primera y la segunda medición. La línea horizontal (roja) corresponde con la mediana de fluorescencia y la altura de las cajas con el rango intercuartílico (percentil 75-percentil 25). Los valores extremos se han excluido. Los círculos señalan los péptidos con fiabilidad aceptable.

Tabla A.1. Comparación de los valores triplicados de fluorescencia de la primera y la segunda medición para los 38 péptidos estudiados. *n*, número de medidas; P25, percentil 25; P75, percentil 75; R.I., rango intercuartílico.

	Péptido	Triplicado	n	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo	R.I. (P75-P25)
Zona I	P1	1°	114	-620	-119	-25	21	229	140
		2°	114	-672	-202	-104	-47	35	155
	P2	1°	114	-1.737	114	536	1.366	22.330	1.252
		2°	114	-1.216	-443	-113	192	16.697	635
	P3	1°	114	-1.286	649	1.901	3.092	12.168	2.443
		2°	114	-1.163	289	1.216	3.183	12.038	2.894
	P4	1°	114	-2.414	1773	3.873	5.882	37.133	4.109
		2°	114	-1.866	1175	2.270	3.988	11.633	2.814
	P5	1°	114	-923	202	674	1.149	2.538	947
		2°	114	-1.391	-196	375	837	5.615	1.032
	P6	1°	114	-2.357	1	1.096	2.348	8.257	2.347
		2°	114	-1.423	-94	342	1.010	3.942	1.104
	P7	1°	114	-911	-143	110	554	3.953	697
		2°	114	-607	202	747	1.683	23.191	1.481
	P8	1°	114	-691	-156	-15	53	617	209
		2°	114	-1.566	-340	-163	-80	824	260
	P9	1°	114	-1.103	-360	-135	-12	295	348
		2°	114	-900	-278	-126	-57	222	221
Zona II	P10	1°	114	-118	555	1.008	1.625	16.716	1.071
		2°	114	1.057	3.221	5.049	7.677	51.479	4.456
	P11	1°	114	-163	525	1.101	1.964	20.391	1.439
		2°	114	-19	675	1.035	1.552	7.844	877
	P12	1°	114	1.768	4.622	6.947	11.395	36.670	6.773
		2°	114	1.095	3.125	4.207	6.763	52.661	3.639
	P13	1°	114	-626	797	1.290	2.014	12.692	1.218
		2°	114	-154	297	506	809	6.917	512
	P14	1°	114	394	1.905	3.740	8.477	38.494	6.572
		2°	114	45	549	1.118	2.423	19.237	1.875
	P15	1°	114	1.437	7.078	12.225	21.351	64.605	14.274
		2°	114	270	2.738	4.412	6.578	64.651	3.840
	P16	1°	114	737	2.730	5.719	9.646	22.970	6.916
		2°	114	206	1.374	2.335	3.210	14.851	1.837
	P17	1°	114	813	3.004	4.490	7.167	53.796	4.163
		2°	114	286	1.405	2.691	3.670	18.132	2.265
	P18	1°	114	237	1.088	1.715	2.673	26.675	1.585
		2°	114	133	684	1.190	1.799	9.568	1.115
	P19	1°	114	-106	324	539	1.337	12.331	1.013
		2°	114	163	668	988	1.731	17.197	1.063
	P20	1°	114	-946	5	571	2.273	20.057	2.268
		2°	114	566	1.783	3.764	6.601	32.930	4.818
	P21	1°	114	-1.174	-343	-120	120	51.154	463
		2°	114	-1.079	-396	-122	50	61.513	446
	P22	1°	114	-819	-274	-114	-24	5.357	250
2°		114	-1.784	-667	-280	-142	12.573	525	
P23	1°	114	-957	-369	-90	-25	1.294	344	
	2°	114	-1.564	-497	-237	-42	729	456	
P24	1°	114	-212	587	1.731	3.103	8.004	2.516	
	2°	114	-2.352	68	1.525	4.716	18.440	4.649	
P25	1°	114	-1.893	-624	-227	129	6.110	753	
	2°	114	-739	-276	10	483	30.595	758	

Tabla A.1. (continuación). Comparación de los valores triplicados de fluorescencia de la primera y la segunda medición para los 38 péptidos estudiados. n , número de medidas; P25, percentil 25; P75, percentil 75; R.I., rango intercuartílico.

	Péptido	Triplicado	n	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo	R.I. (P75-P25)
Zona II	P26	1º	114	-708	-131	-21	125	1007	256
		2º	114	-1.712	-116	26	128	604	243
	P27	1º	114	-1.193	-175	157	578	3.841	753
		2º	114	-1.143	-199	67	457	4.688	655
Zona III	P45	1º	114	-807	-235	-94	-6	1415	229
		2º	114	-1.074	-236	-88	-1	598	236
	P46	1º	114	-1.529	-153	276	1.078	8.827	1.231
		2º	114	-1.928	-244	94	398	4.220	642
	P47	1º	114	-609	-146	-37	73	362	219
		2º	114	-269	-4	54	137	412	141
	P48	1º	114	-554	-114	-19	96	6.820	210
		2º	114	-641	-95	15	121	1.264	216
	P49	1º	114	-711	617	1173	2.744	21.571	2.127
		2º	114	-1.707	-695	-253	83	12.213	778
	P50	1º	114	-170	1.088	2196	3.043	5.784	1.955
		2º	114	-1.594	-377	-219	-96	439	281
	P51	1º	114	-2.840	-23	1.266	2.925	29.980	2.948
		2º	114	-4.982	65	1.263	3.602	22.132	3.537
	P52	1º	114	-5	1.277	2.950	5.890	61.431	4.613
		2º	114	138	2.305	3.907	11.495	60.948	9.190
	P53	1º	114	-893	-45	141	2.045	27.189	2.089
		2º	114	-760	59	235	465	4.837	407
	P54	1º	114	-155	236	786	3.588	35.618	3.352
		2º	114	-789	-343	-140	-28	2.111	315
P55	1º	114	-1.692	-551	-72	556	25.164	1.107	
	2º	114	-1.103	-512	-75	382	17.912	894	
Controles	C1	1º	90	-1.078	-303	-90	238	7.109	541
		2º	114	-568	-79	15	80	1.755	159
	C2	1º	114	-561	-104	-17	44	1.593	148
		2º	114	-211	-4	109	250	2.561	254

Para valorar la repetibilidad en el estudio de fiabilidad se denominó Y a la variable fluorescencia para un péptido dado. El valor medido de fluorescencia en el suero i -ésimo, triplicado j -ésimo y medida k -ésima, se definió como y_{ijk} . La estructura de los 228 datos recogidos se muestra en la tabla A.2. A partir de los datos que se muestran en la tabla, se estimó un Modelo de Análisis de la Varianza (ANOVA) de 1 Factor²³⁸⁻²⁴⁰ en cada péptido para poder estimar el Coeficiente de Correlación Intraclase. La tabla A.3 recoge cómo se calculó este modelo, y a partir de sus componentes se calculó el Coeficiente de Correlación Intraclase (CCI) como:

$$CCI = \frac{(CM_{entre} - CM_{dentro})}{CM_{entre} + ((6 - 1)CM_{dentro})}$$

Donde CM_{entre} es el cuadrado medio entre los sueros y CM_{dentro} es el cuadrado medio dentro de los sueros.

Así, cuando las 6 medidas realizadas en un mismo suero se parezcan entre sí, y ello ocurra en general para los 38 sueros, el cuadrado medio (CM_{dentro}) será pequeño, ya que los datos de fluorescencia de cada suero estarán muy próximos a su propia media $\bar{y}_{i..}$. De este modo, el numerador y el denominador de este cociente serán muy parecidos y el CCI tenderá a estar muy próximo a 1, indicando una excelente repetibilidad. Por el contrario, cuando las 6 medidas realizadas en un mismo suero no se parezcan mucho entre sí, y ello ocurra en general para los 38 sueros, los datos de fluorescencia de cada suero no estarán cerca de su propia media $\bar{y}_{i..}$, y por tanto el CM_{dentro} será elevado. En este caso, el numerador será más pequeño que el denominador y el CCI tenderá a alejarse de 1 para acercarse a 0, indicando una pobre repetibilidad.

Los valores de los Coeficientes de Correlación Intraclass obtenidos se muestran en la figura A.3 y en la tabla A.4. Se representan dichos coeficientes para cada péptido, tanto de la comparación global de las dos mediciones (CCI_g) como de la comparación de cada grupo de triplicados por separado (CCI_1 y CCI_2).

Tabla A.2. Estructura de los datos en el estudio de fiabilidad para valorar su repetibilidad. Y corresponde con la fluorescencia para un péptido dado; y_{ijk} con el valor medido de fluorescencia en el suero i -ésimo, triplicado j -ésimo y medida k -ésima; \bar{y}_{\dots} es la media total.

		Y						
		1er triplicado			2º triplicado			Total
Medida		1	2	3	1	2	3	
Sueros VIH/E2-	1	y_{111}	y_{112}	y_{113}	y_{121}	y_{122}	y_{123}	$\bar{y}_{1\bullet\bullet} = \frac{\sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^3 y_{1jk}}{6}$
	2	y_{211}	y_{212}	y_{213}	y_{221}	y_{222}	y_{223}	$\bar{y}_{2\bullet\bullet} = \frac{\sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^3 y_{2jk}}{6}$
	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
	18	$y_{18\ 11}$	$y_{18\ 12}$	$y_{18\ 13}$	$y_{18\ 21}$	$y_{18\ 22}$	$y_{18\ 23}$	$\bar{y}_{18\bullet\bullet} = \frac{\sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^3 y_{18\ jk}}{6}$
Sueros VIH/E2+	1	$y_{19\ 11}$	$y_{19\ 12}$	$y_{19\ 13}$	$y_{19\ 21}$	$y_{19\ 22}$	$y_{19\ 23}$	$\bar{y}_{19\bullet\bullet} = \frac{\sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^3 y_{19\ jk}}{6}$
	2	$y_{20\ 11}$	$y_{20\ 12}$	$y_{20\ 13}$	$y_{20\ 21}$	$y_{20\ 22}$	$y_{20\ 23}$	$\bar{y}_{20\bullet\bullet} = \frac{\sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^3 y_{20\ jk}}{6}$
	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
	20	$y_{38\ 11}$	$y_{38\ 12}$	$y_{38\ 13}$	$y_{38\ 21}$	$y_{38\ 22}$	$y_{38\ 23}$	$\bar{y}_{38\bullet\bullet} = \frac{\sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^3 y_{38\ jk}}{6}$
Total		$\bar{y}_{\bullet 11} = \frac{\sum_{i=1}^{38} y_{i11}}{38}$	$\bar{y}_{\bullet 12} = \frac{\sum_{i=1}^{38} y_{i12}}{38}$	$\bar{y}_{\bullet 13} = \frac{\sum_{i=1}^{38} y_{i13}}{38}$	$\bar{y}_{\bullet 21} = \frac{\sum_{i=1}^{38} y_{i21}}{38}$	$\bar{y}_{\bullet 22} = \frac{\sum_{i=1}^{38} y_{i22}}{38}$	$\bar{y}_{\bullet 23} = \frac{\sum_{i=1}^{38} y_{i23}}{38}$	$\bar{y}_{\bullet\bullet\bullet} = \frac{\sum_{i=1}^{38} \sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^3 y_{ijk}}{228}$

Tabla A.3. Modelo de Análisis de la Varianza de 1 Factor en cada péptido. SC_{entre} , suma de cuadrados entre sueros; SC_{dentro} , suma de cuadrados dentro de los 6 triplicados de cada suero; CM_{entre} , cuadrado medio entre; CM_{dentro} , cuadrado medio dentro; n , número total de medidas; I , número total de sueros; \hat{S}^2 , varianza.

Fuente de Variabilidad	Sumas de Cuadrados (SC)	Grados de Libertad (g.l.)	Cuadrados Medios (CM)
ENTRE sueros	$SC_{entre} = \sum_{i=1}^I JK * (\bar{y}_{i..} - \bar{y}_{...})^2$ $i = 1, \dots, I; j = 1, \dots, J; k = 1, \dots, K;$ $I = 38; J = 2; K = 3$	$(I - 1) = (38 - 1)$	$CM_{entre} = \frac{SC_{entre}}{(I - 1)} = \hat{S}_{entre}^2$
DENTRO sueros	$SC_{dentro} = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K (y_{ijk} - \bar{y}_{i..})^2$	$(n - I) = (228 - 38)$	$CM_{dentro} = \frac{SC_{dentro}}{(n - I)} = \hat{S}_{dentro}^2$
Total	$SC_{total} = SC_{entre} + SC_{dentro}$	$(n - 1) = (228 - 1)$	

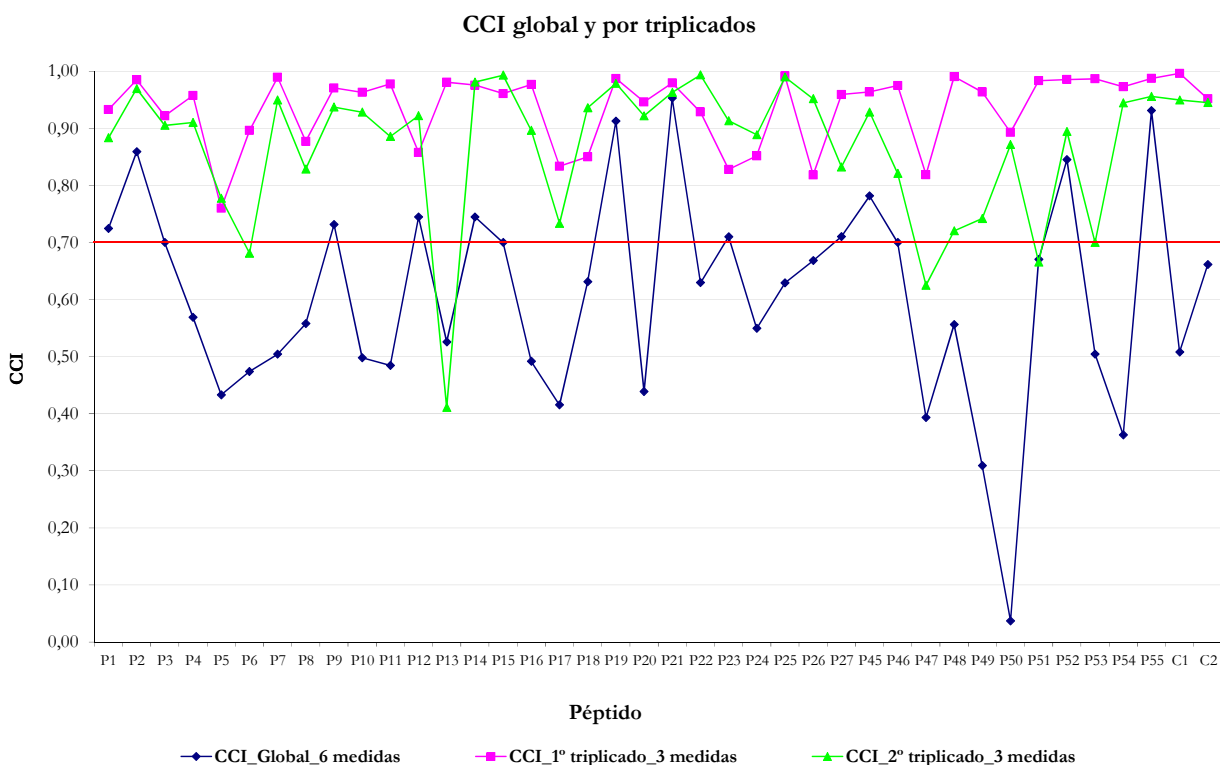


Figura A.3. Valores del Coeficiente de Correlación Intraclass (CCI) globales (azul) y de los triplicados de la primera y segunda medición (rosa y verde, respectivamente) para cada péptido y para los dos controles negativos (C1 y C2).

Tabla A.4. Valores del Coeficiente de Correlación Intraclases global (CCI_g), para las medidas del primer triplicado (CCI_1) y para las medidas del segundo triplicado (CCI_2) con un intervalo de confianza (I.C.) del 95%.

	Péptido	CCI_g	I.C. (CCI_g)	CCI_1	I.C. (CCI_1)	CCI_2	I.C. (CCI_2)
Zona I	P1	0,72*	(0,62 ; 0,83)	0,93*	(0,90 ; 0,97)	0,88*	(0,82 ; 0,94)
	P2	0,86*	(0,80 ; 0,92)	0,99*	(0,98 ; 0,99)	0,97*	(0,95 ; 0,99)
	P3	0,70*	(0,57 ; 0,80)	0,92*	(0,88 ; 0,96)	0,91*	(0,86 ; 0,95)
	P4	0,57	(0,43 ; 0,71)	0,96*	(0,93 ; 0,98)	0,91*	(0,86 ; 0,96)
	P5	0,43	(0,28 ; 0,58)	0,76*	(0,65 ; 0,87)	0,78*	(0,67 ; 0,88)
	P6	0,47	(0,33 ; 0,62)	0,90*	(0,84 ; 0,95)	0,68*	(0,54 ; 0,82)
	P7	0,50	(0,36 ; 0,65)	0,99*	(0,98 ; 1,00)	0,95*	(0,92 ; 0,98)
	P8	0,56	(0,42 ; 0,70)	0,88*	(0,81 ; 0,94)	0,83*	(0,74 ; 0,91)
	P9	0,73*	(0,63 ; 0,84)	0,97*	(0,96 ; 0,99)	0,94	(0,90 ; 0,97)
Zona II	P10	0,50	(0,35 ; 0,64)	0,96*	(0,94 ; 0,98)	0,93*	(0,89 ; 0,97)
	P11	0,48	(0,34 ; 0,63)	0,98*	(0,97 ; 0,99)	0,89*	(0,83 ; 0,94)
	P12	0,74*	(0,64 ; 0,84)	0,86*	(0,79 ; 0,93)	0,92*	(0,88 ; 0,96)
	P13	0,53	(0,38 ; 0,67)	0,98*	(0,97 ; 0,99)	0,41*	(0,21 ; 0,61)
	P14	0,74*	(0,64 ; 0,84)	0,98*	(0,96 ; 0,99)	0,98*	(0,97 ; 0,99)
	P15	0,70*	(0,57 ; 0,80)	0,96*	(0,94 ; 0,98)	0,99*	(0,99 ; 1,00)
	P16	0,49	(0,35 ; 0,64)	0,98*	(0,96 ; 0,99)	0,90*	(0,84 ; 0,95)
	P17	0,42	(0,27 ; 0,56)	0,83*	(0,75 ; 0,92)	0,73*	(0,61 ; 0,86)
	P18	0,63	(0,50 ; 0,76)	0,85*	(0,77 ; 0,93)	0,94*	(0,90 ; 0,97)
	P19	0,91*	(0,87 ; 0,95)	0,99*	(0,98 ; 0,99)	0,98*	(0,97 ; 0,99)
	P20	0,44	(0,29 ; 0,59)	0,95*	(0,92 ; 0,98)	0,92*	(0,88 ; 0,96)
	P21	0,95*	(0,93 ; 0,98)	0,98*	(0,97 ; 0,99)	0,96*	(0,94 ; 0,98)
	P22	0,63	(0,50 ; 0,76)	0,93*	(0,89 ; 0,97)	0,99*	(0,99 ; 1,00)
	P23	0,71*	(0,58 ; 0,80)	0,83*	(0,74 ; 0,91)	0,91*	(0,87 ; 0,96)
	P24	0,55	(0,41 ; 0,69)	0,85*	(0,78 ; 0,93)	0,89*	(0,83 ; 0,95)
	P25	0,63	(0,50 ; 0,76)	0,99*	(0,99 ; 1,00)	0,99*	(0,98 ; 1,00)
	P26	0,70*	(0,55 ; 0,79)	0,82*	(0,73 ; 0,91)	0,95*	(0,93 ; 0,98)
P27	0,71*	(0,60 ; 0,82)	0,96*	(0,94 ; 0,98)	0,83*	(0,75 ; 0,92)	
Zona III	P45	0,78*	(0,69 ; 0,87)	0,96*	(0,94 ; 0,98)	0,93*	(0,89 ; 0,97)
	P46	0,70*	(0,57 ; 0,80)	0,98*	(0,96 ; 0,99)	0,82*	(0,73 ; 0,91)
	P47	0,39	(0,24 ; 0,54)	0,82*	(0,73 ; 0,91)	0,62*	(0,47 ; 0,78)
	P48	0,56	(0,42 ; 0,70)	0,99*	(0,99 ; 1,00)	0,72*	(0,59 ; 0,85)
	P49	0,31	(0,16 ; 0,45)	0,96*	(0,94 ; 0,98)	0,74*	(0,62 ; 0,86)
	P50	0,04	(0,00 ; 0,13)	0,89*	(0,84 ; 0,95)	0,87*	(0,81 ; 0,94)
	P51	0,70*	(0,55 ; 0,79)	0,98*	(0,97 ; 0,99)	0,67*	(0,52 ; 0,81)
	P52	0,85*	(0,78 ; 0,91)	0,99*	(0,98 ; 0,99)	0,89*	(0,84 ; 0,95)
	P53	0,50	(0,36 ; 0,65)	0,99*	(0,98 ; 0,99)	0,69*	(0,56 ; 0,83)
	P54	0,36	(0,21 ; 0,51)	0,97*	(0,96 ; 0,99)	0,94*	(0,91 ; 0,97)
	P55	0,93*	(0,90 ; 0,96)	0,99*	(0,98 ; 0,99)	0,96**	(0,93 ; 0,98)
Controles	C1	0,51	(0,36 ; 0,66)	1,00*	(0,99 ; 1,00)	0,95*	(0,92 ; 0,98)
	C2	0,66	(0,54 ; 0,78)	0,95*	(0,93 ; 0,98)	0,95*	(0,92 ; 0,97)

* $CCI \geq 0,7$

Observando la figura A.3, donde se representan los CCI globales (azul) y por triplicados (verde y rosa), puede decirse que los coeficientes calculados en el primer triplicado eran todos mayores que 0,7 y por tanto se obtuvo una excelente repetibilidad. En el segundo triplicado, el 92% de los péptidos tuvieron coeficientes mayores que 0,7 obteniéndose una muy buena repetibilidad. En los péptidos P13, P47 y P51, los CCI fueron menores que 0,7.

Por otro lado, uniendo las medidas de los dos triplicados, los CCI globales fueron menores que los calculados anteriormente, excepto para el segundo triplicado del péptido P13. En un 45% de los péptidos el CCI fue mayor que 0,7 (17 de los 38 péptidos). Así, aunque las medidas del primer triplicado eran similares entre sí y las 3 medidas del segundo triplicado también eran similares entre sí, al juntar las 6 medidas la similitud no se mantenía.

Finalmente, en vista de estos resultados, puede decirse que existe una buena repetibilidad en casi la mitad de los péptidos.

Con el fin de complementar los resultados del estudio de fiabilidad, y teniendo en cuenta algunas de las limitaciones del CCI²³⁵, como asumir que las variables están distribuidas según una ley normal e igualdad de varianzas, se decidió valorar el efecto debido a los dos triplicados. Para ello, se ajustaron a los resultados Modelos de Análisis de Varianza con anidamiento²⁴¹ (tabla A.5), los cuales consideran que las 6 medidas de cada suero en realidad pertenecen a dos triplicados distintos, o lo que es lo mismo, que los dos triplicados están anidados dentro de cada suero. De este modo, se pudo valorar si las diferencias en la repetibilidad halladas podrían ser debidas a las diferencias entre el primer y segundo triplicado.

En estos modelos, la variabilidad de un suero ($CM_{entre} = \hat{S}_{entre}^2$) es en parte explicada por las diferencias entre los dos triplicados ($CM_{triplicados} = \hat{S}_{triplicados}^2$).

Al comparar $\frac{CM_{triplicados}}{CM_{entre|triplicados}}$ se puede comprobar si las diferencias entre los sueros son debidas a diferencias entre los dos triplicados. El p-valor asociado a este cociente se compara con el nivel de significación $\alpha = 0,05$ para determinar en qué péptidos este efecto era estadísticamente significativo.

Así, la figura A.4 y en la tabla A.6 muestran cómo este efecto estimado no fue estadísticamente significativo en 24 de los 38 péptidos (63%), indicando que en éstos no existían diferencias estadísticamente significativas entre las medidas de los dos triplicados.

Tabla A.5. Modelo ANOVA anidado. SC, suma de cuadrados; g.l., grados de libertad; CM, cuadrados medios; I , número total de sueros; J , número de triplicado; \hat{S}^2 , varianza.

Fuente de Variabilidad	SC	g.l.	CM	F
ENTRE sueros	$SC_{entre} = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J K * (\bar{y}_{ij\bullet} - \bar{y}_{\dots})^2$ $i = 1, \dots, I; j = 1, \dots, J; k = 1, \dots, K;$ $I = 38; J = 2; K = 3$	$(IJ - 1) = (76 - 1)$	$CM_{entre} = \frac{SC_{entre}}{(IJ - 1)} = \hat{S}_{entre}^2$	
ENTRE triplicados	$SC_{triplicados} = \sum_{j=1}^J IK * (\bar{y}_{\bullet j\bullet} - \bar{y}_{\dots})^2$	$(J - 1) = (2 - 1)$	$CM_{triplicados} = \frac{SC_{triplicados}}{(J - 1)} = \hat{S}_{triplicados}^2$	$F = \frac{CM_{triplicados}}{CM_{entre/triplicados}} \sim F_{(J-1), (I-J)}$
ENTRE sueros triplicados	$SC_{entre/triplicados} = SC_{entre} - SC_{triplicados}$	$(IJ - J) = (76 - 2)$	$CM_{entre/triplicados} = \frac{SC_{entre/triplicados}}{(IJ - J)} = \hat{S}_{entre/triplicados}^2$	
DENTRO sueros	$SC_{dentro} = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (y_{ijk} - \bar{y}_{ij\bullet})^2$	$(n - IJ) = (228 - 76)$	$CM_{dentro} = \frac{SC_{dentro}}{(n - IJ)} = \hat{S}_{dentro}^2$	
Total	$SC_{total} = SC_{entre} + SC_{dentro}$	$(n - 1) = (228 - 1)$		

Resultados Modelo ANOVA con anidamiento

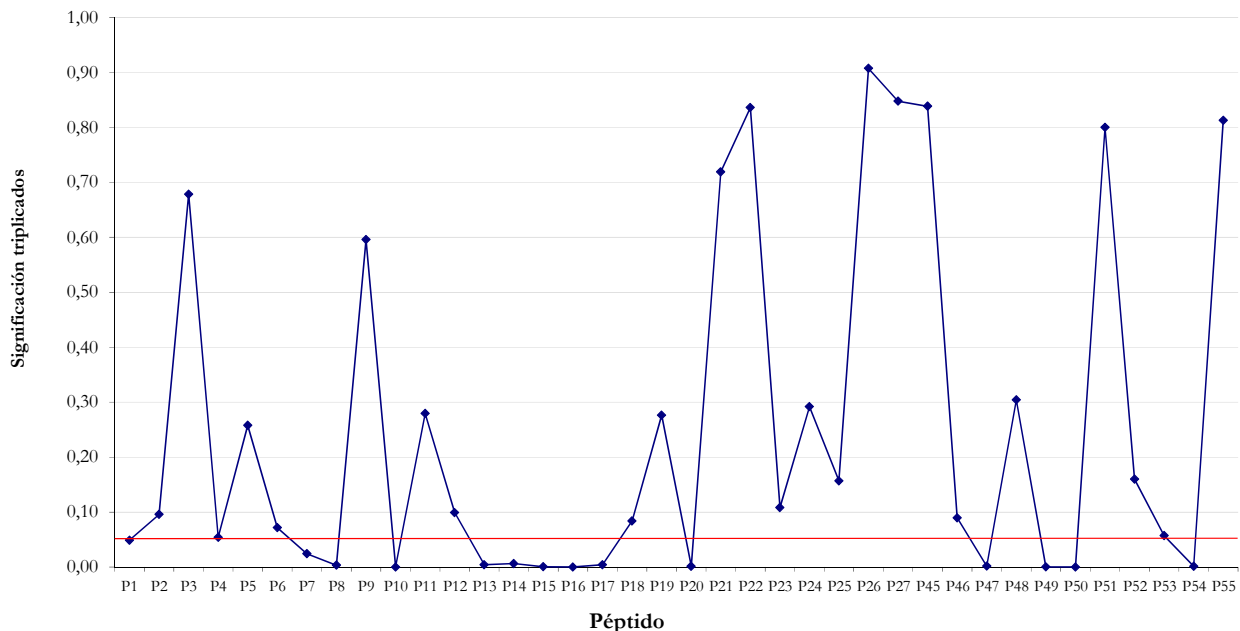


Figura A.4. Resultados del Modelo ANOVA con anidamiento. La línea roja representa el nivel de significación $\alpha = 0,05$.

Tabla A.6. P-valor del efecto triplicado para cada péptido.

	Péptido	P-valor del efecto triplicado
Zona I	P1	0,0489*
	P2	0,0957
	P3	0,6782
	P4	0,0541
	P5	0,2577
	P6	0,0717
	P7	0,0243*
	P8	0,0033*
	P9	0,5956
Zona II	P10	0,0001*
	P11	0,2793
	P12	0,0991
	P13	0,0043*
	P14	0,0064*
	P15	0,0005*
	P16	0,0001*
	P17	0,0043*
	P18	0,0838
	P19	0,2763
	P20	0,0014*
	P21	0,7189
	P22	0,8361
	P23	0,1083
	P24	0,2918
	P25	0,1567
	P26	0,9074
	P27	0,8476
Zona III	P45	0,8384
	P46	0,0896
	P47	0,0016*
	P48	0,3041
	P49	0,0002*
	P50	0,0000*
	P51	0,8000
	P52	0,1597
	P53	0,0572
	P54	0,0014*
P55	0,8126	

*p-valor < 0,05

Finalmente, se priorizaron los resultados del Modelo ANOVA anidado frente a los del Modelo ANOVA de 1 Factor, es decir, frente a los resultados obtenidos con el cálculo del CCI, debido a las posibles limitaciones de éste anteriormente mencionadas, ya que no tiene en cuenta los dos diferentes momentos en el tiempo en que se realizaron los triplicados.

En la tabla A.7 se resumen los resultados obtenidos con los dos modelos, diferenciando los péptidos en los que no se encontraron diferencias entre triplicados y los péptidos en los que sí existían diferencias estadísticamente significativas.

Tabla A.7. Resumen de las diferencias existentes entre las medidas de los 2 triplicados combinando el Modelo ANOVA anidado y los Coeficientes de Correlación Intraclase (CCI).

ANOVA anidado	CCI $\geq 0,70$	CCI $< 0,70$	Total de péptidos
No existen diferencias entre triplicados	14 péptidos (37%) P1, P2, P3, P9, P12, P19, P21, P23, P27, P45, P46, P51, P52, P55	10 péptidos (26%) P4, P5, P6, P11, P18, P22, P24, P25, P48, P53	24 (63%)
Existen diferencias entre triplicados	3 péptidos (8%) P14, P15, P26	11 péptidos (29%) P7, P8, P10, P13, P16, P17, P20, P47, P49, P50, P54	14 (37%)
Total de péptidos	17 (45%)	21 (55%)	38 (100%)

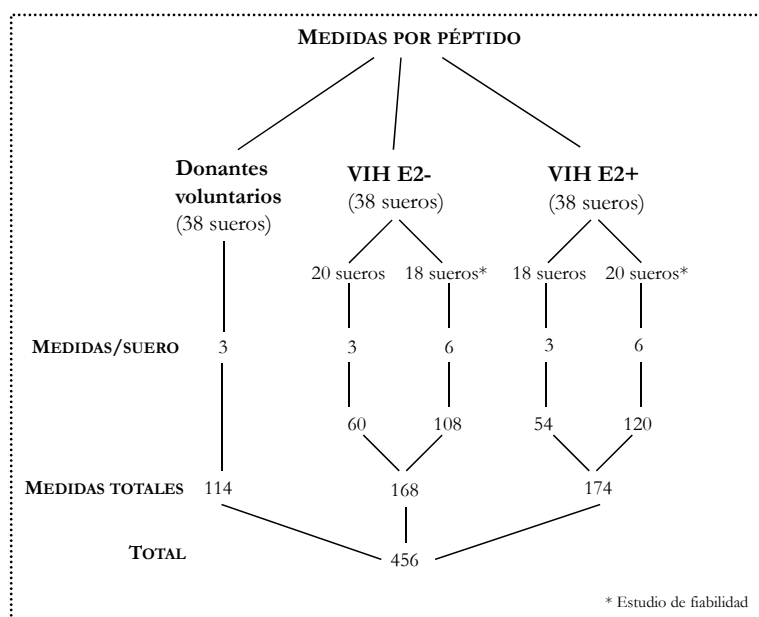
De este modo, considerando más adecuados los resultados obtenidos con el Modelo ANOVA anidado, en un total de 24 péptidos (14+10), que se corresponde con el 63%, los resultados del estudio de fiabilidad fueron suficientemente satisfactorios indicando una aceptable fiabilidad; y en el 37% de los péptidos, los resultados no indicaron una fiabilidad aceptable.

A.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA COMPARACIÓN DE LOS PANELES DE SUEROS

El análisis estadístico de la comparación de los paneles de sueros se llevó a cabo con toda la información de que se disponía. En cada péptido, para las 3 mediciones de los 38 sueros de donantes voluntarios se calculó la mediana de la fluorescencia. Para los 38 sueros del grupo de VIH E2- y los 38 sueros del grupo VIH E2+, se calculó la mediana de la fluorescencia bien de las 6 medidas (incluyendo las 3 mediciones adicionales del estudio de fiabilidad) o bien de las 3 medidas (para los sueros no escogidos en el estudio de fiabilidad). En el esquema 1, se resume el número de medidas por péptido con el que se trabajó para el análisis de la capacidad diagnóstica de los péptidos.

En la tabla 1.7 del apartado 1.3.2 de Resultados y discusión, se muestran los valores de la mediana de fluorescencia y el rango intercuartílico para cada péptido con los sueros estudiados (BS, VIH E2- y VIH E2+), tras la incorporación de los resultados del experimento de fiabilidad a los del primer ensayo. En la figura 1.14 (apdo. 1.3.2) se representan los valores de fluorescencia para cada péptido con los sueros estudiados.

Esquema 1. Número de mediciones de los sueros de las distintas bases de datos por péptido. VIH E2-, grupo de sueros procedentes del panel de pacientes infectados por VIH-1 sin presencia de anticuerpos anti-E2 del GBV-C; VIH E2+, grupo de sueros procedente del panel de pacientes infectados por VIH-1 con anticuerpos anti-E2 del GBV-C.



Estos datos de fluorescencia se compararon mediante pruebas estadísticas no paramétricas, empleando la prueba estadística del Test de Suma de Rangos de Wilcoxon^{242, 243}, que contrasta la hipótesis de que dos muestras independientes proceden de dos poblaciones con la misma distribución. El nivel de significación o error de tipo I se fijó en $\alpha = 0,05$.

En la comparación de los distintos paneles de sueros se llevaron a cabo un total de 80 contrastes. Debido a las múltiples comparaciones realizadas, se corrigió el nivel de significación seleccionando los 40 p-valores (38 péptidos más 2 péptidos control) de los contrastes de hipótesis al comparar los 2 grupos de sueros (VIH E2+ y VIH E2-), se ordenaron de menor a mayor y se aplicó el procedimiento para múltiples contrastes denominado *False Discovery Rate* (FDR)^{244, 245}, seleccionando como valor $q^* = \alpha = 0,05$; y escogiendo como método para el cálculo de la secuencia de los p-valores críticos individuales (para cada comparación) el método propuesto por Simes^{244, 246, 247}. Los resultados se resumen en la tabla A.8, donde se comparan por un lado los valores de fluorescencia obtenidos para el panel de sueros de donantes voluntarios con los sueros del grupo VIH E2- (primera comparación), y por otro lado se comparan los grupos VIH E2- y VIH E2+, del panel de sueros de pacientes infectados por VIH-1 (segunda comparación).

Analizando los resultados de la tabla, pueden diferenciarse cinco situaciones posibles:

- Cuando el p-valor es mayor que el $\alpha_{\text{corregido}}$, y por tanto no existen diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las dos comparaciones (ej.: P27, P53).
- Cuando el p-valor es menor o igual que el $\alpha_{\text{corregido}}$ de la primera comparación pero no existen diferencias estadísticamente significativas entre los sueros de la segunda comparación (ej.: P2, P7, P49).
- Cuando en ambas comparaciones el p-valor es menor o igual que el $\alpha_{\text{corregido}}$, es decir, existen diferencias estadísticamente significativas entre los sueros del panel de banco de sangre y el grupo VIH E2- y existen también diferencias significativas entre los sueros de los grupos VIH E2- y VIH E2+ (ej.: P3, P12, P51), (sombreados en la tabla A.8).
- Cuando en ambas comparaciones el p-valor es menor o igual que el $\alpha_{\text{corregido}}$, pero los valores de fluorescencia mediana eran inferiores a 1.000 unidades (ej: P5, P25).
- Cuando los valores de fluorescencia de los sueros del panel de banco de sangre son mayores que los valores de los sueros del panel de infectados por VIH-1, o cuando los valores del grupo VIH E2- son mayores que los del VIH E2+ (ej.: P1, P9, P45), (señalados con línea punteada en la tabla A.8).

Tabla A.8. Resultados de las comparaciones por múltiples contrastes mediante *False Discovery Rate* (FDR) entre el panel de sueros de banco de sangre (BS) y el grupo de sueros VIH E2-; y entre el grupo VIH E2- con el grupo de sueros VIH E2+. Se indica el p-valor del contraste de la Suma de Rangos de Wilcoxon, y $\alpha_{\text{corregido}}$ del FDR por el método Simes. C1 y C2, péptidos control. Los péptidos seleccionados se marcan sombreados. La línea punteada indica valores de fluorescencia incoherentes (intensidad de BS > intensidad VIH E2-/E2+)

	Péptido	BS/VIH E2-		VIH E2-/VIH E2+	
		p-valor	$\alpha_{\text{corregido}}$	p-valor	$\alpha_{\text{corregido}}$
Zona I	P1	---		---	
	P2	0,0239*	0,0350	0,4907	0,0457
	P3	0,0000*	0,0007	0,0000*	0,0129
	P4	0,0000*	0,0014	0,0000*	0,0136
	P5	0,0000*	0,0021	0,0003*	0,0236
	P6	0,0175*	0,0343	0,0000*	0,0143
	P7	0,0008*	0,0257	0,9316	0,0500
	P8	0,0008*	0,0264	0,1433	0,0379
	P9	---		0,1125	0,0364
Zona II	P10	0,0007*	0,0250	0,0001*	0,0221
	P11	0,0000*	0,0029	0,0128*	0,0336
	P12	0,0000*	0,0036	0,0009*	0,0271
	P13	0,0000*	0,0043	0,0000*	0,0150
	P14	0,0000*	0,0050	0,0000*	0,0157
	P15	0,0000*	0,0057	0,0000*	0,0164
	P16	0,0000*	0,0064	0,0000*	0,0171
	P17	0,0000*	0,0071	0,0000*	0,0179
	P18	0,0000*	0,0079	0,0000*	0,0186
	P19	0,0000*	0,0086	0,0000*	0,0193
	P20	0,0268*	0,0357	0,0000*	0,0200
	P21	0,0000*	0,0093	0,3264	0,0421
	P22	0,0000*	0,0100	0,1823	0,0407
	P23	0,0064*	0,0321	0,2023	0,0414
	P24	0,0000*	0,0107	0,0000*	0,0207
	P25	0,0027*	0,0286	0,0039*	0,0293
	P26	---		0,6538	0,0464
P27	0,3617	0,0429	0,1809	0,0400	
Zona III	P45	---		0,9285	0,0493
	P46	---		0,3993	0,0436
	P47	---		0,4277	0,0450
	P48	---		0,0054*	0,0314
	P49	0,0005*	0,0243	0,7403	0,0471
	P50	0,0000*	0,0114	0,9233	0,0486
	P51	0,0002*	0,0229	0,0044*	0,0307
	P52	0,0000*	0,0121	0,0000*	0,0214
	P53	0,1500	0,0386	0,7815	0,0479
	P54	0,0016*	0,0279	0,0042*	0,0300
	P55	---		0,1570	0,0393
Controles	C1	---		0,1152	0,0371
	C2	0,0105*	0,0329	0,4113	0,0443

* p-valor < $\alpha_{\text{corregido}}$

A.3. SÍNTESIS DE 3-MERCAPTOPROPANAMIDA

La 3-mercaptopropanamida es una molécula no comercial que se sintetizó en colaboración con el Prof. Weng C. Chan, en el *Centre for Biomolecular Science* de la Universidad de Nottingham en Reino Unido, para posteriormente derivatizar el extremo C-terminal de los péptidos lineales. La síntesis de esta molécula consta principalmente de tres pasos: la protección del grupo tiol del ácido 3-mercaptopropiónico, la formación del grupo amida activando previamente el grupo carboxilo con N-hidroxisuccinamida (NHS), y finalmente, la eliminación del grupo protector para obtener la 3-mercaptopropanamida. Se siguió el procedimiento indicado en el apartado 3.7.1 de Materiales y métodos. El esquema de síntesis se detalla en la figura A.5.

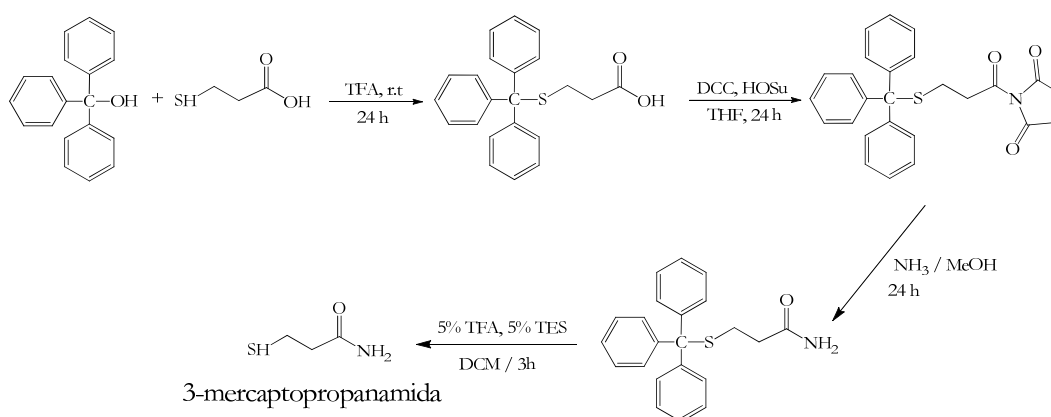


Figura A.5. Esquema de síntesis de 3-mercaptopropanamida.

- Síntesis del ácido 3-tritilmercaptopropiónico

Se llevó a cabo la reacción de trifenilmetanol con ácido 3-mercaptopropiónico en TFA. Ésta se monitorizó mediante cromatografía en capa fina (CCF) en diclorometano (DCM): metanol (MeOH) 9:1. Tras eliminar el TFA a presión reducida y lavar el sólido con agua MilliQ, se recristalizó en tolueno. Los cristales se caracterizaron mediante CCF, H-RMN y espectrometría de masas (electrospray en modo negativo, ES), y se midió su punto de fusión. Los resultados se muestran en la tabla A.9 y figura A.6.

Tabla A.9. Caracterización del ácido 3-tritilmercaptopropiónico mediante CCF, ES⁻, RMN y punto de fusión.

Resultados			
Rendimiento (%)		70	
Punto de fusión (°C)		209,2 – 212,9	
R _f		0,57	
ES ⁻ (m/z)		Experimental	Calculada
		347,1132	347,1111
H-RMN d ⁶ -DMSO		δ _H (ppm)	J _H (Hz)
	(CH ₂) ¹	2,18	6,8; t
	(CH ₂) ²	2,29	7,0; t
	(tritol)	7,24-7,38	15 H; m
	(COOH)	12,25	1 H; s

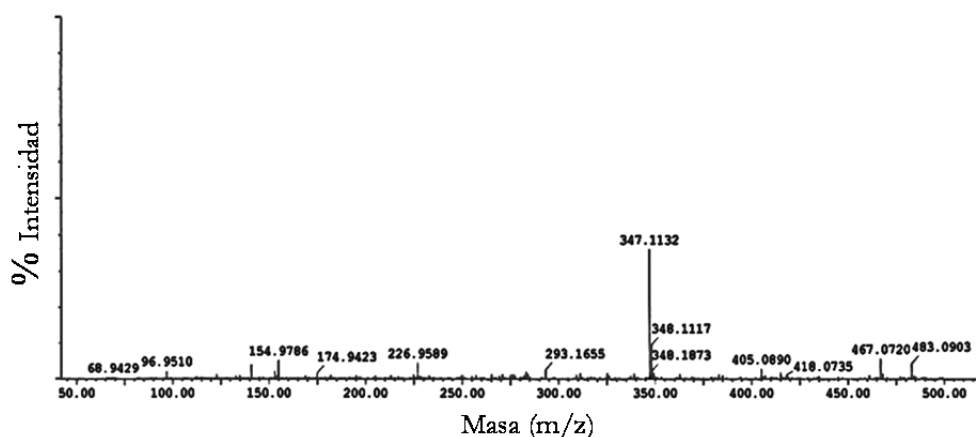


Figura A.6. Espectro de masas (ES) del ácido 3-tritilmercaptopropiónico.

- Síntesis de 3-tritilmercaptopropanamida

En primer lugar, se llevó a cabo la activación del ácido carboxílico con N-hidroxisuccinamida y diciclohexilcarbodiimida (DCC) en tetrahidrofurano (THF). La reacción se siguió mediante CCF (DCM:MeOH, 9:1). Como subproducto de la reacción se obtuvo diciclohexilurea (DCU), que fue eliminada por filtración. El sobrenadante se secó a presión reducida y se caracterizó mediante H-RMN y espectrometría de masas en modo positivo (ES⁺). Seguidamente se derivatizó el grupo ácido a amida en presencia de 2M NH₃/MeOH en DMF. Pasado el tiempo

de reacción, se aisló el producto de reacción y se caracterizó mediante CCF, H-RMN y ES⁺. Los resultados se muestran en la tabla A.10 y figura A.7.

Tabla A.10. Caracterización del ácido 3-tritilmercaptopropanamida mediante CCF, ES⁺ y RMN.

Resultados			
Rendimiento (%)		94	
R _f		0,56	
ES ⁺ (m/z)		Experimental	Calculada
		347,1306	347,1344
H-RMN CD ₃ OD		δ _H (ppm)	J _H (Hz)
	(CH ₂) ¹	2,06	6,7; t
	(CH ₂) ²	2,51	6.7; t
	(tritol)	7,21-7,39	15 H; m
	(CONH ₂)	5,35	2 H; s

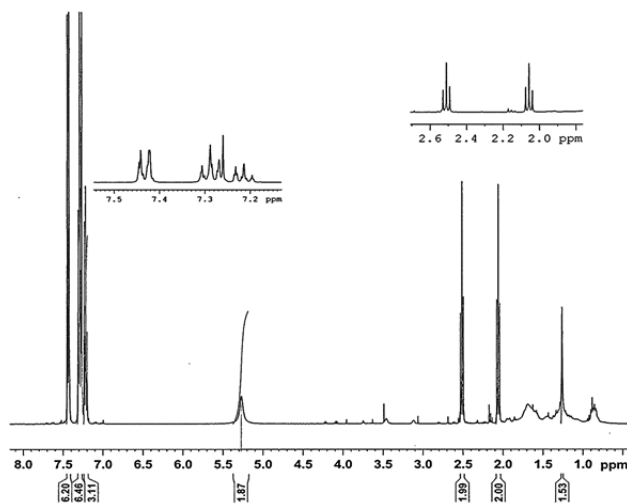


Figura A.7. Espectro monodimensional de H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) correspondiente a 3-tritilmercaptopropanamida.

- Obtención de 3-mercaptopropanamida

Se eliminó el grupo tritilo mediante 5% TFA en diclorometano con 5% de trietilsilano (TES). Pasado el tiempo de reacción, se eliminó el DCM a presión reducida y se realizaron lavados con hexano. El sólido se caracterizó mediante CCF, punto de fusión, H-RMN y espectrometría de masas (ES^+). Sin embargo, no fue posible observar la masa del producto 3-mercaptopropanamida, por lo que su presencia se confirmó mediante H-RMN. Los resultados se muestran en la tabla A.11 y figura A.8.

Tabla A.11. Caracterización del ácido 3-mercaptopropanamida mediante CCF, RMN y punto de fusión.

Resultados			
Rendimiento (%)		96	
Punto de fusión (°C)		89,6-91,4	
R_f		0,66	
Masa exacta calculada*		105,0248	
H-RMN CD_3OD		δ_H (ppm)	J_H (Hz)
	$(CH_2)^1$	2,58	5,2; t
	$(CH_2)^2$	2,83	2 H; m
	(HS)	1,69	8; t
	$(CONH_2)$	5,68	2 H; s

* La masa de 3-mercaptopropanamida no pudo observarse mediante ES^+ ya que no tiene grupos funcionales susceptibles de protonarse, su presencia se confirmó mediante H-RMN.

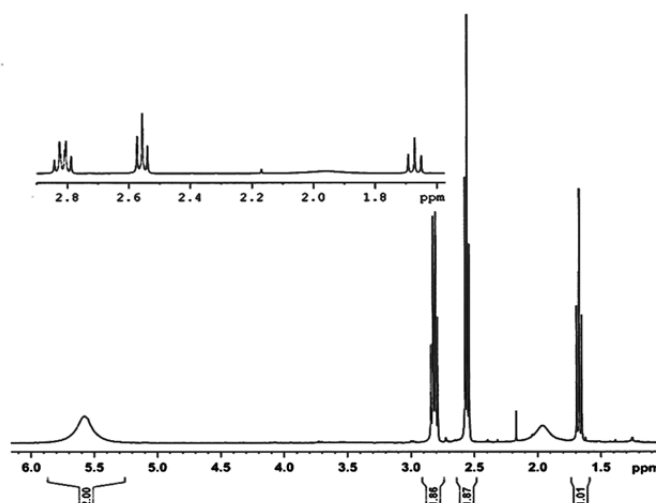


Figura A.8. Espectro monodimensional de H-RMN (CD_3OD , 400 MHz) correspondiente a 3-mercaptopropanamida.

A.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS N-CISTEINIL-PÉPTIDOS LINEALES

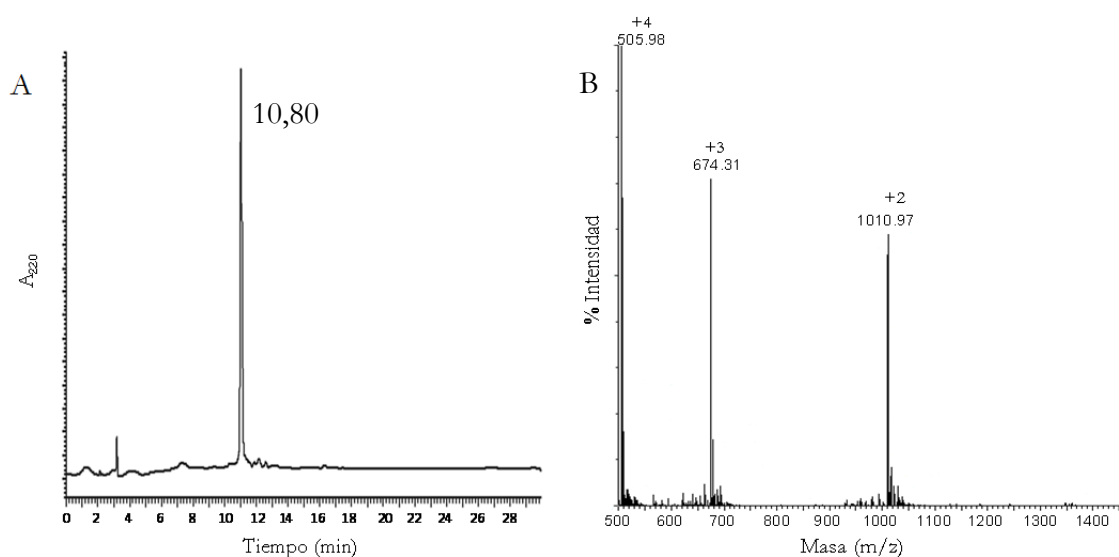


Figura A.9. A) Espectro de HPLC del péptido Cys-NS4a(27-43). Columna fase reversa Kromasil C_{18} (250 x 4,6 mm) 5 μ m, gradiente lineal de 95% a 5% de A en 30 minutos, flujo de 1 ml/min, detección 220 nm (A: H_2O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA); $t_R = 10,80$ min. B) Espectro de masas (ES^+). Masa calculada = 2020,1 g/mol; masa experimental = 2019,9 g/mol.

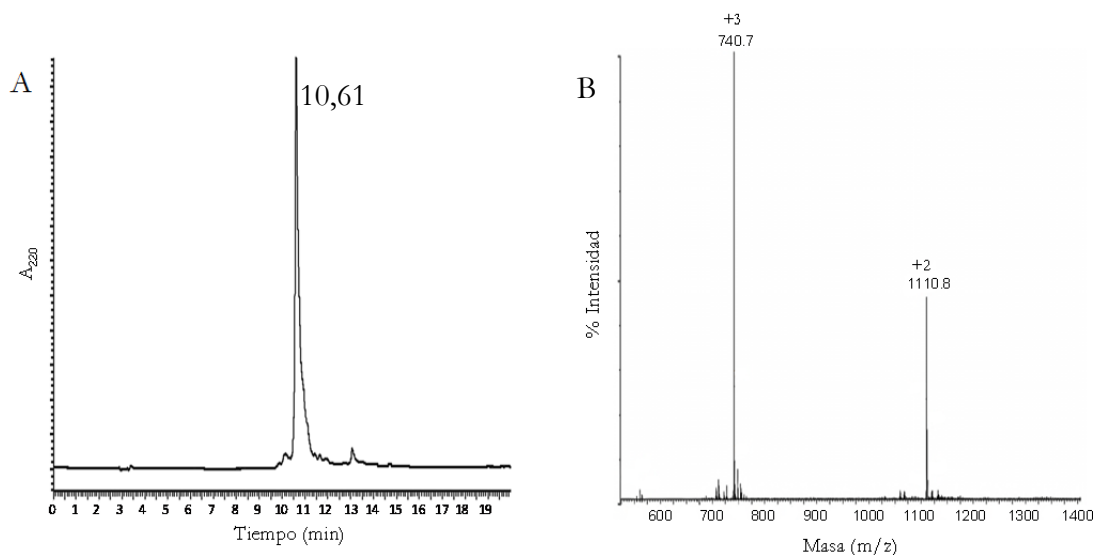


Figura A.10. A) Espectro de HPLC del péptido Cys-LP1 $_{E2}$. Columna fase reversa Kromasil C_{18} (250 x 4,6 mm) 5 μ m, gradiente lineal de 95% a 5% de A en 20 minutos, flujo de 1 ml/min, detección 220 nm. (A: H_2O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA); $t_R = 10,61$ min. B) Espectro de masas (ES^+). Masa calculada = 2219,1 g/mol; masa experimental = 2219,4 g/mol

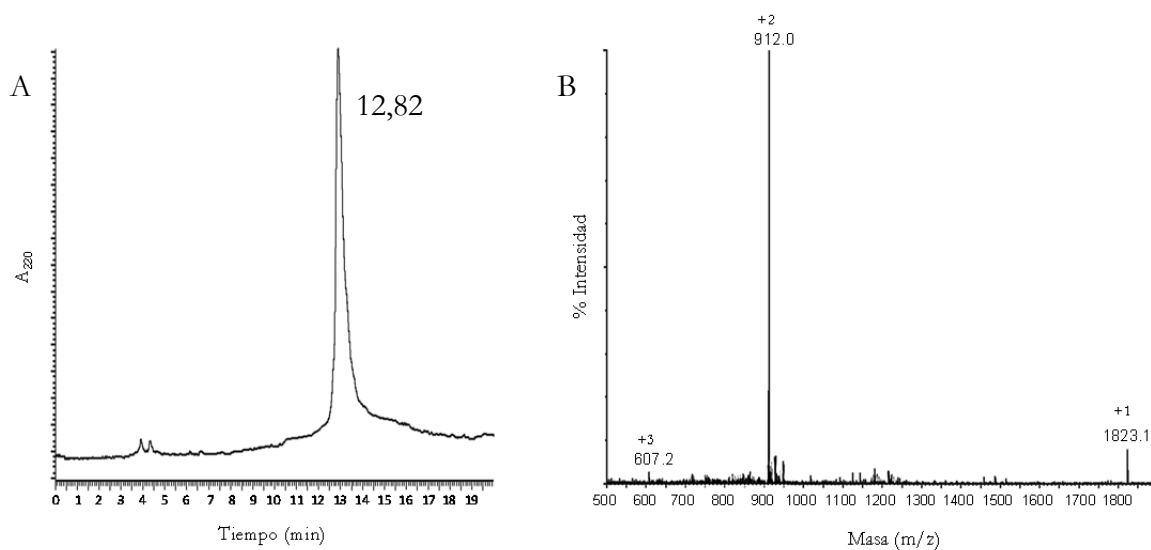


Figura A.11. A) Espectro de HPLC del péptido Cys-LP2_{E2}. Columna fase reversa Kromasil C₁₈ (250 x 4,6 mm) 5 μ m, gradiente lineal de 95% a 5% de A en 20 minutos, flujo de 1 ml/min, detección 220 nm (A: H₂O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA); t_R = 12,82 min. B) Espectro de masas (ES⁺). Masa calculada = 1821,8 g/mol; masa experimental = 1822,1 g/mol.

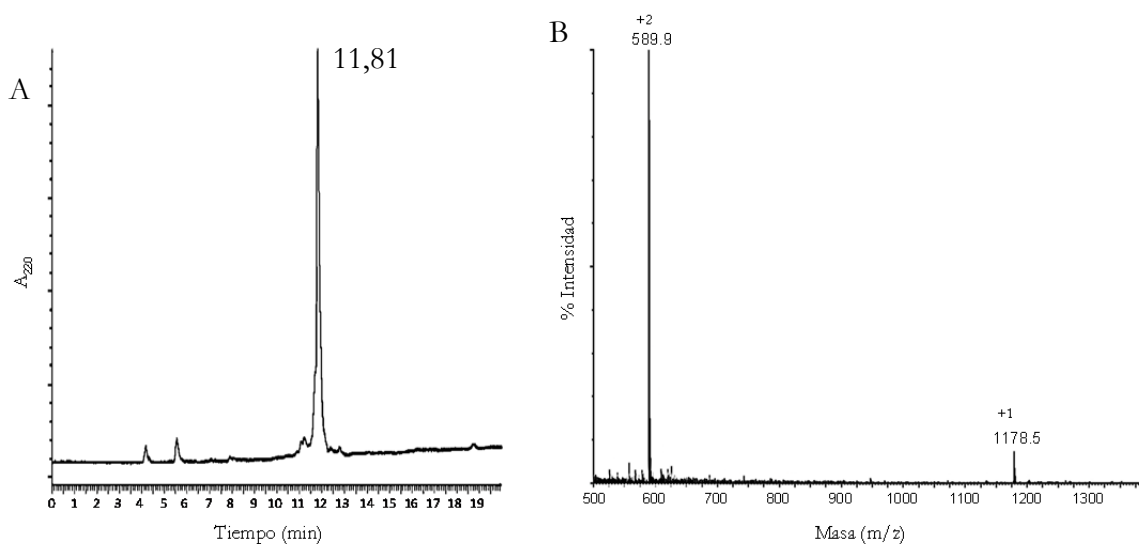


Figura A.12. A) Espectro de HPLC del péptido Cys-LP3_{E2}. Columna fase reversa Kromasil C₁₈ (250 x 4,6 mm) 5 μ m, gradiente lineal de 95% a 5% de A en 20 minutos, flujo de 1 ml/min, detección 220 nm (A: H₂O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA); t_R = 11,81 min. B) Espectro de masas (ES⁺). Masa calculada = 1177,5 g/mol; masa experimental = 1177,7 g/mol.

A.5. ESPECTROS MALDI-TOF DE LOS N-CISTEINIL-PÉPTIDOS DERIVATIZADOS COMO TIOÉSTER EN EL EXTREMO C-TERMINAL

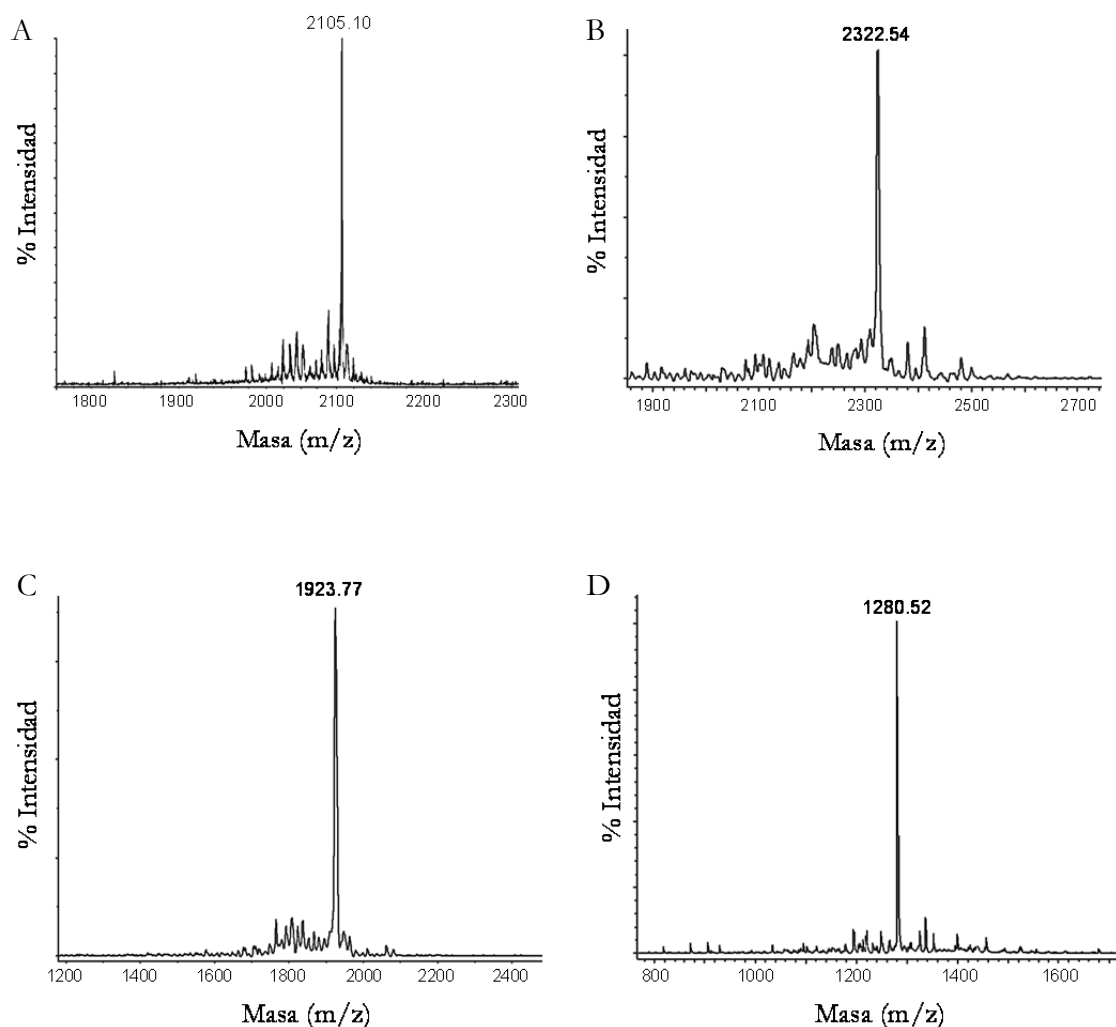


Figura A.13. Espectros de masas MALDI-TOF de los N-cisteinil-péptidos lineales derivatizados como tioéster en el extremo C-terminal. A) NS4a(27-43)-COSCH₂CH₂CONH₂, masa calculada = 2105,90 g/mol, masa experimental = 2105,10g/mol; B) E2(7-26)-COSCH₂CH₂COOCH₃, masa calculada = 2322,08 g/mol, masa experimental = 2322,54 g/mol; C) E2(11-26)-COSCH₂CH₂COOCH₃, masa calculada = 1923,86 g/mol, masa experimental = 1923,77 g/mol; D) E2(17-26)-COSCH₂CH₂COOCH₃, masa calculada = 1279,54 g/mol, masa experimental = 1280,52 g/mol. Matriz DHB; método LP.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En esta tesis se ha abordado el diseño y la puesta a punto de un sistema diagnóstico de la infección causada por el GBV-C en pacientes infectados por el VIH-1. Con este fin, se han empleado dos tecnologías diferentes utilizando péptidos sintéticos, el ensayo inmunoenzimático de ELISA y la técnica de microarrays. Asimismo, se ha estudiado la capacidad de las construcciones peptídicas de inhibir la entrada del VIH-1 a la célula, con la finalidad de conocer su potencial aplicación como agentes terapéuticos contra dicho virus.

Las conclusiones obtenidas de la presente tesis se exponen a continuación:

- ❖ Se ha llevado a cabo un estudio detallado de antigenicidad de la proteína de envoltura E2 del GBV-C empleando la técnica de microarrays. Para ello, se prepararon microarrays peptídicos con 124 secuencias lineales, compuestas de 18 aminoácidos, que barrían toda la proteína de envuelta del virus.
 - La puesta a punto de las mejores condiciones de análisis, junto con el estudio de fiabilidad y el análisis estadístico de los resultados obtenidos, permitieron seleccionar 11 péptidos con una buena relación especificidad/sensibilidad y un alto porcentaje de sueros correctamente clasificados. Los epítomos seleccionados corresponden con los dominios (7-26), (34-87) y (159-176) de la proteína de envuelta E2 del GBV-C.
 - Los epítomos seleccionados son capaces de diferenciar significativamente entre sueros de pacientes infectados por el VIH-1 con anticuerpos anti-E2 del GBV-C, sueros de pacientes infectados por el VIH-1 sin anticuerpos anti-E2 del GBV-C y sueros de personas sanas. El área bajo la curva ROC en 10 de los 11 péptidos fue superior a 0,9, indicando una excelente capacidad discriminativa.
 - El estudio de la proteína E2 del GBV-C por microarrays refuerza la importancia de la región N-terminal de dicha proteína en el diagnóstico de infección por el GBV-C.
- ❖ Se han obtenido diversas construcciones peptídicas derivadas del dominio N-terminal de la proteína E2 del GBV-C. Para ello, se han empleado dos metodologías distintas de síntesis

de péptidos como son la síntesis secuencial en fase sólida y la ligación quimioselectiva en solución.

- Se ha conseguido sintetizar en fase sólida y purificar hasta un grado del 95% tres MAPs tetraméricos de tipo lineal homogéneos (MAP_{LP1} , MAP_{LP2} y MAP_{LP3}) y uno heterogéneo ($\text{MAP}_{\text{E2/NS4}}$).
 - Para la obtención de los MAPs de tipo cíclico (MAP_{CP1} , MAP_{CP2} , MAP_{CP3}) se ha realizado una reacción quimioselectiva mediante la alquilación de tioles por grupos cloroacetilos.
 - En primer lugar, se han obtenido péptidos cíclicos cabeza-cola (CP1, CP2 y CP3) mediante la reacción de Ligación Química Nativa intramolecular con una pureza superior al 95%.
 - La incorporación de los ciclos de mayor tamaño, CP1 y CP2, al núcleo de oligolisinas derivatizado no condujo a la obtención del producto deseado. Sólo fue posible la incorporación de 1 ó 2 copias de los correspondientes péptidos cíclicos al núcleo de lisinas tetracloroacetilado.
 - Únicamente se identificó el $\text{MAP}_{\text{CP3-4}}$, que contenía 4 copias del péptido cíclico CP3. Dada la dificultad del proceso de purificación de este tipo de estructuras ramificadas, el producto final se obtuvo con una pureza de aproximadamente el 75%.
- ❖ Se realizaron ensayos de fusión celular con el fin de evaluar la actividad anti-VIH-1 de las construcciones que derivan del dominio N-terminal de la proteína E2 del GBV-C.
- Las diferentes formas de presentación de la región E2(7-26) del GBV-C no dan lugar a una disminución sustancial de la concentración necesaria para inhibir la entrada del virus en la célula en relación al compuesto de referencia.
 - Se observa una tendencia de las construcciones de tipo cíclico hacia una mayor inhibición de la fusión celular en comparación con las respectivas secuencias lineales. En este sentido, la ciclación cabeza-cola puede ser considerada una estrategia útil en el desarrollo de potenciales agentes terapéuticos contra el VIH-1.
- ❖ Se comparó la capacidad antigénica de las moléculas peptídicas sintetizadas mediante la técnica de ELISA. Para ello, se estudió la reactividad serológica de todas las construcciones peptídicas empleando sueros de pacientes infectados por el VIH-1, de los que se desconocía su coinfección con el GBV-C, y se comparó con el péptido de referencia LP1_{E2} .

- Ni los péptidos de menor tamaño derivados de la secuencia peptídica E2(7-26), ni sus correspondientes ciclos o péptidos ramificados alcanzan la reactividad serológica encontrada para el péptido LP1_{E2}.
 - Estos resultados refuerzan la potencial utilidad de la versión lineal de la región E2(7-26) para el desarrollo de nuevos sistemas de diagnóstico de anticuerpos anti-GBV-C en pacientes infectados por el VIH, basados en péptidos.
- ❖ Se ha evaluado el valor diagnóstico de anticuerpos anti-péptido derivados de la proteína E2 del GBV.C en pacientes infectados por el VIH-1.
- Los 11 péptidos seleccionados en el estudio antigénico de la proteína E2 permitieron establecer una reactividad del 47% en cuanto a la detección de anticuerpos anti-péptidos del GBV-C mediante la utilización de la técnica de microarrays. Así, se demuestra la utilidad de los péptidos sintéticos como potenciales antígenos para el desarrollo de un sistema de diagnóstico de la infección del GBV-C.
 - Los microarrays de péptidos de la proteína E2 del GBV-C pueden considerarse una buena herramienta para el diagnóstico de la infección causada por el GBV-C. Esta metodología permite el análisis simultáneo de varios epítomos, miniaturiza la técnica de ELISA, reduce considerablemente tanto el tiempo como la cantidad de suero y péptido necesaria para llevar a cabo el ensayo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS Y DISOLVENTES

Tabla 1. Relación de reactivos y disolventes empleados, junto con las casas comerciales correspondientes.

Casa comercial	Reactivos
Calbiochem	tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP)
Carlo Erba	Acetona Bromuro de litio (LiBr) Etanol absoluto
Fluka	N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) 1-hidroxibenzotriazol (HOBt)
Genscript	HATU Hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo-[4,5-b]piridin-1-il-metilen]-N-metilmetanaminio
Merck	Cianuro potásico (KCN) Diclorometano (DCM) Éter dietílico Fenol Metanol (MeOH) Ninhidrina (2,2-dihidroxi-1,3-indanodiona) Resina Amberlite MB-3
Multisynthtech	Aminoácidos PyBOP Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(pirrolidin)fosfonio
NovaBiochem	Aminoácidos: Fmoc-Abu-OH, Boc-Cys(trt)-OH Resinas TBTU Tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamonio Hidrocloruro de 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (WSCDI· HCl)
Scharlau	Acetonitrilo Ácido acético Ácido trifluoroacético (TFA) N,N-dimetilformaamida (DMF)
Sigma	Ácido cítrico Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1,8-diazabicyclo-undec-7-ene (DBU) N,N-diisopropiletilamina (DIEA) Dimetilsulfóxido (DMSO) Hidrocloruro de guanidina Piperidina Piridina Triisopropilsilano (TIS) Yoduro de tetrabutilamonio (TBAI)

Tabla 2. Productos empleados en los ensayos de ELISA y Microarrays.

Casa comercial	Reactivos
Carlo Erba	Cloruro sódico (NaCl)
Dako	Anticuerpo policlonal IgG/HRP de conejo (ELISA)
Fluka	Tritón X-100
Merck	Cloruro potásico (KCl) Dihidrogenofosfato de potasio (KH_2PO_4) Hidrogenocarbonato de sodio (NaHCO_3) Hidrogenofosfato de disodio anhidro (Na_2HPO_4) Tris(hidroximetil)-aminometano (TRIS) Tritón X-100
Jackson ImmunoResearch	Anticuerpo anti-Humano IgG de mono marcado con Dylight 649 (Microarrays)
Panreac	Carbonato de sodio (Na_2CO_3)
Sigma	Ácido cítrico Albúmina sérica bovina (BSA) Deoxicolato sódico Dimetilsulfóxido (DMSO) Dodecil sulfato sódico (SDS) O-fenilendiamina (OPD) Peróxido de hidrógeno Tween-20

Tabla 3. Productos empleados en los ensayos celulares.

Casa comercial	Reactivos
Invitrogen	Suero fetal bovino (FBS)
AIDS Reagent	C-34 (Cat. No 9824) TZM-bl (Cat. No 8129)
PAA	Penicilina-estreptomina Tampón fosfato estéril (PBS)
Sigma	Cloruro de Magnesio (MgCl_2) 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) Dulbecco's Modified Eagle's D5796 (DMEM) Igepal (Octilfenil-polietilenglicol)

2. INSTRUMENTACIÓN GENERAL

Tabla 4. Instrumentos empleados y marca correspondiente.

Instrumento	Marca
Agitador magnético	Heildoph
Balanzas	Sartorius Analytic A200S
Baño de ultrasonidos	Selecta
Centrífuga	Beckman GP
Columnas HPLC analítico	C ₁₈ y C ₈ Kromasil, Technokroma, 5 µm, 46 x 250 mm C ₁₈ Poroshel 300-SB, Agilent, 5 µm, 2,1 x 75 mm
Columnas HPLC semipreparativo	C ₁₈ y C ₈ Kromasil, Technokroma, 5 µm, 22 x 250 mm
Columna UPLC-MS	C ₁₈ ACQUITY UPLC BEH, Waters 1,7 µm 2,1 x 100 mm C ₁₈ UHPLC Zorbax SB, Agilent, 1,8 µm 2,1 x 150 mm
Escáner de microarrays	GenePix 4000B
Espectrofotómetro	SpectraMax M5
Espectrómetro de masas MALDI-TOF	Autofelx III Smartbeam (Bruker Daltonics)
Espectrómetro RMN	Bruker 400
Equipo de agua milli-Q	Millipore
Estufa	Selecta
Detector líquido-masas de tiempo de vuelo	LCT Premier XE (Micromass Waters)
Detector ultravioleta acoplado a LC-TOF	UPLC ACQUITY (Waters)
HPLC analítico	Perkin- Elmer LC-250, detector Diodo Array LC-235 Agilent 1260 Infinity
HPLC semipreparativo	Waters Prep LC 4000 System, detector L-4000 UV Merck (HITACHI). Agilent 1260 Infinity
Impresor de proteínas	ArrayIt
Liofilizadora	Lioalfa, Telstar
Microscopio óptico invertido	Leica
pHmetro	Crison
Pipetas automáticas	Gibson, Thermo, Eppendorf
Placas ensayos celulares	Cultek (cat. No. 15-3596)
Placas ELISA	DNA-Bind™ (Costar) Nunc Immobilizer™ Amino (Nunc)
Placa MALDI-TOF	MTP 384 target plate polished steel (Bruker)
Placa microarrays	ArrayIt
Portaobjetos microarrays (<i>slide</i>)	Corning
Puntas de impresión (<i>pins</i>)	946MP4, ArrayIt

3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES DE LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS

3.1 MÉTODOS DE ACOPLAMIENTO

Todos los péptidos se sintetizaron siguiendo la estrategia Fmoc/tBu. A continuación se detallan los procesos de las diferentes etapas que tienen lugar durante la síntesis de péptidos en fase sólida. Con el fin de obtener péptidos con el extremo C-terminal en forma de amida, se utilizó la resina 4-(2',4'-dimetoxifenilaminometil)-fenoxiacetamida (NovaSyn TGR) con una funcionalización de 0,29 mmol/g; mientras que para la obtención de péptidos protegidos y el extremo C-terminal en forma de ácido se utilizó la resina cloruro de 2-clorotritilo (Cl-trt), con un grado de funcionalización de 1,3 mmol/g.

3.1.1. Incorporación del primer aminoácido

3.1.1.1. Resina NovaSyn TGR

La incorporación del aminoácido C-terminal sobre la resina NovaSyn TGR se realiza mediante la formación de un enlace amida. En primer lugar, se hinchó la resina con DMF entre 1 y 2 horas. Tras eliminar el DMF, se adicionó el primer aminoácido (3-4 eq.) junto con el HATU (3-4eq.) y DIEA (6-8 eq.) disueltos en DMF y se dejó reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente agitando frecuentemente. Posteriormente, se eliminó el exceso de reactivos y se lavó la resina con DMF (5 x 1 min).

3.1.1.2. Resina Cloruro de 2-Clorotritilo

La incorporación del residuo C-terminal en la resina Cl-trt se realiza mediante una reacción de sustitución nucleófila y se lleva a cabo en defecto de equivalentes para disminuir la funcionalización (de 1,3 mmol/g a 0,65 mmol/g) para evitar el riesgo de agregación de la cadena peptídica durante la síntesis. Además, se han de tomar ciertas precauciones en la utilización de esta resina ya que es sensible a la humedad: debe colocarse en el desecador con KOH antes de su uso, el diclorometano (DCM) utilizado para hinchar la resina se debe purificar previamente utilizando una columna de alúmina básica y el material a utilizar ha de estar bien seco. Antes de

comenzar la síntesis, se hinchó la resina con 0,1% de DIEA en 1-2 ml de DCM durante 15 minutos, agitando suavemente. Se comprobó el pH y se añadieron unas gotas de DIEA hasta pH~8. Se filtró la resina y se adicionó el aminoácido (0,5 eq.) protegido en su extremo N-terminal con el grupo Fmoc, Fmoc-Gly-OH, disuelto en 3 ml de DCM y junto con 2 eq. de DIEA. La mezcla se agitó durante una hora, reduciendo así la funcionalización de la resina. Después, se lavó con 3-5 ml de DCM (3 x 1 min), con 5 ml de DMF (2 x 1 min) y de nuevo con 5 ml de DCM (2 x 1 min). Se secó sobre KOH en el desecador durante 24 h a temperatura ambiente y se determinó el grado de unión del aminoácido (apartado 3.1.2). Posteriormente, se añadieron 5 ml de una solución de DCM:MeOH:DIEA (17:2:1) (4 x 5 min), de esta manera se bloquearon todos los puntos reactivos de la resina en los que no se había incorporado el primer aminoácido. Finalmente, se lavó la resina con 5 ml de DCM (3 x 1 min), 5 ml de DMF (2 x 1 min) y 5 ml de DCM (2 x 1 min).

3.1.2. Determinación del grado de unión del primer aminoácido

Este ensayo permite determinar el porcentaje de incorporación del primer aminoácido en la resina y así la funcionalización inicial real de ésta. Para ello, se realiza la cuantificación del grupo Fmoc tras su separación del extremo N-terminal mediante tratamiento con piperidina, que da lugar a la formación del aducto N-fluorenilmetilpiperidina.

Para llevar a cabo el ensayo, que se realiza por duplicado, se pesó en dos tubos de ensayo una cantidad de Fmoc-Gly-resina seca equivalente a 1 μ mol respecto a la funcionalización de la resina y se añadieron 3 ml de una disolución de 20% de piperidina en DMF, agitando suavemente durante 10 minutos. La solución de ambos tubos se pasó a sendas cubetas de cuarzo. Paralelamente, se preparó el blanco, únicamente la solución piperidina/DMF. Se midió la absorbancia en cada caso a la longitud de onda de 290 nm y se calculó la nueva funcionalización de la resina mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Funcionalización (mmol/g)} = (A_{\text{muestra}} - A_{\text{referencia}}) \times 16,4 / \text{mg}_{\text{resina}}$$

3.1.3. Incorporación de los aminoácidos de la secuencia peptídica

En la síntesis del MAP tetramérico heterogéneo lineal se emplearon HOBt y DIPCDI como activadores (tabla 5), y en los casos en que el acoplamiento era incompleto, se repitió la reacción empleando TBTU y DIEA (tabla 6).

Se emplearon diferentes métodos de acoplamiento en la síntesis de los péptidos. En la síntesis de los péptidos lineales y MAPs tetraméricos lineales se utilizó HATU y DIEA como activadores del grupo carboxilo disueltos en DMF (tabla 7). En los casos en que los acoplamientos fueron incompletos, se repitió la reacción en las mismas condiciones. Si aún así éstos seguían sin completarse, se utilizaron los activadores HOBt y DIPCDI, dejando la reacción toda la noche (tabla 8).

Tabla 5. Método A de acoplamiento de aminoácidos. X, grupo protector de la cadena lateral de los aminoácidos.

Etapa	Reactivos	Operación	Tiempo (min x repeticiones)
1	Fmoc-aa(X)-OH:HOBt:DIPCDI 3:3:3 eq. en DMF	Acoplamiento	150 x 1
2	DMF	Lavado	1 x 5
3	Test colorimétrico		

Tabla 6. Método B de acoplamiento de aminoácidos. X, grupo protector de la cadena lateral de los aminoácidos.

Etapa	Reactivos	Operación	Tiempo (min x repeticiones)
1	Fmoc-aa(X)-OH:TBTU:DIEA 3:3:6 eq. en DMF	Acoplamiento	150 x 1
2	DMF	Lavado	1 x 5
3	Test colorimétrico		

Tabla 7. Método C de acoplamiento de aminoácidos. X, grupo protector de la cadena lateral de los aminoácidos.

Etapa	Reactivos	Operación	Tiempo (min x repeticiones)
1	Fmoc-aa(X)-OH:HATU:DIEA 3:3:6 eq. en DMF	Acoplamiento	30 x 1
2	DMF	Lavado	1 x 5
3	Test colorimétrico		

Tabla 8. Método D de acoplamiento de aminoácidos. X, grupo protector de la cadena lateral de los aminoácidos.

Etapa	Reactivos	Operación	Tiempo (horas x repeticiones)
1	Fmoc-aa(X)-OH:HOBt:DIPCDI 3:3:3 eq. en DMF	Acoplamiento	12 x 1
2	DMF	Lavado	1 x 5
3	Test colorimétrico		

Según va aumentando la longitud de la cadena peptídica, se incrementa también el riesgo de agregación entre ellas, dificultando aún más los acoplamientos. En estos casos, antes de la adición del aminoácido y los activadores, se lavó la resina con agentes caotrópicos, como las sales de litio, que pueden contribuir a la ruptura de los puentes de hidrógeno que se hayan podido formar entre las cadenas crecientes de péptido²⁴⁸ (tabla 9).

Tabla 9. Lavado de peptidil-resina con sales de litio.

Etapa	Reactivos	Operación	Tiempo (min x repeticiones)
1	DMF	Lavado	1 x 5
2	0,4 M LiBr en DMF	Disgregación de cadenas	20 x 1
3	DMF	Lavado	1 x 5

3.2. TEST DE IDENTIFICACIÓN DE AMINAS LIBRES.

Se realizaron tres tipos de pruebas colorimétricas para evaluar cualitativamente tanto la eficiencia de los acoplamientos de los aminoácidos durante la síntesis de péptidos, como la eficiencia en la eliminación del grupo protector temporal Fmoc del extremo α -NH₂ de la cadena peptídica.

3.2.1. Test de Kaiser o de ninhidrina

El test de ninhidrina, ideado por Kaiser, se basa en la detección colorimétrica de grupos amino primarios libres en el extremo N-terminal de la cadena peptídica sintetizada²⁴⁹. Para llevar a cabo el ensayo se utilizan dos soluciones:

- Reactivo A: se prepara una disolución caliente de fenol (40 g) en etanol absoluto (10 ml). Por otro lado, se prepara una disolución de cianuro de potasio (KCN) (65 mg) en agua (100ml), y se adicionan a 2 ml de la disolución resultante sobre 100 ml de piridina. Ambas soluciones se agitan durante 45 minutos sobre 4 g de resina Amberlite MB-3 y seguidamente se filtran y se mezclan.

- Reactivo B: se prepara una disolución de ninhidrina (2,5 g) en etanol absoluto (50 ml).

Para realizar el test, se introduce una alícuota de peptidil-resina seca (0,5-2 mg) en un tubo pequeño de vidrio. Se añaden 3 gotas de reactivo A y 3 gotas de reactivo B, se agita ligeramente y se calienta a 110°C durante 3 minutos. En paralelo, se realiza un ensayo control que contiene la misma proporción de reactivo sin peptidil-resina. Una coloración amarilla indica la ausencia de aminas primarias (test negativo), lo que asegura que la incorporación del aminoácido se ha producido en al menos un 95%. En cambio, un color azul-verdoso de la disolución y de la resina indica la presencia de grupos amino primarios libres (test positivo), y por tanto, un acoplamiento incompleto.

Es posible que algunos aminoácidos, como la serina, el ácido aspártico o la asparagina no den la coloración azul oscura esperada cuando existen grupos amino libres, si no una coloración rojiza de la peptidil-resina.

3.2.2. Test de cloranilo

Este ensayo se utiliza para evaluar los acoplamientos sobre aminas secundarias, como la prolina²⁵⁰. El reactivo utilizado es una disolución saturada de 2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona (cloranilo, 75 mg) en tolueno (25 ml). Para realizar el test, se introduce una muestra de peptidil-resina seca en un tubo de vidrio (0,5-2 mg) y se añaden 5 gotas de la solución de cloranilo y 20 gotas de acetona. Se agita durante 5 minutos a temperatura ambiente. Una coloración azul-verdosa indica la presencia de aminas secundarias (test positivo), mientras que una coloración amarilla indica la ausencia de aminas secundarias en la peptidil-resina (test negativo). Este método no es tan sensible como el test de ninhidrina.

3.2.3. Test de TNBS

Este ensayo permite la detección de aminas primarias y secundarias²⁵¹. Para llevar a cabo el ensayo se utilizan dos soluciones:

- Reactivo A: una solución de 10% DIEA en DMF.
- Reactivo B: una disolución de 1% ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) en DMF.

Para realizar el test, se añaden 3 gotas del reactivo A y 3 gotas del reactivo B a una alícuota de peptidil-resina seca (0,5-2 mg) en un tubo pequeño de vidrio. Se agita suavemente. Una coloración rojiza de la peptidil-resina (test negativo) indica la presencia de aminas primarias libres. Sin embargo, una coloración amarilla (test positivo) indica la ausencia de aminas primarias.

Este test no es muy eficaz en el caso de aminas primarias estéricamente impedidas.

3.3. ELIMINACIÓN DEL GRUPO PROTECTOR Fmoc

La eliminación del Fmoc se realizó, en la mayoría de los casos empleando una disolución básica de piperidina en DMF al 20% (tabla 10). Sin embargo, cuando el resultado del test de ninhidrina era dudoso, se utilizó una disolución de 1,8-diazabicyclo-[5,4,0]-undec-7-ene (DBU) y piperidina en DMF (1:1:48) (tabla 11).

Tabla 10. Método A de eliminación del grupo Fmoc.

Etapas	Reactivos	Operación	Tiempo (min x repeticiones)
1	20% piperidina en DMF	Eliminación Fmoc	10 x 2
2	DMF	lavado	1 x 5
3	Comprobación mediante test colorimétrico correspondiente a la presencia de grupos amina libres (test positivo)		

Tabla 11. Método B de eliminación del grupo Fmoc.

Etapas	Reactivos	Operación	Tiempo (min x repeticiones)
1	piperidina:DBU:DMF (1:1:48)	Eliminación Fmoc	5 x 2
2	DMF	lavado	1 x 5
3	Comprobación mediante test colorimétrico correspondiente a la presencia de grupos amina libres (test positivo)		

3.4. ELIMINACIÓN DEL GRUPO PROTECTOR ivDde

El grupo ivDde se utilizó para proteger el extremo N^ε de la lisina de forma ortogonal respecto al extremo N^α. Su eliminación se llevó a cabo en presencia de hidracina (tabla 12).

Tabla 12. Eliminación del grupo semitemporal ivDde.

Etapas	Reactivos	Operación	Tiempo (min x repeticiones)
1	2% hidracina en DMF	Eliminación ivDde	3 x 5
2	DMF	Lavado	1 x 5
3	Comprobación mediante test de ninhidrina de la presencia de grupos amina libres (test positivo)		

3.5. TRATAMIENTO FINAL Y SECADO DE LA PEPTIDIL-RESINA

Una vez finalizada la síntesis de la secuencia peptídica deseada, se eliminó el grupo Fmoc del extremo N-terminal del último aminoácido empleando las condiciones anteriormente indicadas (tabla 10).

Posteriormente, se realizó un tratamiento de secado, ya que las resinas que contienen polietilenglicol tienen tendencia a retener fuertemente DMF. Además la presencia de restos de base puede neutralizar en parte el tratamiento acidolítico por lo que se lavó la resina NovaSyn TGR con un ácido débil, el ácido acético.

Las condiciones utilizadas tanto para la resina NovaSyn TGR como para la resina Cl-trt se indican a continuación, en las tablas 13 y 14.

Tabla 13. Tratamiento de secado de la resina NovaSyn TGR.

Etapa	Reactivos	Operación	Tiempo (min x repeticiones)
1	Ácido acético	Lavado	1 x 5
2	DCM	Lavado	1 x 5
3	MeOH	secado	1 x 5
4	Éter	secado	1 x 8
5	Aplicar vacío	secado	Hasta peso constante

Tabla 14. Tratamiento de secado de la resina cloruro de 2-clorotritilo.

Etapa	Reactivos	Operación	Tiempo (min x repeticiones)
1	DCM	Lavado	1 x 5
2	MeOH	secado	1 x 5
3	Éter	secado	1 x 8
4	Aplicar vacío	secado	Hasta peso constante

3.6. SEPARACIÓN DEL PÉPTIDO DE LA RESINA Y ELIMINACIÓN DE LOS GRUPOS PROTECTORES DE LAS CADENAS LATERALES DE LOS AMINOÁCIDOS

Una vez completada la síntesis de la molécula peptídica, se llevó a cabo su separación del soporte polimérico y se eliminaron simultáneamente los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos.

La resina Cl-trt también permite la obtención de péptidos totalmente protegidos, es decir, conservando protegidas las cadenas laterales de los aminoácidos. Esta cualidad permitió posteriormente la modificación del extremo C-terminal de los péptidos protegidos.

3.6.1. Resina NovaSyn TGR

La separación del péptido del soporte sólido se llevó a cabo junto con la eliminación simultánea de los grupos protectores Boc/tBu. Para ello, se utilizó una mezcla de ácido trifluoroacético (TFA) en presencia de los capturadores de carbocationes triisopropilsilano (TIS) y agua (95:2,5:2,5) (10-25 ml/g de resina). Tras 3 horas de reacción, se filtró la resina recogiendo el péptido en disolución.

Para aislarlo, se evaporó el TFA bajo una corriente de N₂ hasta reducir el volumen aproximadamente un 75%, entonces se añadió éter dietílico frío para favorecer la precipitación del péptido. La mezcla se centrifugó a 2.500 rpm durante 3 minutos. Se decantó el sobrenadante y se lavó el péptido repitiendo este proceso diez veces. Terminados los lavados, se disolvió el precipitado en una disolución acuosa de 10-30% de ácido acético. La solución se congeló con nieve carbónica y se liofilizó. Una vez liofilizados, los péptidos se conservaron a -20°C.

3.6.2. Resina Cloruro de 2-clorotritilo

La resina Cl-trt es sensible al medio ácido, por lo que cuando la intención era únicamente separar el péptido de la resina, se utilizaron condiciones de acidólisis suaves, 10 ml/g de resina de una disolución de 1% TFA en DCM seco (10 x 2 min). Los filtrados se recogieron en un matraz que contenía 10% de piridina en metanol (2 ml/g de resina) y se juntaron. Posteriormente se lavó la resina con 3-5 ml de DCM (3 x 1 min), 3-5 ml de metanol (3 x 1 min), 3-5 ml de DCM (2 x 1 min) y 3-5 ml de metanol (3 x 1 min), recogiendo todos los filtrados en el mismo matraz. Seguidamente, se evaporó la mezcla a presión reducida. Para ayudar a la precipitación del péptido, se añadieron entre 2-5 ml de agua y se enfrió la mezcla con hielo. Finalmente, se aisló el péptido por filtración a presión reducida y se secó en el desecador en presencia de KOH.

3.7. TIOESTERIFICACIÓN DEL EXTREMO C-TERMINAL

3.7.1. Síntesis de 3-mercaptopropanamida

La síntesis de 3-mercaptopropanamida se realizó en colaboración con el Prof. Weng C. Chan, en el *Centre for Biomolecular Science* de la Universidad de Nottingham en Reino Unido, y consta de tres etapas:

- Síntesis del ácido 3-tritilmercaptopropiónico

Se llevó a cabo la protección del grupo sulfhidrilo del ácido 3-mercaptopropiónico. Para ello, se disolvieron 2,00 g (7,68 mmol) de trifenilmetanol en TFA y se añadieron 0,74 ml (8,46 mmol) de ácido 3-mercaptopropiónico. La mezcla se dejó reaccionando 16 horas en ambiente libre de humedad. Se siguió el curso de la reacción por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando el sistema de eluyentes diclorometano (DCM): metanol (MeOH) 9:1.

Pasado el tiempo de reacción, se eliminó el TFA a presión reducida y el sólido obtenido se lavó con agua MilliQ y posteriormente se secó. El producto resultante se purificó mediante recristalización en tolueno y se caracterizó por resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN) y espectrometría de masas mediante electrospray en modo negativo (ES-MS, ES). También se midió su punto de fusión y se determinó su pureza mediante CCF, siendo el sistema utilizado DCM:MeOH 9:1.

- Síntesis de 3-tritilmercaptopropanamida

En primer lugar, se llevó a cabo la activación del grupo carboxilo del ácido 3-tritilmercaptopropiónico (0,50 g, 1,44 mmol) con N-hidroxisuccinamida (0,16 g; 1,44 mmol) en presencia de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (0,32 g, 1,54 mmol) en 10 ml tetrahidrofurano (THF). La reacción se siguió mediante CCF (DCM:MeOH, 9:1). Tras 24 horas de reacción en ambiente libre de humedad, el sólido formado durante el proceso, la dicitclohexilurea (DCU), se eliminó por filtración y el sobrenadante se evaporó a presión reducida. Posteriormente, el sólido obtenido se redisolvió en acetona para eliminar completamente toda la DCU formada. El sobrenadante final se secó a presión reducida y el sólido obtenido se caracterizó por espectrometría de masas mediante electrospray en modo positivo (ES⁺) y ¹H-RMN, siendo éste el éster activado del ácido 3-tritilmercaptopropiónico.

Seguidamente, el éster se disolvió en 12 ml de THF y se hizo reaccionar con una solución 2M de amoniaco en metanol (3 ml, 5,76 mmol, 4 eq.) durante 24 horas. El sólido formado se redisolvió en metanol y se eliminó el amoniaco mediante ultrasonidos durante una hora. Se evaporó el

disolvente a presión reducida hasta sequedad y el sólido se lavó con agua MilliQ y se filtró. El producto, 3-tritilmercaptopropanamida, se caracterizó mediante TLC (DCM:MeOH, 9:1), H-RMN y espectrometría de masas (ES⁺).

- Síntesis de 3-mercaptopropanamida

Se llevó a cabo la detritilación de 3-tritilmercaptopropanamida. Para ello, se disolvió 0,1 g (0,27 mmol) de 3-tritilmercaptopropanamida en DCM (9 ml) en presencia de 5% de TFA y 5% trietilsilano (TES) y se dejó reaccionando durante tres horas. Pasado el tiempo de reacción, se eliminó el DCM a presión reducida y se lavó el producto formado con hexano para después caracterizarlo por CCF (DCM:MeOH, 9:1), H-RMN y ES⁺.

3.7.2. Reacción de tioesterificación

La reacción de tioesterificación se puso a punto con la 3-mercaptopropanamida y, posteriormente, se llevó a cabo con el éster comercial 3-mercaptopropanoato de metilo. Los péptidos que se separaron de la resina totalmente protegidos (5-20 μmol) se derivatizaron en su extremo C-terminal bien con la 3-mercaptopropanamida o bien con 3-mercaptopropanoato de metilo utilizando como activadores del ácido carboxílico la carbodiimida soluble en agua (WSCDI) y HOBt (20:15:15). La reacción de tioesterificación se llevó a cabo en DMF a 4°C durante 24 horas. Pasado el tiempo de reacción, se eliminó el DMF a presión reducida, se hicieron varios lavados con agua para eliminar el exceso de reactivos y se secó el sólido a presión reducida. Finalmente, se eliminaron los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos siguiendo los pasos indicados en el apartado anterior (apdo. 3.6.1). El péptido derivatizado y desprotegido se disolvió en una disolución acuosa al 10% de ácido acético, se congeló con nieve carbónica y se liofilizó.

3.8. CICLACIÓN DE PÉPTIDOS TOTALMENTE DESPROTEGIDOS. LIGACIÓN QUÍMICA NATIVA INTRAMOLECULAR

La ciclación de los péptidos se llevó a cabo mediante el método de ligación química nativa intramolecular. Para ello, los péptidos desprotegidos derivatizados (10-20 μmol) en su extremo C-terminal con 3-mercaptopropanoato de metilo se disolvieron en tampón 0,2 M Na₂HPO₄/0,1M ácido cítrico (pH 7,5). La reacción se llevó a cabo en presencia de 3-mercaptopropanoato de metilo (50-100 μmol , 5 eq.), que actúa como catalizador y de tris(2-

carboxietil)fosfina (TCEP) (20-40 μmol , 2 eq.), que es un reductor de puentes disulfuro²⁰³. Las reacciones se siguieron por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) a escala analítica. El tiempo de reacción varió en función del péptido, siendo 48h el máximo tiempo de reacción ensayado.

3.9. UNIÓN DE PÉPTIDOS CÍCLICOS AL NÚCLEO DE LISINAS. REACCIÓN DE TIOETERIFICACIÓN

Una vez ciclados los péptidos, se llevó a cabo su unión al núcleo de lisinas derivatizado en sus extremos amino con ácido cloroacético. Esta reacción consiste en una reacción de sustitución nucleófila entre el tiol del péptido cíclico y el núcleo de lisinas.

Se ensayaron varios medios de reacción con tres ciclos de diferente longitud con el fin de obtener los MAPs tetraméricos homogéneos correspondientes en cada caso, así como para obtener MAPs tetraméricos de tipo lineal-cíclico.

A continuación se resumen las condiciones de reacción ensayadas (tabla 15). Los tiempos de reacción son aproximados.

Tabla 15. Condiciones ensayadas en la reacción de tioeterificación. (T. amb.: Temperatura ambiente).

	Medio de reacción	pH	T/°C	t/h
1	0,02 M Na_2HPO_4 /0,01M EDTA/DMF, Ar ¹⁹⁷	7,5	T amb.	48-72
2	0,2 M Tris/2 M Guan·Cl ^{204, 205}	7,6	50	48
3	DMF anh./ TBAI, N ₂ ²¹²	-	T amb.	21-48
4	0,1 M Tris-HCl, N ₂ ^{213, 214}	8,2	T amb.	24-48

Finalmente, las condiciones de reacción con el que se obtuvieron mejores resultados fueron las descritas en la tabla 15, indicadas con el número 4.

En primer lugar, se disolvió el núcleo de lisinas cloroacetilado (0,4 mg, 0,5 μmol) en tampón Tris-HCl 0,1 M a pH 8,2; después, se fueron añadiendo a la solución alícuotas de los péptidos cíclicos en fase sólida (0,62 μmol , 8 eq.), cada 15 minutos aproximadamente. La mezcla se dejó reaccionando en atmósfera inerte de nitrógeno. La reacción se siguió por HPLC analítico y MALDI-TOF. Finalmente, la reacción se acidificó con TFA (pH~3) y los productos formados

se aislaron mediante HPLC semipreparativo. Éstos se caracterizaron mediante HPLC analítico, ES⁺ y MALDI-TOF.

3.10. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

3.10.1. Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina se realizó en DCM:MeOH (9:1) sobre gel de sílice en soporte de aluminio. En el caso de la detección de moléculas con grupos aromáticos (3-tritilmercaptopropiónico y 3-tritilmercaptopropanamida), el revelado se llevó a cabo con luz ultravioleta colocando las capas finas directamente bajo la lámpara.

En la caracterización de 3-mercaptopropanamida, se utilizó una solución de ninhidrina para revelar la capa fina. Esta solución consiste en una disolución de ninhidrina al 0,5% en acetona. La placa se pulveriza con esta solución y se calienta a 110 °C durante 2-3 minutos. La presencia de grupos amino libres se manifiesta por la aparición de una coloración violeta.

3.10.2. Extracción en fase sólida

Los péptidos ramificados se desalaron mediante extracción en fase sólida en columnas C₁₈ Oasis HLB Extraction 3,9 x 150 mm (Waters). En la tabla 16, se definen las condiciones utilizadas.

Los filtrados recogidos, se caracterizaron por HPLC analítico y UPLC-ES-UV con el fin de comprobar que el péptido quedaba retenido en la columna y que eluía en la etapa 5.

Tabla 16. Tratamiento seguido en la desalación de los péptidos.

Etapas	Reactivos	Volumen/ml
1	MeOH	5
2	H ₂ O Milli Q	5
3	Péptido (H ₂ O:ACN)	1
4	H ₂ O + 0,1% TFA	5
5	H ₂ O:ACN (1:4) + 0,1% TFA	5
6	100% ACN	5

3.10.3. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) a escala analítica

La caracterización de los productos por HPLC a escala analítica se llevó a cabo en un cromatógrafo Perkin-Elmer constituido por un sistema binario de bombas LC-250, un detector Diodo Array LC-235 e inyector manual. También se empleó un cromatógrafo Agilent 1260 Infinity. Se utilizaron las columnas de fase reversa Kromasil C₈ y C₁₈ 4,6 x 250 mm y un tamaño de partícula de 5 µm (Tecknocroma) y la columna C₁₈ Poroshell 300-SB 2,1 x 75 mm, 5 µm de tamaño de partícula (Agilent Technologies). Los péptidos se eluyeron a un flujo de 1 ml/min y un gradiente lineal de los disolventes A y B (A: H₂O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA). La detección se realizó a 220 y 280 nm.

3.10.4. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) a escala semipreparativa

Las moléculas peptídicas sintetizadas se purificaron por HPLC a escala semipreparativa con las columnas Kromasil (Tecknocroma) de fase reversa C₈ y C₁₈, 22 x 250 mm y un tamaño de partícula de 5 µm, en un cromatógrafo Waters Delta Prep 400; y la columna C₁₈ XBridge BEH300, 10 x 250 mm y 5 µm de tamaño de partícula, en un cromatógrafo Agilent 1260 Infinity. Se utilizó un flujo de elución de 3,5 ml/min con un gradiente lineal de los disolventes A y B (A: H₂O con 0,05% TFA; B: ACN con 0,05%TFA). La detección se realizó a 220 nm. Las fracciones recogidas durante la purificación de los diferentes péptidos, se caracterizaron mediante HPLC analítico y espectrometría de masas (UPLC-ES-UV y/o MALDI-TOF).

3.10.5. Cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC)

La caracterización mediante UPLC, acoplado a un espectrómetro de masas y a un detector ultravioleta (UPLC-ES-UV), permitió conocer la masa correspondiente a cada pico cromatográfico.

Se empleó para ello un cromatógrafo UPLC ACQUITY (Waters) con un detector UV en serie (Waters) acoplado a un detector líquido-masas de tiempo de vuelo (LC-TOF) (apdo. 3.8.1). En el caso de los péptidos lineales y cíclicos, se utilizó una columna en fase reversa ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 2,1 x 100 mm y tamaño de partícula 1,7 µm (Waters). Para la caracterización de las moléculas ramificadas se utilizó una columna en fase reversa UHPLC Zorbax SB C₁₈ 2,1 x

150 mm, 1,8 μm (Agilent Technologies). En todos los casos, los péptidos se eluyeron a un flujo 0,3 ml/min y un gradiente lineal de los disolventes A y B (A: H_2O con 20 mM HCOOH ; B: ACN con 20 mM HCOOH). La detección se realizó a 220 y 280 nm.

3.11. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

3.11.1. Espectrometría de masas por ionización por electrospray (ESI)

La medida de masas por electrospray (ES) consiste en la generación de un spray de iones de la muestra a una determinada energía en la cámara de ionización. Estos iones pasan al analizador mediante una serie de lentes con un voltaje determinado. Para ello, se utilizó un detector líquido-masas de tiempo de vuelo (LC-TOF) LCT Premier XE (Micromass Waters) con una interfase electrospray positiva (ES^+) o negativa (ES^-), en función de si la molécula a analizar.

3.11.2. Espectrometría de masas MALDI-TOF

La espectrometría de masas MALDI-TOF utiliza el láser como fuente de ionización y consiste en bombardear directamente sobre la muestra cristalizada constituida por una mezcla del péptido y una matriz.

La preparación de la muestra se realizó mezclando 1 μl de solución del péptido (1-2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) con 1 μl de solución de matriz. Posteriormente, 0,5 μl de la mezcla se colocan en la placa de MALDI y se deja secar a temperatura ambiente.

Las matrices utilizadas fueron el ácido sinapínico (SA), el ácido hidroxicinámico (HCCA) y el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB). Se utilizó un espectrómetro Autoflex III Smartbeam (Bruker Daltonics) y una placa MTP 384 *polished steel* (Bruker). Como método de adquisición se utilizó el método lineal con un voltaje de polaridad positiva.

4. SÍNTESIS DE CONSTRUCCIONES PEPTÍDICAS DERIVADAS DEL EXTREMO N-TERMINAL DE LA PROTEÍNA E2 DEL GBV-C

Todas las moléculas peptídicas se sintetizaron manualmente en fase sólida siguiendo la estrategia de protección Fmoc/tBu. Se utilizaron dos tipos de resina: NovaSyn TGR, con funcionalización de 0,29 mmol/g, en el caso de los núcleos de lisina y los MAPs; y Cl-trt, con funcionalización de 1,3 mmol/g, en el caso de los péptidos lineales y cíclicos.

4.1. SÍNTESIS DEL PÉPTIDO LINEAL E2(7-26) (LP1_{E2})

La síntesis del LP1_{E2} (H₂N-GSRPFEPGLTWQS[Abu]S[Abu]RANG-COOH) se llevó a cabo a partir de 200 Mg de resina Cl-trt (1,3 mmol/g, 0,26 mmol). Tras hinchar la resina durante 15 minutos con 3 ml de 0,1% de DIEA en DCM seco (apdo. 3.1.1.2), se añadió el aminoácido Fmoc-Gly-OH (38,6 mg, 0,13 mmol) en defecto de equivalentes, disuelto en DCM en presencia de 89 μ l de DIEA (0,52 mmol, 4 eq.), con el objetivo de reducir su funcionalidad a aproximadamente la mitad (0,65 mmol/g, 0,13 mmol). Se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, se filtró la resina y se lavó con 5 ml de DCM (3 x 1 min), 5 ml de DMF (2 x 1 min) y nuevamente con DCM (2 x 1 min). Una vez seca la resina sobre KOH (24 h) a temperatura ambiente, se evaluó el grado de unión del primer aminoácido (apdo. 3.1.2). Con una solución de DCM:MeOH:DIEA (17:2:1) (5 ml, 4 x 5 min) se bloquearon los puntos reactivos de la resina y se lavó posteriormente con 5 ml de DCM (3 x 1 min).

Se desprotegió el extremo α -amino con 10 ml de 20% de piperidina en DMF (2 x 10 min) (apdo. 3.3.) y se hicieron lavados de la resina con 10 ml de DMF (5 x 1 min). La eficiencia de la reacción se evaluó mediante el test de ninhidrina (apdo. 3.2.1). El acoplamiento del resto de aminoácidos de la secuencia peptídica [Fmoc-Asn(trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Abu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gln(trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH] se realizó como se ha indicado en el método C del apartado 3.1.3 (tabla 7) (0,39 mmol, 3 eq.), utilizando como activadores DIEA (132,7 μ l, 0,78 mmol, 6 eq.) y HATU (148,3 mg, 0,39 mmol, 3 eq.). La eliminación del grupo Fmoc del extremo α -amino de cada aminoácido se llevó a cabo siguiendo el protocolo del apartado 3.3. La eficacia de las etapas de acoplamiento y desprotección se comprobó mediante el test de ninhidrina, excepto cuando el residuo era prolina, treonina o serina. Para evaluar tanto la eliminación del grupo Fmoc del aminoácido

como el acoplamiento con el siguiente se empleó el test de cloranilo (apdo. 3.2.2) en el caso de la prolina, y el test de TNBS (apdo. 3.2.3) en el caso de la serina y la treonina.

El grupo Fmoc del último aminoácido se eliminó con 10 ml de 20% de piperidina en DMF (2 x 10 min), y posteriormente se lavó la peptidil-resina con 10 ml de DMF (5 x 1 min). Se utilizó el test de ninhidrina para determinar la eficiencia de la desprotección. Se secó la peptidil-resina tal y como se indica en el procedimiento de la tabla 13 del apartado 3.5. Se separó el péptido de una alícuota de peptidil-resina (~30 mg) siguiendo el protocolo del apartado 3.6.1.

4.2. SÍNTESIS DEL PÉPTIDO LINEAL E2(11-26) (LP2_{E2})

La síntesis del péptido LP2_{E2} (H₂N-FEPGLTWQS[Abu]S[Abu]RANG-COOH) se realizó partiendo de 200 mg de resina Cl-trt (1,3 mmol/g, 0,26 mmol). Se hinchó la resina durante 15 minutos con 3 ml de 0,1% de DIEA en DCM seco (apdo. 3.1.1.2). Se añadió el primer aminoácido, Fmoc-Gly-OH, en defecto de equivalentes (38,6 mg, 0,13 mmol), disuelto en DCM y junto con 89 μ l de DIEA (0,52 mmol, 4 eq.), con el objetivo de reducir su funcionalidad a aproximadamente la mitad (0,65 mmol/g, 0,13 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se filtró la resina y se lavó con 5 ml de DCM (3 x 1 min), 5 ml de DMF (2 x 1 min) y nuevamente con DCM (2 x 1 min). Posteriormente, se secó sobre KOH en el desecador durante 24 h a temperatura ambiente y se evaluó el grado de unión del aminoácido a la resina (apdo. 3.1.2). Los puntos reactivos de la resina se bloquearon con 5 ml de una solución de DCM:MeOH:DIEA (17:2:1) (4 x 5 min). Por último, se lavó la resina con 5 ml de DCM (3 x 1 min).

Se eliminó el grupo Fmoc del extremo α -amino con 10 ml de 20% de piperidina en DMF (2 x 10 min) (apdo. 3.3) y se lavó con 10 ml de DMF (5 x 1 min). Se determinó la eficiencia de la reacción mediante el test de ninhidrina (apdo. 3.2.1). El acoplamiento del resto de aminoácidos de la secuencia peptídica [Fmoc-Asn(trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Abu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gln(trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH] se realizó tal y como se indica en el apartado 3.1.3 (método C, tabla 7), empleando DIEA (132,7 μ l, 0,78 mmol, 6 eq.) y HATU (148,3 mg, 0,39 mmol, 3 eq.). La eliminación del grupo Fmoc del extremo α -amino de cada aminoácido se realizó como se indica en el apartado 3.3. Se comprobó la eficacia de los acoplamientos y desprotecciones del grupo N- α de los aminoácidos mediante el

test de ninhidrina, excepto cuando el residuo era prolina, serina o treonina. En el caso de la prolina, se empleó el test de cloranilo (apdo. 3.2.2) para evaluar tanto la eliminación del grupo Fmoc de este aminoácido como el acoplamiento con el siguiente. En el caso de la serina y la treonina, se utilizó el test del TNBS (apdo. 3.2.3) para evaluar las etapas anteriormente mencionadas.

Incorporado el último aminoácido de la secuencia, se eliminó el grupo protector Fmoc con 10 ml de 20% de piperidina en DMF (2 x 10 min) y la peptidil-resina se lavó con 10 ml de DMF (5 x 1 min). Se utilizó el test de ninhidrina para determinar la eficiencia de la desprotección. Por último, se secó la peptidil-resina siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 3.5 (tabla 13) y se separó el péptido de una alícuota de peptidil-resina (~30 mg) tal y como se explica en el apartado 3.6.1.

4.3. SÍNTESIS DEL PÉPTIDO LINEAL E2(17-26) (LP3_{E2})

El péptido LP3_{E2} (H₂N-WQS[Abu]S[Abu]RANG-COOH) se sintetizó a partir de 223 mg de resina Cl-trt (1,3 mmol/g, 0,29 mmol). En primer lugar, se hinchó la resina durante 15 minutos con 3 ml de 0,1% de DIEA en DCM seco (apdo. 3.1.1.2). Tras filtrar la resina, se redujo su funcionalidad a aproximadamente la mitad (0,65 mmol/g, 0,14 mmol). Para ello, se añadió el primer aminoácido, Fmoc-Gly-OH, en defecto de equivalentes (38,6 mg, 0,13 mmol), disuelto en DCM y junto con 89 µl de DIEA (0,52 mmol, 4 eq.). La mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se filtró la resina y se lavó con 5 ml de DCM (3 x 1 min), 5 ml de DMF (2 x 1 min) y de nuevo con DCM (2 x 1 min). Se secó sobre KOH en el desecador durante 24 h a temperatura ambiente y se determinó el grado de unión del aminoácido a la resina (apdo. 3.1.2). Los puntos reactivos de la resina, en los que no se había unido el aminoácido, se bloquearon con 5 ml de una solución de DCM:MeOH:DIEA (17:2:1) (4 x 5 min). Finalmente, se lavó la resina con 5 ml de DCM (3 x 1 min), 5 ml de DMF (2 x 1 min) y 5 ml de DCM (2 x 1 min). Se hizo un último lavado con 5 ml de DMF (3 x 1 min) antes de continuar con el proceso de síntesis.

Se eliminó el grupo Fmoc tratando la resina con 10 ml de 20% de piperidina en DMF (2 x 10 min) (apdo. 3.3). Se lavó con 10 ml de DMF (5 x 1 min) y se evaluó la eficiencia de la desprotección del grupo α-amino mediante el test de ninhidrina (apdo. 3.2.1). El acoplamiento del resto de aminoácidos de la secuencia peptídica [Fmoc-Asn(trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Abu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gln(trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH]

se realizó siguiendo el método C del apartado 3.1.3 (tabla 7) (0,43 mmol, 3 eq.), utilizando DIEA (147,9 μ l, 0,87 mmol, 6 eq.) y HATU (165,4 mg, 0,43 mmol, 3 eq.). El grupo protector Fmoc del extremo α -amino de cada aminoácido se eliminó siguiendo el procedimiento del apartado 3.3. La eficacia de los acoplamientos y desprotecciones se comprobó mediante el test de ninhidrina y el test del TNBS (apdo. 3.2.3) en el caso del residuo serina, tanto en la etapa de eliminación de su grupo protector como en la etapa de acoplamiento del aminoácido siguiente.

Una vez incorporado el último aminoácido de la secuencia, se eliminó el grupo Fmoc con 10 ml de 20% de piperidina en DMF (2 x 10 min) y se lavó la peptidil-resina con 10 ml de DMF (5 x 1 min). Tras evaluar la eficiencia de la desprotección con el test de ninhidrina se secó la peptidil-resina siguiendo el procedimiento del apartado 3.5 (tabla 13) y se separó el péptido de una alícuota de peptidil-resina (~30 mg) tal y como se indica en el apartado 3.6.1.

4.4. SÍNTESIS DEL PÉPTIDO LINEAL NS4a(27-43)

Se llevó a cabo la síntesis del péptido lineal NS4a(27-43) (H_2N -TDWDVKGGGSPLYRHGDG-COOH) partiendo de 200 mg de resina Cl-trt (1,3 mmol/g, 0,26 mmol). La resina se hinchó con 3 ml de 0,1% de DIEA en DCM seco durante 15 minutos (apdo. 3.1.1.2). El primer aminoácido, Fmoc-Gly-OH, se añadió disuelto en DCM en defecto de equivalentes (38,6 mg, 0,13 mmol), y en presencia de 89 μ l de DIEA (0,52 mmol, 4 eq.), con el objetivo de reducir su funcionalidad a aproximadamente la mitad (0,65 mmol/g, 0,13 mmol). Tras 1 hora de agitación a temperatura ambiente, se lavó con 5 ml de DCM (3 x 1 min), 5 ml de DMF (2 x 1 min) y de nuevo con DCM (2 x 1 min). Se secó sobre KOH en el desecador durante 24 h a temperatura ambiente y se comprobó el grado de unión del aminoácido a la resina (apdo. 3.1.2). Los puntos reactivos de la resina se bloquearon con 5 ml de una solución de DCM:MeOH:DIEA (17:2:1) (4 x 5 min) y se lavó la resina con 5 ml de DCM (3 x 1 min).

Se eliminó el grupo Fmoc del extremo α -amino con 10 ml de 20% de piperidina en DMF (2 x 10 min) (apdo. 3.3) y se lavó con 10 ml de DMF (5 x 1 min). Se evaluó la eficacia de la reacción mediante el test de ninhidrina (apdo. 3.2.1). El acoplamiento del resto de aminoácidos de la secuencia peptídica [Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-His(trt)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH] se realizó tal y como se indica en el apartado 3.1.3 (método C, tabla 7) (0,39 mmol, 3 eq.), empleando DIEA (132,7

μl , 0,78 mmol, 6 eq.) y HATU (148,3 mg, 0,39 mmol, 3 eq.). La eliminación del grupo Fmoc del extremo α -amino de cada aminoácido se realizó siguiendo lo indicado en el apartado 3.3. La eficacia de las reacciones de acoplamiento y desprotección del extremo N- α de los aminoácidos se comprobó mediante el test de ninhidrina, excepto cuando el residuo era serina, treonina o prolina. Tanto para evaluar la eliminación del grupo Fmoc del aminoácido como el acoplamiento con el siguiente, se empleó el test de clorano (apdo. 3.2.2) para la prolina.

Una vez incorporado el último aminoácido de la secuencia, se eliminó el grupo Fmoc con 10 ml de 20% de piperidina en DMF (2 x 10 min) y se lavó con 10 ml de DMF (5 x 1 min). Se utilizó el test de ninhidrina para determinar la eficiencia de la desprotección. Por último, se secó la peptidil-resina tal y como se indica en el apartado 3.5 (tabla 13) y se separó el péptido de una alícuota de peptidil-resina (~ 30 mg) siguiendo el procedimiento del apartado 3.6.1.

4.5. SÍNTESIS DEL PÉPTIDO CÍCLICO E2(7-26) (CP1): Cyc-HT-CysE2(7-26)

El péptido cíclico CP1 se sintetizó a partir de 300 mg de peptidil-resina del péptido lineal LP1_{E2} (apdo. 4.1), siendo la nueva funcionalización 0,27 mmol/g. Para ello, se hinchó la peptidil-resina con DMF durante aproximadamente 1 hora y posteriormente se incorporó al extremo N-terminal del péptido LP1_{E2} el residuo Boc-Cys(trt)-OH (112,7 mg, 0,24 mmol, 3 eq) disuelto en la mínima cantidad de DMF (apdo. 3.1.3, tabla 7). Se utilizaron como reactivos DIEA (82,7 μl , 0,49 mmol, 6 eq.) y HATU (92,4 mg, 0,24 mmol, 3 eq.). Tras los lavados con 10 ml de DMF (5 x 1 min), el acoplamiento se evaluó con el test de ninhidrina (apdo. 3.2.1).

La peptidil-resina se secó siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 3.5 (tabla 13) y posteriormente se separó el péptido de la peptidil-resina con una solución de 1% TFA en DCM, como se indica en el apartado 3.3.2.

Se derivatizó el extremo C-terminal del péptido (33 mg, 8,33 μmol) mediante la reacción de tioesterificación con el éster 3-mercaptopropanoato de metilo (20 μl , 0,167 mmol, 20 eq.), junto con WSCDI (24 mg, 0,12 mmol, 15 eq.) y HOBt (17 mg, 0,12 mmol, 15 eq.) en DMF (1 mM) a 4°C durante 24 horas. Se siguió el protocolo indicado en el apartado 3.7.2. Seguidamente, se eliminaron los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos y el grupo Boc que protegía el extremo N-terminal, con 15 ml de la mezcla acidolítica 95% TFA, 2,5% H₂O y 2,5% TIS siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 3.6.1.

La reacción de ciclación del Cys-LP1_{E2} tioesterificado (15 mg, 6,5 μ mol) se llevó a cabo a una concentración de 1 mg/ml en tampón 0,2 M Na₂HPO₄/0,1 M ácido cítrico (pH 7,5) en presencia de TCEP (3,7 mg, 13 μ mol, 2 eq.) y del éster 3-mercaptopropanoato de metilo (4 μ l, 32,5 μ mol, 5 eq.), tal y como se explica en el apartado 3.8.

4.6. SÍNTESIS DEL PÉPTIDO CÍCLICO E2(11-26) (CP2): Cyc-HT-CysE2(11-26)

Se sintetizó el péptido CP2 a partir de 253 mg de peptidil-resina del péptido lineal LP2_{E2} (apdo. 4.2), cuya nueva funcionalización era 0,31 mmol/g. Tras hinchar la peptidil-resina con DMF durante 1 hora, se incorporó al extremo N-terminal del péptido LP2_{E2}, disuelto en la mínima cantidad de DMF, el residuo Boc-Cys(trt)-OH (109,1 mg, 0,24 mmol, 3 eq.), utilizando los reactivos DIEA (80 μ l, 0,47 mmol, 6 eq.) y HATU (89,5 mg, 0,24 mmol, 3 eq.) (apdo. 3.1.3, método C). El acoplamiento se evaluó con el test de ninhidrina (apdo. 3.2.1) después de los lavados con 10 ml de DMF (5 x 1 min).

Se secó la peptidil-resina siguiendo el procedimiento del apartado 3.5 (tabla 13) y se separó el péptido de la peptidil-resina con una solución de 1% TFA en DCM (apdo. 3.3.2).

Se tioesterificó el extremo C-terminal del péptido protegido (22,8 mg, 29,6 μ mol) con el éster 3-mercaptopropanoato de metilo (16 μ l, 0,15 mmol, 20 eq.), WSCDI (21,2 mg, 0,11 mmol, 15 eq.) y HOBt (15 mg, 0,11 mmol, 15 eq.) en DMF (1 mM) a 4°C durante 24 horas. Se siguió el protocolo indicado en el apartado 3.7.2. Posteriormente, se eliminaron los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos y el grupo Boc que protegía el extremo N-terminal, con 10 ml de la mezcla acidolítica 95% TFA, 2,5% H₂O y 2,5% TIS siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 3.6.1.

La reacción de ciclación del Cys-LP2_{E2} tioesterificado (11,6 mg, 6 μ mol) se llevó a cabo a una concentración de 1 mg/ml en tampón 0,2 M Na₂HPO₄/0,1 M ácido cítrico (pH 7,5) en presencia de TCEP (3,4 mg, 12 μ mol, 2 eq.) y del éster 3-mercaptopropanoato de metilo (4 μ l, 30 μ mol, 5 eq.), tal y como se explica en el apartado 3.8.

4.7. SÍNTESIS DEL PÉPTIDO CÍCLICO E2(17-26) (CP3): Cyc-HT-CysE2(17-26)

La síntesis del péptido cíclico CP3 se llevó a cabo partiendo de 155 mg de peptidil-resina del péptido lineal LP3_{E2} (apdo. 4.3), siendo la nueva funcionalización 0,38 mmol/g. Se hinchó la peptidil-resina con DMF durante 1 hora y se incorporó al extremo N-terminal del péptido el residuo Boc-Cys(trt)-OH (81,9 mg, 0,18 mmol, 3eq), empleando los reactivos DIEA (60,1 μ l, 0,35 mmol, 6 eq.) y HATU (67,2 mg, 0,18 mmol, 3 eq.) y disolviéndolo en la mínima cantidad de DMF (apdo. 3.1.3, tabla 7). El acoplamiento se evaluó con el test de ninhidrina (apdo. 3.2.1), tras los lavados con aproximadamente 10 ml de DMF (5 x 1 min).

La peptidil-resina se secó como se indica en la tabla 13 del apartado 3.5 y se separó el péptido de la peptidil-resina con una solución de 1% TFA en DCM (apdo. 3.3.2).

La tioesterificación del extremo C-terminal del Cys-LP3_{E2} protegido (52,3 mg, 23,1 μ mol) se llevó a cabo siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 3.7.2, con el éster 3-mercaptopropanoato de metilo (51,2 μ l, 0,46 mmol, 20 eq.), WSCDI (66,2 mg, 0,35 mmol, 15 eq.) y HOBt (47,3 mg, 0,35 mmol, 15 eq.) en DMF (1 mM) a 4°C durante 24 horas. Se eliminaron los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos y el grupo Boc que protegía el extremo N-terminal, con 10 ml de la mezcla acidolítica 95% TFA, 2,5% H₂O y 2,5% TIS siguiendo el protocolo indicado en el apartado 3.6.1.

Posteriormente, se cicló el péptido Cys-LP3_{E2} tioesterificado (12,2 mg, 9,5 μ mol) a una concentración de 1 mg/ml en tampón 0,2 M Na₂HPO₄/0,1 M ácido cítrico (pH 7,5) en presencia de TCEP (5,4 mg, 19 μ mol, 2 eq.) y del éster 3-mercaptopropanoato de metilo (26 μ l, 47,5 μ mol, 5 eq.), como se explica en el apartado 3.8.

4.8. SÍNTESIS DEL PÉPTIDO CÍCLICO NS4a(27-43): Cyc-HT-CysNS4a(27-43)

Se sintetizó el péptido Cyc-HT-CysNS4a(27-43) a partir de 180 mg de peptidil-resina del péptido lineal NS4a(27-43) (apdo. 4.4), siendo la nueva funcionalización 0,27 mmol/g. En primer lugar, se hincó la peptidil-resina con DMF durante 1 hora, y posteriormente se incorporó al extremo N-terminal del péptido NS4a(27-43) el residuo Boc-Cys(trt)-OH (67,6 mg, 0,15 mmol, 3 eq.) disuelto en la mínima cantidad de DMF (apdo. 3.1.3, tabla 7), en presencia de DIEA (49,6 μ l, 0,29 mmol, 6 eq.) y HATU (55,4 mg, 0,15 mmol, 3 eq.). Tras los lavados con 10

ml de DMF (5 x 1 min), se empleó el test de ninhidrina para evaluar el acoplamiento (apdo. 3.2.1).

Se secó la peptidil-resina siguiendo el procedimiento del apartado 3.5 (tabla 13) y, con una solución de 1% TFA en DCM, se separó el péptido de la peptidil-resina (apdo. 3.3.2).

Se tioesterificó el extremo C-terminal del péptido protegido (30,3 mg, 8,89 μ mol) con 3-mercaptopropanamida (18,7 mg, 0,18 mmol, 20 eq.), WSCDI (24,8 mg, 0,13 mmol, 15 eq.) y HOBt (17,6 mg, 0,13 mmol, 15 eq.) en DMF (1 mM) a 4°C durante 24 horas, para ello se siguió el protocolo del apartado 3.7.2. Seguidamente, se eliminaron los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos y el grupo Boc que protegía el extremo N-terminal, con 10 ml de la mezcla acidolítica 95% TFA, 2,5% H₂O y 2,5% TIS siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 3.6.1.

La reacción de ciclación del péptido CysNS4a(27-43) tioesterificado (6,7 mg, 3,2 μ mol) se realizó tal y como se explica en el apartado 3.8, en presencia de TCEP (1,8 mg, 6,4 μ mol, 2 eq.) y de 3-mercaptopropanamida (1,7 mg, 16 μ mol, 5 eq.), a una concentración de 1 mg/ml en tampón 0,2 M Na₂HPO₄/0,1 M ácido cítrico (pH 7,5).

4.9. MAP TETRAMÉRICO DE TIPO LINEAL HETEROGÉNEO (MAP_{E2/NS4})

La formación del MAP_{E2/NS4} puede dividirse fundamentalmente en tres etapas: la síntesis del núcleo de lisinas ortogonalmente protegido, la síntesis sobre los extremos N α de dicho núcleo de dos cadenas lineales correspondientes a la secuencia E2(7-26) (MAP dimérico) y por último, la síntesis de las dos cadenas lineales de la secuencia NS4a(27-43) en los extremos N ϵ del núcleo de lisinas. Cada una de estas etapas se describe a continuación.

4.9.1. Núcleo de lisinas ortogonalmente protegido

El núcleo de lisinas tetramérico ortogonalmente protegido se sintetizó para la formación del MAP de tipo lineal heterogéneo y para la síntesis del MAP de tipo lineal-cíclico.

Para ello, se partió de 1 g de resina NovaSyn TGR (0,29 mmol/g, 0,29 mmol). En primer lugar, se hinchó la resina durante 1 hora con 10 ml de DMF. Posteriormente, se incorporó el primer aminoácido, Fmoc- β Ala-OH, (270,8 mg, 0,87 mmol, 3 eq.), junto con HOBt (117,6 mg, 0,87 mmol, 3 eq.) y DIPCDI (133,9 μ l, 0,87 mmol, 3 eq.) en la mínima cantidad de DMF (apdo.

3.1.1.1). Se dejó reaccionando 150 minutos a temperatura ambiente agitando con frecuencia. Acabada la reacción, se filtró la resina y se lavó con 10 ml DMF (5 x 1 min). Se evaluó cualitativamente la eficiencia del acoplamiento mediante el test de ninhidrina (apdo. 3.2.1).

Se eliminó el grupo Fmoc tratando la resina con 10 ml de una disolución de 20% de piperidina en DMF (2 x 10 min) (apdo. 3.3). Se lavó la resina con 10 ml de DMF (5 x 1 min) y se determinó la eficiencia de eliminación del grupo protector del utilizando el test de ninhidrina.

Se incorporó el siguiente aminoácido, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, una lisina protegida tanto en el extremo α -amino como en el extremo ϵ -amino con un grupo Fmoc (513,9 mg, 0,87 mmol, 3 eq.), junto con HOBt (117,6 mg, 0,87 mmol, 3 eq.) y DIPCDI (133,9 μ l, 0,87 mmol, 3 eq.) en la mínima cantidad de DMF (apdo. 3.1.3, método A). Tras la reacción de 150 minutos a temperatura ambiente, se filtró la resina y se lavó con 10 ml de DMF (5 x 1 min). Se realizó el test de ninhidrina para evaluar cualitativamente la eficiencia del acoplamiento.

Se eliminó el grupo Fmoc tratando la peptidil-resina con 10 ml de una disolución de 20% de piperidina en DMF (2 x 10 min) (apdo. 3.3). Se lavó la peptidil-resina con 10 ml de DMF (5 x 1 min) y se determinó la eficiencia de eliminación del grupo protector del extremo α - y ϵ -amino utilizando el test de ninhidrina.

Seguidamente se hizo reaccionar, durante 150 minutos a temperatura ambiente con agitación frecuente, el siguiente aminoácido, Fmoc-Lys(ivDde)-OH (1 g, 1,74 mmol, 6 eq.) en presencia de HOBt (235,1 mg, 1,74 mmol, 6 eq.) y DIPCDI (267,8 μ l, 1,74 mmol, 6 eq.), disuelto en la mínima cantidad de DMF (apdo. 3.1.3, método A). Esta lisina estaba ortogonalmente protegida, en el extremo α -amino con un grupo Fmoc y en el extremo ϵ -amino con un grupo ivDde, lábil únicamente al tratamiento con 2% de hidracina. Pasado el tiempo de reacción, se lavó la peptidil-resina y se realizó el test de ninhidrina. Se eliminó el grupo Fmoc tratando la peptidil-resina con 10 ml de una disolución de 20% de piperidina en DMF (2 x 10 min) (apdo. 3.3). Finalmente, se lavó con 10 ml de DMF (5 x 1 min) y se comprobó la eficiencia de eliminación del grupo protector Fmoc con el test de ninhidrina.

Se secó una alícuota de peptidil-resina (~20 mg) siguiendo el procedimiento del apartado 3.5 (tabla 13) y se separó el péptido de la resina con 2 ml de la mezcla acidolítica TFA:H₂O (97:3). La reacción se dejó agitando 2 horas a temperatura ambiente y se aisló el péptido como se indica en el apartado 3.6.1.

4.9.2. MAP Dimérico de Tipo Lineal E2(7-26)

La síntesis del MAP dimérico con dos cadenas peptídicas lineales de la secuencia E2(7-26) se llevó a cabo a partir de 783 mg de peptidil-resina que contenía el núcleo de lisinas ortogonalmente protegido (apdo. 4.9.1), siendo la nueva funcionalización 0,23 mmol/g (0,18 mmol). Tras hinchar la resina durante 45 minutos con DMF, se acopló al extremo N α del núcleo de lisinas, el aminoácido Fmoc-Gly-OH (321 mg, 1,08 mmol, 6 eq.) disuelto en la mínima cantidad de DMF y en presencia de 166,3 μ l de DIPCDI (1,08 mmol, 6 eq.) y HOBt (146 mg, 1,08 mmol, 6 eq.), siguiendo el protocolo del apartado 3.1.3 (tabla 5). Se agitó a temperatura ambiente durante 150 minutos, se filtró la peptidil-resina y se lavó con 10 ml de DMF (5 x 1 min). Se comprobó la eficacia de la reacción con el test de ninhidrina (apdo. 3.2.1).

Se desprotegeron los extremos α -amino con 10 ml de 20% de piperidina en DMF (2 x 10 min) (apdo. 3.3) y se hicieron lavados de la resina con 10 ml de DMF (5 x 1 min). La eficiencia de la desprotección evaluó mediante el test de ninhidrina. El acoplamiento del resto de aminoácidos de la secuencia peptídica [Fmoc-Asn(trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Abu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gln(trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH] se realizó como se ha indicado en el apartado 3.1.3 (tabla 8), utilizando como activadores DIPCDI (166,3 μ l, 1,08 mmol, 6 eq.) y HOBt (146 mg, 1,08 mmol, 6 eq.). En el caso de acoplamientos incompletos, se repitió la reacción utilizando como activadores TBTU (347 mg, 1,08 mmol, 6 eq.) y DIEA (367,5 μ l, 2,16 mmol, 12 eq.), como se indica en la tabla 6 (apdo. 3.1.3). El último aminoácido de la secuencia se incorporó con el extremo amino protegido con el grupo Boc, Boc-Gly-OH, con el fin de evitar la posterior elongación de la cadena. La eficacia de las etapas de acoplamiento y desprotección se comprobó mediante el test de ninhidrina, excepto cuando el residuo era prolina, treonina o serina. Para evaluar tanto la eliminación del grupo Fmoc del aminoácido como el acoplamiento con el siguiente se empleó el test de cloranilo (apdo. 3.2.2) en el caso de la prolina, y el test de TNBS (apdo. 3.2.3) en el caso de la serina y la treonina.

Se comprobó la presencia del MAP dimérico a partir de una alícuota de peptidil-resina. Ésta se secó como se indica en el apartado 3.5 (tabla 13) y se separó el péptido de la resina eliminando simultáneamente los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos y el grupo Boc del extremo α -amino (apdo. 3.6.1).

Posteriormente, se eliminó el grupo protector ivDde del extremo N^o del núcleo de lisinas con 10 ml de 2% de hidracina en DMF, siguiendo el protocolo indicado en el apartado 3.4 (tabla 12). La reacción de eliminación por se siguió por UPLC-MS tras secar (apdo. 3.5), desproteger y desanclar (apdo. 3.6.1) varias alícuotas de peptidil-resina (20-30 mg), repitiendo el proceso cinco veces, hasta que no se observó la presencia del grupo ivDde en el péptido dimérico.

Se secó la peptidil-resina se indica en la tabla 13 del apartado 3.5 y se separó una fracción de la peptidil-resina (352 mg) para la posterior síntesis de la secuencia NS4a(27-43) sobre el extremo N^o libre. Otra fracción (327 mg de peptidil-resina) se derivatizó con ácido cloroacético en el extremo amino libre del núcleo de lisinas (apdo. 4.10).

4.9.3. Síntesis de la secuencia NS4a(27-43) en los extremos N^o del núcleo de lisinas

A partir de 352 mg de peptidil-resina del MAP dimérico formado por dos secuencias lineales de la región E2(7-26) y los extremos N^o libres (0,23 mmol/g, 0,18 mmol), se sintetizaron simultáneamente las dos cadenas lineales de la secuencia peptídica NS4a(27-43).

Se hinchó la resina durante 1 hora con DMF y se acoplaron los aminoácidos (0,49 mmol, 6 eq.) [Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-His(trt)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH] como se indica en el apartado 3.1.3 (tabla 8, método A), empleando DIPCDI (74,8 μ l, 0,49 mmol, 6 eq.) y HOBT (65,6 mg, 0,49 mmol, 6 eq.). En los casos en que el acoplamiento fue incompleto, se hicieron lavados con 0,4 M de LiBr en DMF (apdo. 3.1.3, tabla 9) y se repitió la reacción empleando como activador TBTU (156 mg, 0,49 mmol, 6 eq.) en presencia de DIEA (165,2 μ l, 0,97 mmol, 12 eq.). La eliminación del grupo Fmoc del extremo α -amino de los aminoácidos se llevó a cabo siguiendo el procedimiento del apartado 3.3. La eficacia de las reacciones de acoplamiento y desprotección del extremo N- α de los aminoácidos se comprobó mediante el test de ninhidrina (apdo. 3.2.1), excepto cuando el residuo era serina, treonina o prolina. En el caso de la serina y la treonina, se empleó el test de TNBS (apdo. 3.2.3) y cuando el aminoácido era la prolina se utilizó el test de cloranilo (apdo. 3.2.2), tanto para evaluar la eliminación del grupo Fmoc como el acoplamiento con el siguiente aminoácido.

Finalizada la síntesis, se desprotegió el extremo α -amino con 10 ml de 20% de piperidina en DMF (2 x 10 min) (apdo. 3.3) y se hicieron lavados de la peptidil-resina con 10 ml de DMF (5 x 1 min). La eficiencia de la reacción se evaluó mediante el test de ninhidrina. Por último, se secó la peptidil-resina tal y como se indica en la tabla 13 (apdo. 3.5) y se separó el MAP de una alícuota de peptidil-resina (~30 mg) siguiendo el procedimiento del apartado 3.6.1.

4.10. MAP DIMÉRICO DE TIPO LINEAL E2(7-26) CLOROACETILADO

El MAP dimérico con dos cadenas peptídicas lineales correspondientes a la región E2(7-26) (327 mg de peptidil-resina, 0,23 mmol/g, 0,18 mmol) se derivatizó en el extremo N ϵ libre del núcleo de lisinas con ácido cloroacético (42,6 mg, 0,45 mmol, 6 eq.) utilizando HATU (171,6 mg, 0,45 mmol, 6 eq.) y DIEA (153,5 μ l, 0,90 mmol, 12 eq.) como activadores, disolviendo los reactivos en la mínima cantidad de DMF. Se dejó reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente agitando frecuentemente. Pasado el tiempo de reacción, se lavó la peptidil-resina con DMF (5 x 1 min) y se comprobó la eficacia del acoplamiento tanto por el test de ninhidrina como por UPLC-MS, separando varias alícuotas de peptidil-resina (20-30 mg). Éstas se secaron siguiendo el protocolo del apartado 3.5 (tabla 13), se eliminaron los grupos protectores y se separó el péptido de la resina (apdo. 3.6.1) para posteriormente caracterizar el MAP dimérico derivatizado. Este proceso se repitió cuatro veces, hasta que se completó el acoplamiento del ácido cloroacético a ambos extremos N ϵ del núcleo de lisinas.

4.11. MAP TETRAMÉRICO LINEAL E2(17-26) (MAP_{LP3})

La síntesis de los MAP tetraméricos de tipo lineal homogéneo puede dividirse fundamentalmente en dos etapas: la síntesis del núcleo de lisinas tetramérico y la síntesis simultánea de las cuatro secuencias peptídicas lineales sobre los extremos N α y N ϵ de dicho núcleo.

4.11.1. Núcleo de lisinas tetramérico

La síntesis del núcleo de lisinas tetramérico para la formación de los MAPs de tipo lineal homogéneo se llevó a cabo a partir de 500 mg de resina NovaSyn TGR (0,29 mmol/g, 0,145 mmol). Se hinchó la resina durante 1 hora con 10 ml de DMF y tras filtrarla, se incorporó el primer aminoácido, Fmoc- β Ala-OH, (135,4 mg, 0,44 mmol, 3 eq.), junto con HATU (165,4 mg,

0,44 mmol, 3 eq.) y DIEA (148 μ l, 0,87 mmol, 6 eq.) en la mínima cantidad de DMF (apdo. 3.1.1.1). Se dejó reaccionando durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación y se filtró la resina. Seguidamente se lavó la resina con 10 ml DMF (5 x 1 min) y se evaluó cualitativamente la eficiencia del acoplamiento mediante el test de ninhidrina (apdo. 3.2.1). Se eliminó el grupo Fmoc tratando la resina con 10 ml de una disolución de 20% de piperidina en DMF (2 x 10 min) (apdo. 3.3) y se lavó la resina con 10 ml de DMF (5 x 1 min). Se determinó la eficiencia de eliminación del grupo protector del utilizando el test de ninhidrina.

Se incorporó el aminoácido Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (257 mg, 0,47 mmol, 3 eq.), junto con HATU (165,4 mg, 0,44 mmol, 3 eq.) y DIEA (148 μ l, 0,87 mmol, 6 eq.) en la mínima cantidad de DMF (apdo. 3.1.3, método C). Después de 30 minutos de reacción a temperatura ambiente y agitando con frecuencia, se filtró la resina y se lavó con 10 ml de DMF (5 x 1 min). Se realizó el test de ninhidrina para comprobar la eficiencia del acoplamiento.

Se eliminó el grupo Fmoc del extremo α - y ϵ -amino tratando la peptidil-resina con 10 ml de una disolución de 20% de piperidina en DMF (2 x 10 min). Se lavó la peptidil-resina con 10 ml de DMF (5 x 1 min) y se determinó la eficiencia de eliminación del grupo protector utilizando el test de ninhidrina.

El siguiente aminoácido a incorporar es otra Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (513,9 mg, 0,87 mmol, 6 eq.), que se enlazará tanto al extremo α -amino como al ϵ -amino. La reacción se llevó a cabo en presencia de HATU (330,9 mg, 0,87 mmol, 6 eq.) y DIEA (295,9 μ l, 1,74 mmol, 12 eq.) en la mínima cantidad de DMF (apdo. 3.1.3). Se lavó la peptidil-resina con 10 ml de DMF (5 x 1 min) tras los 30 minutos de reacción a temperatura ambiente y se evaluó la eficacia del acoplamiento con el test de ninhidrina.

Tratando la peptidil-resina con 10 ml de una disolución de 20% de piperidina en DMF (2 x 10 min), se eliminó el grupo Fmoc del extremo α - y ϵ -amino. Tras los lavados con 10 ml de DMF (5 x 1 min), se determinó la eficiencia de eliminación del grupo protector utilizando el test de ninhidrina.

Se secaron aproximadamente 20 mg de peptidil-resina (apdo. 3.5, tabla 13) y se separó el péptido de la resina con 2 ml de la mezcla acidolítica TFA:H₂O (97:3). Tras 2 horas de reacción a temperatura ambiente con agitación, se aisló el péptido como se indica en el apartado 3.6.1.

4.11.2. Síntesis de la secuencia E(17-26) en los extremos N α y N' ϵ del núcleo de lisinas

Una vez sintetizado el núcleo de lisinas tetramérico, se llevó a cabo la síntesis simultánea de las cuatro cadenas lineales de la secuencia peptídica E2(17-26) sobre los extremos N α y N' ϵ del mismo para formar el MAP_{LP3}. El acoplamiento de los aminoácidos (1,74 mmol, 12 eq.) de la secuencia peptídica [Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Abu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gln(trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH], se realizó como se ha indicado en el apartado 3.1.3 (tabla 7), utilizando como activadores DIEA (591,8 μ l, 3,48 mmol, 24 eq.) y HATU (661,7 mg, 1,74 mmol, 12 eq.). Cuando los acoplamientos fueron incompletos, se repitió la reacción en las mismas condiciones. Si aún así éstos seguían sin completarse, se empleó como activador HOBt (235,1 mg, 1,74 mmol, 12 eq.) en presencia de DIPCPI (267,8 μ l, 1,74 mmol, 12 eq.), como se indica en el método D del apartado 3.1.3 (tabla 8). El grupo Fmoc del extremo α -amino de los aminoácidos se eliminó siguiendo el procedimiento del apartado 3.3. La eficacia de las etapas de acoplamiento y desprotección se comprobó mediante el test de ninhidrina (apdo. 3.2.1), excepto en el caso del residuo serina. Para evaluar tanto la eliminación del grupo Fmoc de este aminoácido como el acoplamiento con el siguiente se empleó el test de TNBS (apdo. 3.2.3).

Se desprotegieron los extremos α -amino con 10 ml de 20% de piperidina en DMF (2 x 10 min) (apdo. 3.3) y se hicieron lavados de la peptidil-resina con 10 ml de DMF (5 x 1 min). La eficiencia de la reacción se evaluó mediante el test de ninhidrina. Finalmente, se secó la peptidil-resina siguiendo el protocolo del apartado 3.5 (tabla 13) y se separó el péptido ramificado de una alícuota de peptidil-resina (~30 mg) tal y como se indica en el apartado 3.6.1.

4.12. MAP TETRAMÉRICO DE TIPO LINEAL E2(11-26) (MAP_{LP2})

El MAP_{LP2} se sintetizó a partir de 0,804 mg de peptidil-resina del MAP_{LP3} sintetizado en el apartado 4.12, cuya nueva funcionalización era 0,12 mmol/g (0,096 mmol). Se hinchó la peptidil-resina durante 1 hora y se incorporaron los aminoácidos (1,16 mmol, 12 eq.) siguientes en la secuencia peptídica [Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH] junto con DIEA (393,8 μ l, 2,32 mmol, 24 eq.) y HATU (440,3 mg, 1,16 mmol, 12 eq.), como se indica en el apartado 3.1.3 (tabla 7). Cuando los acoplamientos fueron incompletos, se repitió la reacción en las mismas condiciones. Si éstos no

se completaban, se lavó la peptidil-resina con 0,4 M de LiBr, siguiendo el procedimiento del apartado 3.1.3 (tabla 12) y se volvió a añadir el aminoácido empleando HOBt (156,4 mg, 1,16 mmol, 12 eq.) y DIPCDI (178,2 μ l, 1,16 mmol, 12 eq.), según el protocolo del apartado 3.1.3 (tabla 8, método D). La eliminación del grupo Fmoc del extremo α -amino de los aminoácidos se llevó a cabo siguiendo el procedimiento del apartado 3.3. Se empleó el test de ninhidrina (apdo. 3.2.1) para evaluar las etapas de acoplamiento y desprotección. Se utilizó el test de cloranilo (apdo. 3.2.2) para comprobar la eficacia de la desprotección del grupo $N\alpha$ de la prolina y el acoplamiento del siguiente aminoácido; y el test de TNBS (apdo. 3.2.3) en el caso de la treonina. La eliminación del Fmoc de los extremos α -amino se llevó a cabo con 10 ml de 20% de piperidina en DMF (2 x 10 min) (apdo. 3.3), lavando posteriormente con 10 ml de DMF (5 x 1 min). Se determinó la eficiencia de la reacción mediante el test de ninhidrina y se secó la peptidil-resina (tabla 13, apartado 3.5). Por último, se separó el MAP de una alícuota de peptidil-resina (~30 mg) tal y como se indica en el apartado 3.6.1.

4.13. MAP TETRAMÉRICO DE TIPO LINEAL E2(7-26) (MAP_{LP1})

La síntesis del MAP_{LP1} se llevó a cabo partiendo de 457 mg de la peptidil-resina del MAP_{LP2}, siendo la nueva funcionalización 0,08 mmol/g (0,037 mmol). Tras hinchar la resina durante 1 hora con DMF, se acoplaron los aminoácidos (0,44 mmol, 12 eq.) siguientes en la secuencia peptídica [Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH], como se indica en el apartado 3.1.3 (tabla 7), utilizando DIEA (149,2 μ l, 0,88 mmol, 24 eq.) y HATU (166,8 mg, 0,44 mmol, 12 eq.) como activadores. Se repitió la reacción en las mismas condiciones cuando los acoplamientos fueron incompletos. Si la eficacia de la reacción aún no era buena, se lavó la peptidil-resina con 0,4 M de LiBr (apdo. 3.1.3, tabla 12) y se añadió de nuevo el aminoácido junto con HOBt (59,3 mg, 0,44 mmol, 12 eq.) y DIPCDI (67,5 μ l, 0,44 mmol, 12 eq.), siguiendo el protocolo indicado en la tabla 8 (apdo. 3.1.3). El grupo protector Fmoc del extremo $N\alpha$ de los aminoácidos se eliminó siguiendo el procedimiento del apartado 3.3, con 10 ml de 20% de piperidina en DMF (2 x 10 min) y lavando posteriormente con 10 ml de DMF (5 x 1 min). Se evaluó la eficiencia de la desprotección del grupo α -amino y del acoplamiento de los aminoácidos con el test de ninhidrina (apdo. 3.2.1). En el caso de la prolina se empleó el test de cloranilo (apdo. 3.2.2) y en el caso de la serina el test de TNBS (apdo. 3.2.3). Finalmente, se secó la peptidil-resina siguiendo el protocolo de la tabla 13 (apdo. 3.5) y se separó el péptido ramificado de una alícuota de peptidil-resina (~30 mg) tal y como se indica en el apartado 3.6.1.

4.14. MAP TETRAMÉRICO DE TIPO CÍCLICO E2(17-26) (MAP_{CP3})

La formación del MAP_{CP3} puede dividirse fundamentalmente en tres etapas: la síntesis del núcleo de lisinas tetracloroacetilado (apdo. 4.14.1), la síntesis del péptido cíclico CP3 (apdo. 4.7) y por último, la ligación de estas moléculas peptídicas mediante una reacción de tioeterificación (apdo. 4.14.2).

4.14.1. Núcleo de lisinas tetracloroacetilado.

La síntesis del núcleo de lisinas tetramérico para la formación de los MAPs de tipo cíclico se realizó a partir de 200 mg de resina NovaSyn TGR (0,29 mmol/g, 0,06 mmol), tal y como se describe en el apartado 4.11.1. Sobre esta resina se acoplaron los aminoácidos Fmoc-βAla-OH, (54,2 mg, 0,17 mmol, 3 eq.) y Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (102,8 mg, 0,17 mmol, 3 eq.) con HATU (66,2 mg, 0,17 mmol, 3 eq.) y DIEA (59,2 μl, 0,35 mmol, 6 eq.) en la mínima cantidad de DMF (apdo. 3.1.1.1), y posteriormente se incorporó de nuevo el aminoácido Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (205,6 mg, 0,035 mmol, 6 eq.), que se enlazaría tanto al extremo α-amino como al ε-amino de la lisina anterior. La reacción se llevó a cabo en presencia de HATU (132,3 mg, 0,35 mmol, 6 eq.) y DIEA (118,4 μl, 0,70 mmol, 12 eq.). La eliminación del grupo Fmoc se llevó a cabo tratando la peptidil-resina con 10 ml de una disolución de 20% de piperidina en DMF (2 x 10 min). Los lavados de la peptidil-resina se llevaron a cabo con 10 ml de DMF (5 x 1 min) y la eficiencia de eliminación del grupo protector se determinó utilizando el test de ninhidrina.

Finalmente, se derivatizaron tanto los extremos N α como N ϵ con ácido cloroacético (65,8 mg, 0,70, 3 eq.), utilizando HATU (264,7 mg, 0,70 mmol, 3 eq.) y DIEA (236,7 mg, 1,39 mmol, 6 eq.). Se dejó reaccionar durante 30 minutos agitando con frecuencia y se lavó la peptidil-resina con DMF (5 x 1 min). Se realizó el test de ninhidrina para comprobar la eficacia del acoplamiento.

Se secó una alícuota de peptidil-resina (44 mg) como se indica en el apartado 3.5 (tabla 13) y se separó el péptido de la resina con 15 ml de la mezcla acidolítica TFA:H₂O:TIS (95:2,5:2,5). La reacción se dejó agitando 2 horas a temperatura ambiente y se aisló el péptido siguiendo el procedimiento del apartado 3.6.1.

4.14.2. Reacción de tioeterificación

La reacción de tioeterificación entre el péptido cíclico CP3 (720 μg , 0,62 μmol , 8 eq.), sintetizado como se explica en el apartado 4.7, y el núcleo de lisinas tetracloroacetilado (0,4 mg, 0,5 μmol), sintetizado como se indica en el apartado anterior, se llevó a cabo en tampón Tris-HCl 0,1 M a pH 8,2. En primer lugar se disolvió el núcleo de lisinas en el tampón a una concentración 0,05 mM y se pasó corriente de nitrógeno. Posteriormente, se añadieron alícuotas del péptido cíclico en fase sólida aproximadamente cada 15 minutos. La mezcla se dejó agitando en atmósfera inerte durante 24 horas y se monitorizó por HPLC y espectrometría de masas MALDI-TOF. Finalmente, la reacción se acidificó con TFA hasta pH \sim 3 y se aislaron los productos formados mediante HPLC semipreparativo.

5. OBTENCIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES PEPTÍDICAS DERIVADAS DEL EXTREMO N-TERMINAL DE LA PROTEÍNA E2 DEL GBV-C

De manera general, el rendimiento del desanclaje del péptido de la resina se calculó mediante la cuantificación del crudo peptídico por pesada y tomando como valor teórico la escala de trabajo utilizada, es decir, el peso de la resina y la funcionalización de la misma.

El rendimiento de purificación se calculó determinando la cantidad de péptido puro obtenido y como valor teórico el peso de crudo peptídico purificado.

El rendimiento de síntesis se expresa como combinación del rendimiento de desanclaje y de purificación.

5.1. OBTENCIÓN DEL PÉPTIDO LINEAL E2(7-26) (LP1_{E2})

La síntesis del péptido lineal LP1_{E2} se realizó tal y como se describe en el apartado 4.1.

Aminoácidos protegidos: Fmoc-Asn(trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Abu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gln(trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH.

Resina: Cl-trt (200 mg, 1,3 mmol/g, 0,26 mmol; reducida a 0,65 mmol/g, 0,13 mmol).

Reactivos para el acoplamiento de los aminoácidos: Fmoc-AA-OH (0,39 mmol, 3 eq.), HATU (148,3 mg, 0,39 mmol, 3 eq.), DIEA (132,7 μ l, 0,78 mmol, 6 eq.).

El desanclaje del péptido se realizó tratando a la peptidil-resina con el método descrito en el apartado 3.6.1, utilizando la mezcla acidolítica TFA:H₂O:TIS (95:2,5:2,5) (14,25 ml TFA, 0,375 ml H₂O, 0,375 ml TIS) y con el procedimiento indicado en el apartado 3.3.2, utilizando la mezcla acidolítica 1% TFA en DCM.

Rendimiento del desanclaje del péptido totalmente desprotegido: 69% (38,8 mg de crudo peptídico).

Condiciones de purificación: gradiente isocrático de 5 minutos a 90% A seguido de gradiente lineal de 90% A a 45% A en 20 min, flujo 3,5 ml/min, detección por UV a 220 nm.

Pureza: > 95%

Rendimiento de purificación: 28% (5,6 mg de péptido purificado).

Rendimiento de síntesis: 19%

Pureza: ~80%

RP-HPLC: $t_R = 10,61$ min (gradiente lineal 95% A a 5% A en 20 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm).

ES⁺: 2220,4 m/z ([M+H]⁺ experimental); 2220,1 m/z ([M+H]⁺ calculada).

5.2. OBTENCIÓN DEL PÉPTIDO LINEAL E2(11-26) (LP2_{E2})

La síntesis del péptido lineal LP2_{E2} se realizó como se indica en el apartado 4.2.

Aminoácidos protegidos: Fmoc-Asn(trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Abu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gln(trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH.

Resina: Cl-trt (200 mg, 1,3 mmol/g, 0,26 mmol; reducida a 0,65 mmol/g, 0,13 mmol).

Reactivos para el acoplamiento de los aminoácidos: Fmoc-AA-OH (0,39 mmol, 3 eq.), HATU (148,3 mg, 0,39 mmol, 3 eq.), DIEA (132,7 μ l, 0,78 mmol, 6 eq.).

El desanclaje del péptido se realizó tratando a la peptidil-resina con el método descrito en el apartado 3.6.1, utilizando la mezcla acidolítica TFA:H₂O:TIS (95:2,5:2,5) (14,25 ml TFA, 0,375 ml H₂O, 0,375 ml TIS) y con el procedimiento indicado en el apartado 3.3.2, utilizando la mezcla acidolítica 1% TFA en DCM.

Rendimiento del desanclaje del péptido totalmente desprotegido: 73% (21,6 mg de crudo peptídico).

Condiciones de purificación: gradiente lineal de 90% A a 30% A en 20 min, flujo 3,5 ml/min, detección por UV a 220 nm.

Pureza: > 95%

Rendimiento de purificación: 20% (2,4 mg de péptido purificado).

Rendimiento de síntesis: 15%

RP-HPLC: $t_R = 12,82$ min (gradiente lineal 95% A a 5% A en 20 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm).

ES⁺: 1823,1 m/z ([M+H]⁺ experimental); 1822,8 m/z ([M+H]⁺ calculada).

5.3. OBTENCIÓN DEL PÉPTIDO LINEAL E2(17-26) (LP3_{E2})

La síntesis del péptido lineal LP3_{E2} se realizó como se indica en el apartado 4.3.

Aminoácidos protegidos: Fmoc-Asn(trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Abu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gln(trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH.

Resina: Cl-trt (223 mg, 1,3 mmol/g, 0,26 mmol; reducida a 0,65 mmol/g, 0,13 mmol).

Reactivos para el acoplamiento de los aminoácidos: Fmoc-AA-OH (0,43 mmol, 3 eq.), HATU (165,4 mg, 0,43 mmol, 3 eq.), DIEA (147,9 μ l, 0,87 mmol, 6 eq.).

El desanclaje del péptido se realizó tratando a la peptidil-resina con el método descrito en el apartado 3.6.1, utilizando la mezcla acidolítica TFA:H₂O:TIS (95:2,5:2,5) (14,25 ml TFA, 0,375 ml H₂O, 0,375 ml TIS) y con el procedimiento indicado en el apartado 3.3.2, utilizando la mezcla acidolítica 1% TFA en DCM.

Rendimiento del desanclaje del péptido totalmente desprotegido: 76% (25,4 mg de crudo peptídico).

Condiciones de purificación: gradiente lineal de 95% A a 50% A en 20 min, flujo 3,5 ml/min, detección por UV a 220 nm.

Pureza: > 95%

Rendimiento de purificación: 25% (3,7 mg de péptido purificado).

Rendimiento de síntesis: 19%.

RP-HPLC: t_R = 11,81 min (gradiente lineal 95% A a 5% A en 20 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm).

ES⁺: 1178,7 m/z ([M+H]⁺ experimental); 1178,5 m/z ([M+H]⁺ calculada).

5.4. OBTENCIÓN DEL PÉPTIDO LINEAL NS4a(27-43)

La síntesis del péptido lineal NS4a(27-43) se llevó a cabo tal y como se explica en el apartado 4.4.

Aminoácidos protegidos: Fmoc-Asp(trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(trt)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH.

Resina: Cl-trt (200 mg, 1,3 mmol/g, 0,26 mmol; reducida a 0,65 mmol/g, 0,13 mmol).

Reactivos para el acoplamiento de los aminoácidos: Fmoc-AA-OH (0,39 mmol, 3 eq.), HATU (148,3 mg, 0,39 mmol, 3 eq.), DIEA (132,7 μ l, 0,78 mmol, 6 eq.).

El desanclaje del péptido se realizó tratando a la peptidil-resina con el método descrito en el apartado 3.6.1, utilizando la mezcla acidolítica TFA:H₂O:TIS (95:2,5:2,5) (14,25 ml TFA, 0,375 ml H₂O, 0,375 ml TIS) y con el procedimiento indicado en el apartado 3.3.2, utilizando la mezcla acidolítica 1% TFA en DCM.

Rendimiento del desanclaje del péptido totalmente desprotegido: 81% (49,3 mg de crudo peptídico).

Condiciones de purificación: gradiente lineal de 85% A a 15% A en 20 min, flujo 3,5 ml/min, detección por UV a 220 nm.

Pureza: > 95%

Rendimiento de purificación: 19% (2,5 mg de péptido purificado).

Rendimiento de síntesis: 15%

RP-HPLC: $t_R = 10,80$ min (gradiente lineal 95% A a 5% A en 30 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm).

ES⁺: 2020,9 m/z ([M+H]⁺ experimental); 2021,1 m/z ([M+H]⁺ calculada).

5.5. OBTENCIÓN DEL PÉPTIDO CÍCLICO E2(7-26) (CP1): Cyc-HT-CysE2(7-26)

La ciclación del péptido lineal LP1_{E2} mediante la reacción de Ligación Química Nativa intramolecular se llevó a cabo como se describe en el apartado 4.5.

El rendimiento de la reacción de tioesterificación se calculó determinando la cantidad de péptido obtenido, y como valor teórico, el peso del péptido derivatizado que se esperaba obtener.

El rendimiento de la reacción de ciclación del péptido se calculó como porcentaje de formación del CP1 a partir del correspondiente tioéster, relacionando las áreas obtenidas por UPLC-MS antes y después de la reacción.

El rendimiento de purificación se calculó determinando la cantidad de péptido puro obtenido y, como valor teórico, el peso del péptido cíclico que se esperaba obtener.

El rendimiento de síntesis se expresa como combinación del rendimiento de la reacción de tioesterificación, de la reacción de ciclación y de purificación.

Condiciones de la reacción de tioesterificación: Cys-LP1_{E2} protegido (33 mg, 8,33 μ mol), éster 3-mercaptopropanoato de metilo (20 μ l, 0,167 mmol, 20 eq.), WSCDI (24 mg, 0,12 mmol, 15 eq.), HOBt (17 mg, 0,12 mmol, 15 eq.), 4°C.

Se eliminaron los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos y el grupo Boc que protegía el extremo N-terminal siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 3.6.1: TFA:H₂O:TIS (95:2,5:2,5) (14,25 ml TFA, 0,375 ml H₂O, 0,375 ml).

La reacción de ciclación se llevó a cabo según el protocolo del apartado 3.5: Cys-LP1_{E2} tioesterificado (15 mg, 6,5 μ mol), TCEP (3,7 mg, 13 μ mol, 2 eq.), éster 3-mercaptopropanoato de metilo (4 μ l, 32,5 μ mol, 5 eq.).

Rendimiento de la reacción de tioesterificación: 48%

Rendimiento de la reacción de ciclación: 72%

Condiciones de purificación: gradiente isocrático de 5 minutos a 85% A seguido de gradiente lineal de 90% A a 45% A en 20 min, flujo 3,5 ml/min, detección por UV a 220 nm.

Pureza: >95%

Rendimiento de purificación: 21% (2,2 mg de péptido purificado).

Rendimiento de síntesis: 7%

RP-HPLC: $t_R = 14,18$ min (gradiente lineal 95% A a 5% A en 25 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm).

ES⁺: 2220,4 m/z ([M+H]⁺ experimental); 2220,1 m/z ([M+H]⁺ calculada).

5.6. OBTENCIÓN DEL PÉPTIDO CÍCLICO E2(11-26) (CP2): Cyc-HT-CysE2(11-26)

El péptido LP2_{E2} se cicló mediante la reacción de Ligación Química Nativa intramolecular se llevó a cabo como se describe en el apartado 4.6. El rendimiento de la reacción de tioesterificación, de la reacción de ciclación, de la purificación y el de síntesis se calculó tal y como se describe en el apartado 5.5.

Condiciones de tioesterificación: Cys-LP2_{E2} protegido (22,8 mg, 29,6 μ mol), éster 3-mercaptopropanoato de metilo (16 μ l, 0,15 mmol, 20 eq.), WSCDI (21,2 mg, 0,11 mmol, 15 eq.), HOBt (15 mg, 0,11 mmol, 15 eq.), 4°C.

Se eliminaron los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos y el grupo Boc que protegía el extremo N-terminal siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 3.6.1: TFA:H₂O:TIS (95:2,5:2,5) (9,5 ml TFA, 0,250 ml H₂O, 0,250 ml).

La reacción de ciclación se realizó siguiendo el protocolo del apartado 3.5: Cys-LP2_{E2} tioesterificado (11,6 mg, 6 μ mol), TCEP (3,4 mg, 12 μ mol, 2 eq.), éster 3-mercaptopropanoato de metilo (4 μ l, 30 μ mol, 5 eq.).

Rendimiento de la reacción de tioesterificación: 46%

Rendimiento de la reacción de ciclación: 88%

Condiciones de purificación: gradiente isocrático de 5 minutos a 85% A seguido de gradiente lineal de 90% A a 40% A en 20 min, flujo 3,5 ml/min, detección por UV a 220 nm.

Pureza: >95%

Rendimiento de purificación: 17% (1,6 mg de péptido purificado).

Rendimiento de síntesis: 7%

RP-HPLC: $t_R = 14,18$ min (gradiente lineal 95% A a 5% A en 25 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm).

ES⁺: 1805,8 m/z ([M+H]⁺ experimental); 1806,0 m/z ([M+H]⁺ calculada).

5.7. OBTENCIÓN DEL PÉPTIDO CÍCLICO E2(17-26) (CP3): Cyc-HT-CysE2(17-26)

El péptido cíclico CP3 se sintetizó a partir del péptido lineal LP3_{E2} mediante la reacción de Ligación Química Nativa intramolecular como se describe en el apartado 4.7. El rendimiento de la reacción de tioesterificación, de la reacción de ciclación, de la purificación y el de síntesis se calculó tal y como se describe en el apartado 5.5.

Condiciones de tioesterificación: Cys-LP3_{E2} protegido (52,3 mg, 23,1 μ mol), éster 3-mercaptopropanoato de metilo (51,2 μ l, 0,46 mmol, 20 eq.), WSCDI (66,2 mg, 0,35 mmol, 15 eq.), HOBt (47,3 mg, 0,35 mmol, 15 eq.), 4°C.

Se eliminaron los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos y el grupo Boc que protegía el extremo N-terminal siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 3.6.1: TFA:H₂O:TIS (95:2,5:2,5) (9,5 ml TFA, 0,250 ml H₂O, 0,250 ml).

La reacción de ciclación se realizó siguiendo el protocolo del apartado 3.5: Cys-LP3_{E2} tioesterificado (12,2 mg, 9,5 μ mol), TCEP (5,4 mg, 19 μ mol, 2 eq.), éster 3-mercaptopropanoato de metilo (26 μ l, 47,5 μ mol, 5 eq.).

Rendimiento de la reacción de tioesterificación: 47%

Rendimiento de la reacción de ciclación: 98%

Condiciones de purificación: gradiente isocrático de 5 minutos a 85% A seguido de gradiente lineal de 85% A a 40% A en 20 min, flujo 3,5 ml/min, detección por UV a 220 nm.

Pureza: >95%

Rendimiento de purificación: 26% (2,8 mg de péptido purificado).

Rendimiento de síntesis: 12%

RP-HPLC: $t_R = 12,83$ min (gradiente lineal 95% A a 5% A en 25 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm).

ES⁺: 1160,6 m/z ([M+H]⁺ experimental); 1160,5 m/z ([M+H]⁺ calculada).

5.8. OBTENCIÓN DEL PÉPTIDO CÍCLICO NS4a(27-43): Cyc-HT-CysNS4a(27-43)

La síntesis del péptido Cyc-HT-CysNS4a(27-43) se llevó a cabo partiendo del péptido lineal NS4a(27-43) mediante la reacción de Ligación Química Nativa intramolecular como se describe en el apartado 4.8. El rendimiento de la reacción de tioesterificación, de la reacción de ciclación, de la purificación y el de síntesis se calculó tal y como se describe en el apartado 5.5.

Condiciones de tioesterificación: Cys-NS4a(27-43) protegido (30,3 mg, 8,89 μmol), éster 3-mercaptopropanoato de metilo (18,7 mg, 0,18 mmol, 20 eq.), WSCDI (24,8 mg, 0,13 mmol, 15 eq.) y HOBt (17,6 mg, 0,13 mmol, 15 eq.), 4°C.

Se eliminaron los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos y el grupo Boc que protegía el extremo N-terminal siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 3.6.1: TFA:H₂O:TIS (95:2,5:2,5) (9,5 ml TFA, 0,250 ml H₂O, 0,250 ml).

La reacción de ciclación se realizó siguiendo el protocolo del apartado 3.5: CysNS4a(27-43) tioesterificado (6,7 mg, 3,2 μmol), TCEP (1,8 mg, 6,4 μmol , 2 eq.), 3-mercaptopropanamida (1,7 mg, 16 μmol , 5 eq.).

Rendimiento de la reacción de tioesterificación: 52%

Rendimiento de la reacción de ciclación: 77%

Condiciones de purificación: gradiente isocrático de 5 minutos a 85% A seguido de gradiente lineal de 85% A a 40% A en 20 min, flujo 3,5 ml/min, detección por UV a 220 nm.

Pureza: >95%

Rendimiento de purificación: 23% (1,5 mg de péptido purificado).

Rendimiento de síntesis: 9%

RP-HPLC: $t_R = 7,43$ min (gradiente lineal 95% A a 5% A en 20 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm).

ES⁺: 2003,7 m/z ([M+H]⁺ experimental); 2003,1 m/z ([M+H]⁺ calculada).

5.9. OBTENCIÓN DEL MAP DIMÉRICO DE TIPO LINEAL E2(7-26) CLOROACETILADO

La síntesis del MAP dimérico con dos cadenas peptídicas lineales de la secuencia E2(7-26) se llevó a cabo como se describe en el apartado 4.10.

Aminoácidos protegidos: Fmoc- β Ala-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, Fmoc-Lys(ivDde)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Abu-OH,

Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gln(trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH.

Resina: NovaSyn TGR (783 mg de peptidil-resina del núcleo de lisinas ortogonalmente protegido, 0,23 mmol/g, 0,18 mmol).

Reactivos para el acoplamiento de los aminoácidos: Fmoc-AA-OH (1,08 mmol, 6 eq.), HOBt (146 mg, 1,08 mmol, 6 eq.)/DIPCDI (166,3 μ l, 1,08 mmol, 6 eq.), TBTU (347 mg, 1,08 mmol, 6 eq.)/DIEA (367,5 μ l, 2,16 mmol, 12 eq.).

Reactivos para el acoplamiento del ácido cloroacético: ácido cloroacético (42,6 mg, 0,45 mmol, 6 eq.), HATU (171,6 mg, 0,45 mmol, 6 eq.), DIEA (153,5 μ l, 0,90 mmol, 12 eq.).

El desanclaje del péptido se realizó tratando a la peptidil-resina con el método descrito en el apartado 3.6.1, utilizando la mezcla acidolítica TFA:H₂O:TIS (95:2,5:2,5) (14,25 ml TFA, 0,375 ml H₂O, 0,375 ml TIS).

Rendimiento de desanclaje: 83% (48,5 mg de crudo peptídico).

Condiciones de purificación: gradiente isocrático de 5 minutos a 75% A seguido de gradiente lineal de 75% A a 15% A en 20 min, flujo 3,5 ml/min, detección por UV a 220 nm.

Pureza: ~80%

Rendimiento de purificación: 13% (2,1 mg de péptido purificado).

Rendimiento de síntesis: 11%

RP-HPLC: t_R = 14,03 min (gradiente lineal 95% A a 5% A en 20 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm).

ES⁺: 4825,5 m/z ([M+H]⁺ experimental); 4825,4 m/z ([M+H]⁺ calculada).

5.10. OBTENCIÓN DE MAP TETRAMÉRICO DE TIPO LINEAL HETEROGÉNEO (MAP_{E2/NS4})

La síntesis del MAP_{E2/NS4} se llevó a cabo como se describe en el apartado 4.9.

Aminoácidos protegidos: Fmoc- β Ala-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, Fmoc-Lys(ivDde)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Abu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gln(trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Boc-Cys(trt)-OH, Fmoc-His(trt)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH.

Resina: NovaSyn TGR (352 mg peptidil-resina del MAP dimérico formado por dos secuencias lineales de la región E2(7-26) y los extremos N^o libres; 0,23 mmol/g, 0,18 mmol).

Reactivos para el acoplamiento de los aminoácidos: Fmoc-AA-OH (1,08 mmol, 6 eq.), HOBT (65,6 mg, 0,49 mmol, 6 eq.)/DIPCDI (74,8 μ l, 0,49 mmol, 6 eq.), TBTU (156 mg, 0,49 mmol, 6 eq.)/DIEA (165,2 μ l, 0,97 mmol, 12 eq.).

El desanclaje del péptido se realizó tratando a la peptidil-resina con el método descrito en el apartado 3.6.1, utilizando la mezcla acidolítica TFA:H₂O:TIS (95:2,5:2,5) (17,1 ml TFA, 0,45 ml H₂O, 0,45 ml TIS).

Rendimiento de desanclaje: 66% (115,7 mg de crudo peptídico).

Condiciones de purificación: gradiente isocrático de 5 minutos a 85% A seguido de gradiente lineal de 85% A a 45% A en 30 min, flujo 3,5 ml/min, detección por UV a 220 nm.

Pureza: >90%

Rendimiento de purificación: 12% (2,1 mg de péptido purificado).

Rendimiento de síntesis: 8%

RP-HPLC: t_R = 10,64 min (gradiente lineal 95% A a 5% A en 20 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm).

MALDI-TOF: 8356,6 m/z ([M+H]⁺ experimental); 8357,0 m/z ([M+H]⁺ calculada).

5.11. OBTENCIÓN DEL MAP TETRAMÉRICO LINEAL E2(17-26) (MAP_{LP3})

La síntesis del MAP_{LP3} se llevó a cabo como se describe en el apartado 4.11.

Aminoácidos protegidos: Fmoc- β Ala-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Abu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gln(trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH.

Resina: NovaSyn TGR (500 mg peptidil-resina resina del núcleo de lisinas sintetizado como se indica en el apartado 4.1.2; 0,26 mmol/g, 0,13 mmol).

Reactivos para el acoplamiento de los aminoácidos: Fmoc-AA-OH (1,2 mmol, 12 eq.), HATU (456,4 mg, 1,2 mmol, 12 eq.), DIEA (408,2 μ l, 2,4 mmol, 24 eq.).

El desanclaje del péptido se realizó tratando a la peptidil-resina con el método descrito en el apartado 3.6.1, utilizando la mezcla acidolítica TFA:H₂O:TIS (95:2,5:2,5) (14,25 ml TFA, 0,375 ml H₂O, 0,375 ml TIS).

Rendimiento de desanclaje: 72% (69,6 mg de crudo peptídico).

Condiciones de purificación: gradiente isocrático de 5 minutos a 90% A seguido de gradiente lineal de 90% A a 45% A en 20 min, flujo 3,5 ml/min, detección por UV a 220 nm.

Pureza: >95%

Rendimiento de purificación: 14% (1,7 mg de péptido purificado).

Rendimiento de síntesis: 10%

RP-HPLC: $t_R = 12,77$ min (gradiente lineal 95% A a 5% A en 25 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm).

MALDI-TOF: 4703,0 m/z ($[M+H]^+$ experimental); 4703,1 m/z ($[M+H]^+$ calculada).

5.12. OBTENCIÓN DEL MAP TETRAMÉRICO DE TIPO LINEAL E2(11-26) (MAP_{LP2})

El MAP_{LP2} se sintetizó tal y como se indica en el apartado 4.12.

Aminoácidos protegidos: Fmoc-βAla-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Abu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gln(trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH.

Resina: NovaSyn TGR (804 mg de peptidil-resina del MAP_{LP3} sintetizado en el apartado 4.12; 0,12 mmol/g, 0,096 mmol).

Reactivos para el acoplamiento de los aminoácidos: Fmoc-AA-OH (1,16 mmol, 12 eq.), HATU (440,3 mg, 1,16 mmol, 12 eq.), DIEA (393,8 μl, 2,32 mmol, 24 eq.).

El desanclaje del péptido se realizó tratando a la peptidil-resina con el método descrito en el apartado 3.6.1, utilizando la mezcla acidolítica TFA:H₂O:TIS (95:2,5:2,5) (17,1 ml TFA, 0,45 ml H₂O, 0,45 ml TIS).

Rendimiento de desanclaje: 68% (92,7 mg de crudo peptídico).

Condiciones de purificación: gradiente isocrático de 5 minutos a 80% A seguido de gradiente lineal de 80% A a 45% A en 20 min, flujo 3,5 ml/min, detección por UV a 220 nm.

Pureza: >95%

Rendimiento de purificación: 10% (1,3 mg de péptido purificado).

Rendimiento de síntesis: 6,8%

RP-HPLC: $t_R = 14,98$ min (gradiente lineal 95% A a 5% A en 25 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm).

ES⁺: 7281,2 m/z ($[M+H]^+$ experimental); 7281,0 m/z ($[M+H]^+$ calculada).

5.13. OBTENCIÓN DEL MAP TETRAMÉRICO DE TIPO LINEAL E2(7-26) (MAP_{LP1})

Se llevó a cabo la síntesis del MAP_{LP1} tal y como se indica en el apartado 4.13.

Aminoácidos protegidos: Fmoc-βAla-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Abu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH,

Fmoc-Gln(trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH.

Resina: NovaSyn TGR (457 mg de peptidil-resina del MAP_{LP2}, sintetizado en el apartado 4.12; 0,08 mmol/g, 0,037 mmol).

Reactivos para el acoplamiento de los aminoácidos: Fmoc-AA-OH (0,44 mmol, 12 eq.), HATU (166,8 mg, 0,44 mmol, 12 eq.), DIEA (149,2 μ l, 0,88 mmol, 24 eq.).

El desanclaje del péptido se realizó tratando a la peptidil-resina con el método descrito en el apartado 3.6.1, utilizando la mezcla acidolítica TFA:H₂O:TIS (95:2,5:2,5) (17,1 ml TFA, 0,45 ml H₂O, 0,45 ml TIS).

Rendimiento de desanclaje: 58% (103,8 mg de crudo peptídico).

Condiciones de purificación: gradiente isocrático de 5 minutos a 80% A seguido de gradiente lineal de 80% A a 60% A en 20 min, flujo 3,5 ml/min, detección por UV a 220 nm.

Pureza: >95%

Rendimiento de purificación: 5% (1,1 mg de péptido purificado).

Rendimiento de síntesis: 3%

RP-HPLC: $t_R = 14,60$ min (gradiente lineal 95% A a 5% A en 25 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm).

ES⁺: 8870,9 m/z ([M+H]⁺ experimental); 8870,7 m/z ([M+H]⁺ calculada).

5.14. OBTENCIÓN DEL MAP TETRAMÉRICO DE TIPO CÍCLICO E2(17-26) (MAP_{CP3})

El MAP_{CP3} se sintetizó como se describe en el apartado 4.14, a partir del núcleo de lisinas tetracloroacetilado (apdo. 4.14.1) y del péptido cíclico CP3 (apdo. 4.7).

El rendimiento de reacción se expresa como el rendimiento de purificación, que se calculó determinando la cantidad de péptido puro obtenido y, como valor teórico, la cantidad de MAP_{CP3} que se esperaba obtener tras la reacción.

El rendimiento de síntesis se expresa como combinación del rendimiento de reacción y de los rendimientos de síntesis obtenidos para los precursores de la reacción: 12% en el caso del CP3 y 21% en el caso del núcleo de lisinas.

5.14.1. Obtención del núcleo de lisinas tetracloroacetilado

La síntesis del núcleo de lisinas tetracloroacetilado se realizó tal y como se describe en el apartado 4.14.1.

Aminoácidos protegidos: Fmoc-βAla-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH.

Resina: NovaSyn TGR (200 mg, 0,29 mmol/g, 0,06 mmol).

Reactivos para el acoplamiento de los aminoácidos: Fmoc-AA-OH (0,17 mmol, 3 eq.), HATU (66,2 mg, 0,17 mmol, 3 eq.), DIEA (59,2 μl, 0,35 mmol, 6 eq.).

Reactivos para el acoplamiento del ácido cloroacético: ácido cloroacético (65,8 mg, 0,70, 3 eq.), HATU (264,7 mg, 0,70 mmol, 3 eq.), DIEA (236,7 mg, 1,39 mmol, 6 eq.).

El desanclaje del péptido se realizó tratando a la peptidil-resina con el método descrito en el apartado 3.6.1, utilizando la mezcla acidolítica TFA:H₂O:TIS (95:2,5:2,5) (14,25 ml TFA, 0,375 ml H₂O, 0,375 ml TIS).

Rendimiento del desanclaje: 78 % (29,8 mg de crudo peptídico).

Condiciones de purificación: gradiente isocrático de 3 min a 90% A seguido de gradiente lineal de 90% A a 20% A en 20 min, flujo 3,5 ml/min, detección por UV a 220 nm.

Pureza: > 95%

Rendimiento de purificación: 27% (8,1 mg de péptido purificado).

Rendimiento de síntesis: 21%

RP-HPLC: $t_R = 8,42$ min (gradiente lineal 95% A a 5% A en 20 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 220 nm).

MALDI-TOF: 779,3 m/z ([M+H]⁺ experimental); 779,5 m/z ([M+H]⁺ calculada).

5.14.2. Reacción de tioeterificación

Condiciones de la reacción de tioeterificación: CP3 (720 μg, 0,62 μmol, 8 eq.), núcleo de lisinas tetracloroacetilado (0,4 mg, 0,5 μmol), Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, N₂, T ambiente.

Condiciones de purificación: gradiente isocrático de 2 minutos a 90% A seguido de gradiente lineal de 90% A a 50% A en 25 min, flujo 3,5 ml/min, detección por UV a 220 nm.

Pureza: ~75%

Rendimiento de reacción: 8% (0,211 mg de péptido purificado).

Rendimiento de síntesis: 0,2%

RP-HPLC: $t_R = 19,6$ min (gradiente lineal 90% A a 50% A en 27 min; flujo 1 ml/min; detección por UV a 280 nm).

MALDI-TOF: 5276,9 m/z ([M+H]⁺ experimental); 5275,4 m/z ([M+H]⁺ calculada).

6. ENSAYO ANTIGÉNICO POR MICROARRAYS

El protocolo seguido en la realización de los ensayos con microarrays fue muy similar, una adaptación, al procedimiento de la técnica de ELISA, descrita en el apartado anterior. Las principales diferencias fueron la incubación de los péptidos sobre el soporte sólido (impresión de péptido) y la detección de la unión antígeno-anticuerpo (anticuerpo secundario marcado con fluoróforo).

6.1. DISOLUCIONES TAMPONADAS

- a) Tampón de unión: 10% DMSO en PBS.
- b) Tampón de bloqueo: tampón PBS con 0,005% Tween 20 y 5% de BSA.
- c) Tampón de lavado: PBS-T. Tampón fosfato salino (PBS) con 0,05% de Tween 20.
- d) Tampón de disolución de los sueros y la anti-IgG: Tampón de bloqueo PBS-T con 5% de BSA.

6.2. PÉPTIDOS

Se estudiaron 124 péptidos formados por 18 aminoácidos solapados en 15 residuos de la proteína de envoltura E2 del GBV-C²⁵², previamente sintetizados en el grupo de laboratorio. La secuencia primaria de los péptidos se muestra en el apartado 1.3 de Resultados y discusión.

6.3. SUEROS

Los péptidos se estudiaron con tres paneles de sueros. El primer panel estaba formado por 76 sueros de pacientes infectados por VIH-1 procedentes de la Escuela de Medicina de Hannover (Alemania), de los que se conocía la presencia (VIH E2+) o no de anticuerpos anti-E2 (VIH E2-), determinada mediante el test de Abbott (descatalogado actualmente); un segundo panel de 60 sueros de pacientes infectados por VIH-1 procedentes del Hospital de Bellvitge, de los que no se tenía información segura de su infección por GBV-C; y un tercer panel de 38 sueros de donantes voluntarios sanos (BS), que se utilizaron como controles negativos.

6.4. PROTOCOLO DE MICROARRAYS

6.4.1. Unión de los péptidos a los soportes sólidos

Los péptidos se disolvieron en tampón PBS con 10% de DMSO en una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se transfirieron a una placa de poliestireno de 384 pocillos (ArrayIt) para después imprimirlos en portaobjetos de unión adsorbente de tipo UltraGAPS (Corning) con un impresor de proteínas ArrayIt. Cada cuatro péptidos se imprimió tampón de bloqueo como control del proceso de impresión. Se hicieron tres réplicas de cada una de las soluciones.

Durante el proceso de impresión de los péptidos se hicieron ciclos de lavado del *pin*, tanto antes de comenzar, como entre las muestras y al finalizar el proceso (tabla 17).

Los microarrays impresos se guardaron a 4°C durante 15-20 horas en condiciones desecantes. Transcurrido este tiempo, se colocó una gradilla de silicona en cada portaobjetos para dividirlos en 14 pocillos y se realizó un lavado con PBS-T.

Tabla 17. Ciclos de lavado del *pin* durante la impresión de los péptidos.

Lavados	Ciclos	t (Sonicación)/s	t (secado)/s
Inicial y entre muestras	7	1	0,5
	1	9	15
Final	9	1	0,5
	1	9	15

6.4.2. Bloqueo de los lugares no saturados

Se bloquearon las zonas del soporte sólido en las que no se habían imprimido los péptidos con el fin de evitar que moléculas no específicas se unan a dicho soporte. Así, se añadieron 200 μl de tampón de bloqueo en cada pocillo del microarray y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se vaciaron los pocillos.

6.4.3. Reacción con las muestras de sueros

Se prepararon diluciones 1/200 de las muestras de sueros en tampón de bloqueo (5% de BSA en PBS-T) y se añadieron 100 µl a cada pocillo. Se incubaron los microarrays durante 15 horas a 4°C dentro de una cámara húmeda. Pasado este tiempo, se vaciaron los pocillos.

6.4.4. Lavados tras la incubación de las muestras de sueros

Después de la incubación de los sueros, se realizó un proceso de lavado con el tampón PBS-T (6 x 2 min, 200 µl/pocillo) con agitación.

6.4.5. Reacción con el conjugado enzimático

En los ensayos realizados se utilizó como anticuerpo secundario una anti-inmunoglobulina G (anti-IgG) humana de mono conjugada con el fluoróforo Dylight 649, específica de los fragmentos Fcγ.

Así, se diluyó la anti-IgG en una relación 1:1.000 en tampón de bloqueo y se añadieron 100 µl en cada pocillo. Se incubaron los microarrays durante una hora y media a temperatura ambiente en una cámara oscura.

6.4.6. Lavados tras la incubación con el conjugado enzimático

Tras la incubación con el conjugado enzimático, se realizó el proceso de lavado con el tampón PBS-T (6 x 2 min, 200 µl/pocillo) con agitación con el fin de detener la reacción y de eliminar el exceso de anticuerpo secundario. Posteriormente, se quitó la gradilla de silicona que dividía cada *slide* y se realizaron dos lavados más con PBS-T, de 10 minutos cada uno, con agitación. Por último, se lavaron con H₂O-milli Q y se secaron en la centrífuga a 1.000 rpm durante 5 minutos.

6.4.7. Medida de la fluorescencia

Se midió la fluorescencia a 635 nm en el escáner de microarrays GenePix 4000B. Mediante el software GenePix Pro 6.1.0.4, se determinó la mediana de las intensidades de cada *spot* a la que se restó el fondo local o *background*.

6.5. CONTROL DE LOS ENSAYOS

En cada experimento de microarrays, todas las medidas se realizaron por triplicado. Además, se incluyeron pocillos control con el fin de asegurar la validez de los ensayos. Los controles incluían:

- a) todos los reactivos excepto el suero (control negativo),
- b) dos péptidos irrelevantes en cada pocillo, cuya estructura primaria era conocida y no pertenecía a ninguna proteína del GBV-C, y por tanto no debían ser reconocidos por los anticuerpos del suero (control negativo).
- c) un péptido previamente estudiado con un suero con reactividad positiva (control positivo).

6.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Con el fin de conocer la especificidad de los péptidos, se compararon sus reactividades con los sueros, diferenciando entre sueros que contenían anticuerpos anti-E2 de la proteína E2 del GBV-C (VIH E2+), determinado mediante el test de Abbott; sueros en los que no se encontró la presencia de estos anticuerpos (VIH E2-, test de Abbott) y sueros procedentes de donantes voluntarios sanos.

6.6.1. Barrido de la proteína E2 del GBV-C. Primera selección de péptidos

En primer lugar se realizó un *screening* de los 124 péptidos con 8 sueros del panel VIH E2+, 8 sueros del panel VIH E2- y 4 sueros del panel procedente de donantes de sangre. Se compararon los valores de fluorescencia obtenidos mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney empleando el software GraphPad Prism 5.01. Se consideraron estadísticamente

significativos los valores de probabilidad menores de 0,05. Se seleccionaron 38 de los 124 péptidos.

6.6.2. Comparación de paneles de sueros. Segunda selección de péptidos

Se repitió el experimento de microarrays con los 38 péptidos seleccionados más los 2 péptidos control negativo y con la totalidad de los sueros de los paneles anteriormente mencionados. Se estudió su comportamiento y se llevó a cabo en estudio de fiabilidad de los ensayos. El análisis estadístico de los resultados de fluorescencia obtenidos se realizó con el software Stata 12.1¹⁵⁰.

Para ello, se crearon dos bases de datos y se trabajó con los valores triplicados medidos en cada péptido:

- Base de datos con el panel de sueros de donantes voluntarios, formada por un total de 38 sueros procedentes de personas sanas.
- Base de datos con el panel de sueros de pacientes infectados por VIH (E2+ y E2-), constituida por 38 sueros VIH E2+ y 38 sueros VIH E2-.

Tras representar los resultados de fluorescencia obtenidos para cada péptido, se realizó el estudio de fiabilidad del ensayo.

6.6.2.1. Estudio de fiabilidad del ensayo de microarrays

Siguiendo el procedimiento experimental anteriormente indicado, se repitió el ensayo con 16 sueros del grupo VIH E2+ y 16 sueros del grupo VIH E2-, seleccionados al azar por muestreo aleatorio simple. A esta selección, se añadieron otros 4 sueros del primer grupo y otros 2 del segundo, ya que sus mediciones (triplicados) en el ensayo anterior presentaban gran variabilidad. En esta tesis, se estudió la repetibilidad de los ensayos para evaluar la fiabilidad²³⁵ de los mismos. Para ello se utilizó el Coeficiente de Correlación Intraclase (CCI)^{235, 236}, calculado a partir de un Modelo de Análisis de la Varianza (ANOVA) de 1 Factor²³⁷. Este coeficiente se calculó de manera independiente para el primer y segundo triplicado, así como para el conjunto de las dos medias. Los resultados se completaron con un Modelo de Análisis de Varianza con anidamiento²⁴¹, que considera que las 6 medidas de cada suero en realidad pertenecen a dos triplicados distintos. El nivel de significación fue $\alpha = 0,05$.

6.6.2.2. Análisis estadístico de la comparación de los paneles de sueros

El análisis estadístico de la comparación de los paneles de sueros se llevó a cabo calculando la mediana de fluorescencia de cada suero para cada péptido. Así, en los 38 sueros de donantes voluntarios, se calculó la mediana de las 3 mediciones; en los 38 sueros del grupo de VIH E2- y en los 38 sueros del grupo VIH E2+, se calculó la mediana de la fluorescencia bien de las 6 medidas (incluyendo las 3 mediciones adicionales del estudio de fiabilidad) o bien de las 3 medidas (para los sueros no escogidos en el estudio de fiabilidad).

Los datos de fluorescencia se compararon mediante pruebas estadísticas no paramétricas, empleando el Test de Suma de Rangos de Wilcoxon^{242, 243}. El nivel de significación o error de tipo I se fijó en $\alpha = 0,05$.

Se llevaron a cabo un total de 80 contrastes en la comparación de los distintos paneles de sueros y se corrigió el nivel de significación seleccionando los 40 p-valores (38 péptidos más 2 péptidos control) de los contrastes de hipótesis al comparar los 2 grupos de sueros (VIH E2+ y VIH E2-). Éstos se ordenaron de menor a mayor y se aplicó el procedimiento para múltiples contrastes denominado *False Discovery Rate* (FDR)^{244, 245}, seleccionando como valor $q^* = \alpha = 0,05$; y escogiendo como método para el cálculo de la secuencia de los p-valores críticos individuales (para cada comparación) el método propuesto por Simes^{244, 246, 247}.

Además de estas comparaciones estadísticas, se estableció que la mediana de la intensidad de fluorescencia en el grupo de sueros de VIH E2+ debía ser, como mínimo, de 1.000 unidades; estudiando cada caso concreto.

Finalmente, se seleccionaron 17 de los 38 péptidos iniciales.

6.6.3. Capacidad diagnóstica de los péptidos seleccionados. Tercera selección

Se representaron las curvas ROC para cada péptido empleando como controles positivos los 38 sueros del panel de pacientes infectados por el VIH que contenían anticuerpos anti-E2 del GBV-C (VIH E2+), y como controles negativos los 38 sueros procedentes de donantes voluntarios. Se calculó el área bajo la curva ROC y se escogió el punto de corte para un valor de especificidad del 94,74%. Se calculó también el porcentaje de sueros correctamente clasificados por cada péptido.

Finalmente, se llevó a cabo una tercera selección de péptidos teniendo en cuenta aquéllos en los que la sensibilidad era mayor o igual al 75% para la especificidad seleccionada (94,74%) y el porcentaje de sueros correctamente clasificados mayor o igual al 85%. De esta manera, se seleccionaron 11 de los 17 péptidos.

6.6.4. Reactividad de los péptidos para el diagnóstico en la infección por el GBV-C en pacientes infectados por VIH-1

Siguiendo el procedimiento experimental anteriormente explicado, se repitió el ensayo de microarrays con los 11 péptidos seleccionados y el panel de 60 sueros de pacientes infectados por VIH, de los que no se tenía información de su infección por el GBV- C. Posteriormente, se estudió la antigenicidad de estos péptidos en dicho panel.

Se representaron los valores de fluorescencia obtenidos y se comparó la reactividad de los péptidos teniendo en cuenta los puntos de corte hallados a partir de las curvas ROC para una especificidad del 94,74%. Así, cada uno de los 60 sueros se consideró menor, igual o superior al punto de corte en cada péptido. Se definió entonces un patrón en cada suero y se elaboró un listado de patrones.

Finalmente, se establecieron dos condiciones para clasificar los 60 sueros estudiados como sueros positivos (coinfección VIH/GBV-C) o negativos (no coinfección VIH/GBV-C). En primer lugar, se consideró que aquellos sueros cuya fluorescencia se encontraba por encima del *cut-off* de 6 o más péptidos tenían una alta probabilidad de proceder de pacientes coinfectados por VIH/GBV-C; y en segundo lugar, se estableció que, en estos 6 o más péptidos, debía haber un epítipo de cada una de las tres zonas inicialmente identificadas (zona I, zona II y zona III).

7. ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO: ELISA

7.1. DISOLUCIONES TAMPONADAS

- a) Tampón de unión a las microplacas DNA-Bind™ : tampón 0,05 M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, pH 9,6.
- b) Tampón de unión a las microplacas Nunc Immobilizer™ Amino: tampón 0,1 M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, pH 9,6.
- c) Tampón de bloqueo en las microplacas DNA-Bind™: tampón 0,05 M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, pH 9,6 con 2% albúmina sérica bovina (BSA).
- d) Tampón de bloqueo en las Nunc Immobilizer™ Amino: tampón 0,1 M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, pH 9,6 con 2% albúmina sérica bovina (BSA).
- e) Tampón de lavado: PBS-T. Tampón fosfato salino (PBS) con 0,05% de Tween 20. Se utilizó una disolución 0,1 M de PBS, pH 7,5, compuesto por 8g de NaCl, 1,14 g Na_2HPO_4 , 0,2 g KH_2PO_4 y 0,2 g KCl, disueltas en 1 litro H_2O Milli-Q.
- f) Tampón de dilución de los sueros y la anti-IgG: Tampón RIA. Tampón formado por 0,35 M NaCl, 0,01 M tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), 1% BSA, 0,5% [vol/vol] deoxicolato de sodio, 0,1% dodecilsulfato sódico (SDS) 1% [vol/vol] Tritón X-100 en H_2O Milli-Q. El tampón se suplementó con 10% de suero fetal bovino (FBS).
- g) Tampón de dilución del sustrato enzimático: tampón 0,1 M Na_2HPO_4 /ácido cítrico monohidratado, pH 5,0.
- h) Disolución de cromógeno y sustrato: tampón 0,1 M Na_2HPO_4 /ácido cítrico monohidratado, pH 5,0 con 4% del cromógeno dihidrocloruro de orto-fenilendiamina (OPD) y 8 μl /10 ml de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30%.
Esta disolución se prepara en el momento de ser utilizada y debe preservarse de la luz.
- i) Solución de H_2SO_4 2 N.

7.2. SUEROS

El estudio de la capacidad diagnóstica de los MAPs tetraméricos heterogéneos $\text{MAP}_4[\text{E}2(7-26),\text{NS}4\text{a}(27-43)]$ y el $\text{MAP}_4[\text{E}2(99-118),\text{NS}5\text{a}(112-126)]^{32}$, previamente sintetizado en nuestro

grupo, se realizó con tres paneles de sueros procedentes del Servicio de Inmunología del Hospital Clínic de Barcelona. El primer y el segundo grupo consistían en 95 sueros de pacientes sometidos a tratamientos de hemodiálisis y 65 sueros de pacientes diagnosticados de hepatitis crónica, respectivamente. El tercer grupo consistía en 50 muestras de sueros de donantes voluntarios sanos que se utilizaron como controles negativos.

Previamente, se había determinado la presencia de anticuerpos anti-GBV-C de la proteína E2 en 35 muestras de los sueros procedentes de hemodializados y 36 procedentes del panel de hepatitis crónica. Este ensayo se realizó con el test comercial anti-HGV_{env} de los laboratorios Roche Diagnostics GmbH, basado en la proteína de envoltura E2 recombinante, pero que, actualmente, no está disponible en el mercado.

La capacidad diagnóstica del péptido LP1_{E2} se evaluó con dos paneles de sueros. Un panel de 95 sueros de pacientes infectados por el VIH-1 procedentes de la Escuela de Medicina de Hannover (Alemania), de los que se conocía la presencia o ausencia de anticuerpos anti-E2 del GBV-C (VIH E2+/E2-), determinada por el test de Abbott. El segundo panel ensayado estaba formado por 97 sueros de personas voluntarias sanas, procedente del Hospital Clínic de Barcelona (control negativo).

En el estudio comparativo de la reactividad de las distintas formas de presentación del dominio E2(7-26), se utilizaron dos paneles de sueros. El primero contenía 45 sueros de pacientes infectados por el VIH-1 procedente del Hospital de Bellvitge de Barcelona; y el segundo, 45 sueros de donantes voluntarios sanos, procedentes del Hospital Clínic de Barcelona (control negativo).

La utilización de los sueros en estos estudios de investigación ha sido aprobada por los Comités de Ética de los respectivos hospitales.

7.3. PROTOCOLO DE ELISA

7.3.1. Unión de los péptidos a las microplacas

Los péptidos se unieron mediante los grupos amino-primarios o mediante adsorción a la superficie de Microplacas DNA-Bind™ (Costar), preactivadas como ésteres de N-oxisuccinimida. En el caso de los péptidos cíclicos, que no contenían grupos amino libres,

también se utilizaron placas Nunc Immobilizer™ Amino, en las cuales los péptidos se unieron por su grupo tiol libre. A partir de una disolución del péptido de 1 mg/ml en 10% de DMSO en H₂O MilliQ se preparó una disolución de 10 µg/ml en el tampón de unión. Se añadieron 100 µl de la disolución del péptido en cada pocillo y en los pocillos control que no contenían péptido se añadieron 100 µl de tampón de bloqueo. Las microplacas se incubaron tapadas toda la noche (aproximadamente 16 horas) a 4°C. Transcurrido este tiempo, se vaciaron los pocillos antes de llevar a cabo el bloqueo.

7.3.2. Bloqueo de la placa

Se bloquearon los puntos en los que no había reaccionado el péptido, con el fin de evitar la unión inespecífica de moléculas a la superficie. Así, se añadieron 300 µl de tampón de bloqueo a cada pocillo de la microplacas y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda. Pasado este tiempo se vaciaron los pocillos.

7.3.3. Reacción con muestras de sueros

Se prepararon diluciones 1:50 de las muestras de sueros en tampón RIA suplementado con 10% suero fetal bovino y se añadieron 100 µl a cada pocillo. Se incubaron las microplacas durante una hora y media a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda.

7.3.4. Lavados tras la incubación de las muestras de sueros

Después de la etapa de reacción con sueros, se realizó un proceso de lavado con tampón PBS-T (300 µl/ pocillo) con el fin de eliminar los reactivos en exceso. Este proceso se repitió 6 veces.

7.3.5. Reacción con el conjugado enzimático

En los ensayos realizados se utilizó como anticuerpo de detección una anti-inmunoglobulina G (anti-IgG) humana de conejo conjugada a la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP). Este conjugado enzimático está indicado para la determinación de anticuerpos humanos del tipo IgG humana, y su parte enzimática facilita la visualización de la reacción que ha tenido lugar en la fase sólida.

Así, se diluyó la anti-IgG en una relación 1:1.000 en tampón RIA y se añadieron 100 µl a cada pocillo. Se incubaron las microplacas durante una hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

7.3.6. Lavados tras la incubación con el conjugado enzimático

Después de la etapa de reacción con el conjugado enzimático, se realizó un proceso de lavado con el tampón PBS-T (6 x 300 µl/ pocillo) con el fin de eliminar los reactivos en exceso.

7.3.7. Adición del sustrato enzimático

Con el fin de visualizar la reacción antígeno-anticuerpo, se añadió un cromógeno, el dihidrocloruro de orto-fenilendiamina (OPD). Éste se oxida gracias a la reducción del peróxido de hidrógeno catalizada por la enzima peroxidasa de rábano. La reacción enzimática se detuvo con H₂SO₄ 2N. Esta reacción da lugar a un cromóforo, cuya densidad óptica se midió en un espectrofotómetro de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices).

Así, se añadieron 100 µl de la disolución del cromógeno en cada pocillo. Se incubaron las microplacas durante 30 minutos en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, se detuvo la reacción enzimática añadiendo 50 µl de H₂SO₄ 2 N a cada pocillo. Finalmente, se midió la absorbancia de las microplacas a 492 nm en el espectrofotómetro SpectraMax M5.

7.4. DISEÑO DE LA MICROPLACA

En cada experimento de ELISA, todas las medidas se realizaron por duplicado. Además, se incluyeron pocillos control con el fin de asegurar la validez de los ensayos. Los controles correspondía con:

- a) pocillo que incluye todos los reactivos excepto el péptido y el suero (control negativo),
- b) pocillo que incluye todos los reactivos excepto el péptido (control negativo),
- c) pocillo que incluye todos los reactivos excepto el suero (control negativo),

En la tabla 18 se muestra el diseño de una placa a modo de ejemplo. En amarillo se representan los controles negativos del ensayo, en azul los sueros incubados con el péptido LP2_{E2}, en rosa los sueros ensayados con el péptido CP2 y en morado con el péptido MAP_{LP2}.

Tabla 18. Diseño de un placa de ELISA. S1-S41, sueros de pacientes infectados por VIH-1 positivos con el péptido LP1_{E2}. BS101-BS102, sueros procedentes de donantes voluntarios sanos. Controles negativos: 00, todos los reactivos excepto el péptido y el suero; 01, todos los reactivos excepto el péptido; 10, todos los reactivos excepto el suero.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	00	00	01	01	10	10	BS101	BS101	BS101	BS101	BS101	BS101
B	S1	S1	S1	S1	S1	S1	BS102	BS102	BS102	BS102	BS102	BS102
C	S12	S12	S12	S12	S12	S12	BS103	BS103	BS103	BS103	BS103	BS103
D	S16	S16	S16	S16	S16	S16	BS104	BS104	BS104	BS104	BS104	BS104
E	S30	S30	S30	S30	S30	S30	BS105	BS105	BS105	BS105	BS105	BS105
F	S39	S39	S39	S39	S39	S39	BS106	BS106	BS106	BS106	BS106	BS106
G	S40	S40	S40	S40	S40	S40	BS107	BS107	BS107	BS107	BS107	BS107
H	S41	S41	S41	S41	S41	S41	BS108	BS108	BS108	BS108	BS108	BS108

7.5. ESTIMACIÓN DEL PUNTO DE CORTE.

El valor del punto de corte (*cut-off*, CO) para cada péptido permitió diferenciar entre sueros positivos y negativos, y se calculó de dos maneras diferentes. Cuando los péptidos se ensayaron con sueros caracterizados en cuanto a la presencia o ausencia de anticuerpos anti-E2 del GBV-C, el *cut-off* se determinó a partir de la representación de las curvas ROC para un determinado porcentaje de especificidad. Debido al escaso volumen de muestra de estos sueros caracterizados, no se realizó el ensayo de ELISA con todos los péptidos. Así, en estos casos, el *cut-off* se calculó con los valores de absorbancia obtenidos con los sueros procedentes de donantes voluntarios sanos según la ecuación:

$$cut-off = \bar{x} + 2\sigma$$

Donde \bar{x} corresponde con la media de los resultados de densidad óptica obtenidos con los sueros procedentes de donantes voluntarios sanos, y σ con la desviación estándar de los mismos.

La comparación de los resultados obtenidos con los distintos péptidos se realiza representando el valor del cociente de la absorbancia de cada suero entre el valor del punto de corte de cada péptido. Se consideraron sueros positivos cuando dicho cociente era mayor o igual que uno.

7.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Se empleó el software GraphPad Prism 5.01¹⁴⁹ tanto para la elaboración de curvas de rendimiento diagnóstico (ROC) y el área bajo la curva (AUC), como para la comparación con el test no paramétrico de Mann-Whitney¹⁴⁵ de las reactividades de cada construcción peptídica con los diferentes paneles de sueros. Se consideraron estadísticamente significativos valores de probabilidad menores a 0,05.

La comparación de las curvas ROC se realizó empleando el software MedCalc v 8.0²⁵³. Esta comparación permitió conocer cuál de los péptidos estudiados era el más exacto para el diagnóstico de la infección del virus GBV-C. Cuanto mayor es el área bajo la curva, mayor es la utilidad diagnóstica del péptido. Además, es conveniente que existan diferencias estadísticamente significativas entre las áreas. Así, en una prueba diagnóstica perfecta cabría esperar un área bajo la curva de 1, mientras que si el péptido es completamente indiscriminatorio, la curva coincidirá con una línea recta de pendiente 1. Las pruebas muy exactas tiene valores de área mayores que 0,9 y las moderadamente exactas valores de área entre 0,7-0,9.

8. ESTUDIO DE TOXICIDAD Y FUSIÓN CELULAR

8.1. LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares empleadas fueron: la línea celular Hela-env, donada por el Dr. Blanco de la Fundació IRSI Caixa, que expresan la proteína de la envoltura del VIH-1 e integran en su genoma el promotor LTR (*Long Terminal Repeats*), implicado en la replicación viral; y la línea celular TZM-bl (AIDS reagents Cat. No. 8129), que expresa el receptor de membrana de los linfocitos CD4 y los correceptores CCR5 y CXCR4 e integra en su genoma los genes de las enzimas luciferasa y β -galactosidasa, que se sobreexpresan al producirse la fusión celular entre ambas líneas celulares.

8.2. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES

El cultivo de las líneas celulares empleadas se realizó en medio *Dulbecco's Modified Eagles's Medium* (DMEM) suplementado con un 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina-estreptomicina a 37°C y 5% de CO₂.

8.3. ENSAYO DE TOXICIDAD

El ensayo de toxicidad se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de fondo transparente (Cultek Cat. No. 15-3596) con la línea celular Hela-env (2.500 células/pocillo). Los péptidos se incubaron con estas células durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Como control positivo de viabilidad celular se reservaron pocillos sin péptidos, sólo con células.

Transcurrido el tiempo de incubación, se aspiró el medio y se adicionó la disolución de MTT (100 μ l/pocillo). Ésta se preparó a partir de 200 μ l de una disolución inicial de 5 mg/ml de MTT en PBS disueltos en 1 ml de medio celular.

Tras 3 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂, se aspiró el medio, se añadieron 100 μ l de DMSO por pocillo y se dejó reaccionando durante 2 horas en ausencia de luz a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se midió la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro Spectramax M5.

8.4. ESTUDIO DE FUSIÓN CELULAR

El ensayo de fusión celular consistió en el estudio de inhibición de la formación de sincitios.

Al igual que en el estudio de la toxicidad de los péptidos, el experimento se realizó en placas de 96 pocillos de fondo transparente (Cultek Cat. No. 15-3596) con la línea celular Hela-env (2.500 células/pocillo), donde se incubaron los péptidos a ensayar a concentraciones crecientes hasta 200 μM . Como control positivo de la fusión celular se empleó el péptido comercial C-34, inhibidor de la fusión del VIH, en una concentración 0,24 μM .

Los péptidos y el control positivo se incubaron durante 1 hora a 37°C y 5% de CO_2 , y a continuación, se añadieron 100 μl /pocillo de una solución de las células TZM-bl (25.000 células/pocillo).

Tras 24 horas de incubación a 37°C y 5% de CO_2 , se observó la placa al microscopio para valorar cualitativamente si los péptidos ensayados tenían o no la capacidad de inhibir la formación de sincitios. Posteriormente, se adicionaron a cada pocillo 5 μl de una solución de 20% de Igepal en 100 mM de PBS, pH 7,2, que actúa como surfactante, y 0,1 mM de MgCl_2 . Se dejó reaccionar durante 1-2 minutos y se agitaron vigorosamente los pocillos con la pipeta. Seguidamente, se añadieron 50 μl de una solución 1 mM de 4-metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido en 100 mM de PBS a pH 7,2 y 0,1 mM de MgCl_2 . La placa se incubó durante 30 minutos a 37°C. La reacción enzimática se detuvo con 150 μl de tampón glicina-NaOH, 100 mM a pH 10,6.

Finalmente, se determinó la cantidad de 4-metilumbeliferón formado midiendo la fluorescencia a las longitudes de onda de excitación y emisión de 355 nm y 460 nm, respectivamente, en el espectrofotómetro SpectraMax M5 (Molecular Devices).

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Simons, J.N. et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med* **1**, 564-569 (1995).
2. Linnen, J. et al. Molecular Cloning and Disease Association of Hepatitis G Virus: A Transfusion-Transmissible Agent. *Science* **271**, 505-508 (1996).
3. Theodore, D. & Lemon, S.M. GB virus C, hepatitis G virus, or human orphan flavivirus? *Hepatology* **25**, 1285-1286 (1997).
4. Stapleton, J.T. GB Virus Type C/Hepatitis G Virus. *Semin Liver Dis* **23**, 137,148 (2003).
5. D. Theodore, S.M.L. GB virus C, hepatitis G virus, or human orphan flavivirus? *Hepatology* **25**, 1285-1286 (1997).
6. Baggio-Zappia, G.L. & Granato, C.F.H. HIV-GB virus C co-infection: an overview. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **47**, 12-19 (2009).
7. Saitoh, H. et al. The clinical significance of GBV-C/HGV exposure in C-viral chronic liver disease and blood donors. *Hepatology research* **22**, 288-296 (2002).
8. Busch, M.P., Kleinman, S.H. & Nemo, G.J. Current and emerging infectious risks of blood transfusions. *Jama-Journal of the American Medical Association* **289**, 959-962 (2003).
9. Frey, S.E. et al. Evidence for probable sexual transmission of the hepatitis G virus. *Clinical Infectious Diseases* **34**, 1033-1038 (2002).
10. Lefrere, J.J. et al. High rate of GB virus type C/HGV transmission from mother to infant: possible implications for the prevalence of infection in blood donors. *Transfusion* **40**, 602-607 (2000).

11. Akcali, S., Sanlidag, T. & Ozbakkaloglu, B. Prevalence of GBV-C/hepatitis G virus viremia among chronic hepatitis B, chronic hepatitis C and hemodialysis patients in Turkey. *Ann. Saudi Med.* **26**, 68-69 (2006).
12. Hosseini-Moghaddam, S.M. et al. GB virus type C infection in hemodialysis patients considering co-infection with hepatitis C virus. *Journal of Medical Virology* **80**, 1260-1263 (2008).
13. Alcalde, R. et al. Prevalence and distribution of the GBV-C/HGV among HIV-1-infected patients under anti-retroviral therapy. *Virus Research* **151**, 148-152 (2010).
14. Nunnari, G. et al. Slower Progression of HIV-1 Infection in Persons with GB Virus C Co-Infection Correlates with an Intact T-Helper 1 Cytokine Profile. *Annals of Internal Medicine* **139**, 26-30 (2003).
15. Polgreen, P.M., Xiang, J., Chang, Q. & Stapleton, J.T. GB virus type C/hepatitis G virus: a non-pathogenic flavivirus associated with prolonged survival in HIV-infected individuals. *Microbes and Infection* **5**, 1255-1261 (2003).
16. Stapleton, J.T., Williams, C.F. & Xiang, J. GB Virus Type C: a Beneficial Infection? *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3915-3919 (2004).
17. Infante, D. et al. Prevalence of Hepatitis G Virus in Healthy Children in Liver Disease, and Human Immunodeficiency Virus-1 Infection: Response to Interferon. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **30**, 385-390 (2000).
18. Puig-Basagoiti F, C.M., Guilera M, Giménez-Barcons M, Sirera G, & Tural C, e.a. Prevalence and route of transmission of infection with a novel DNA virus (ITV), hepatitis C virus and HGV in patients infected with HIV. *J Acquired Immune Defic Syndr* **23**, 89-94 (2000).
19. Feucht, H.H. et al. Prevalence of hepatitis G viremia among healthy subjects, individuals with liver disease, and persons at risk for parenteral transmission. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 767-768 (1997).

20. Devereux, H. et al. Influence of HIV-1 infection on GBV-C infection in multiply infected haemophilic patients. *Journal of Medical Virology* **56**, 316-320 (1998).
21. Berzsenyi, M.D., Bowden, D.S., Roberts, S.K. & Revill, P.A. GB virus C genotype 2 predominance in a hepatitis C virus/HIV infected population associated with reduced liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **24**, 1407-1410 (2009).
22. Boodram, B., Hershov, R.C., Klinzman, D. & Stapleton, J.T. GB virus C infection among young, HIV-negative injection drug users with and without hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatitis* **18**, e153-e159 (2010).
23. George, S., Varmaz, D., Stapleton, J.T., Varmaz, D. & Stapleton, J. GB virus C replicates in primary T and B lymphocytes. *The Journal of infectious diseases* **193**, 451-454 (2006).
24. Künkel, U. et al. Quality control study on the performance of GB virus C/hepatitis G virus PCR. *Journal of Hepatology* **28**, 978-984 (1998).
25. Tacke, M., Kiyosawa, K., Stark, K., Schlueter, V. & OfenlochHaehnle, B. Detection of antibodies to a putative hepatitis G virus envelope protein. *Lancet* **349**, 318-320 (1997).
26. Toniutto, P. et al. Immunoreactivity to putative B-cell epitopes of hepatitis G virus polyprotein in viremic and nonviremic subjects. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**, 573-576 (1999).
27. Tacke, M., Schmolke, S., Schlueter, V., Sauleda, S. & Esteban, J.I. Humoral immune response to the E2 protein of hepatitis G virus is associated with long-term recovery from infection and reveals a high frequency of hepatitis G virus exposure among healthy blood donors. *Hepatology* **26**, 1626-1633 (1997).
28. Williams, C.F. et al. Persistent GB virus C infection and survival in HIV-infected men. *New England Journal of Medicine* **350**, 981-990 (2004).
29. Berzsenyi, M.D. & Roberts, S.K. What Is the Role of GB Virus C Infection in Hepatitis C Virus/HIV Coinfection? *Journal of Infectious Diseases* **194**, 407-409 (2006).

30. Gómara, M.J. et al. Use of linear and multiple antigenic peptides in the immunodiagnosis of acute hepatitis A virus infection. *Journal of Immunological Methods* **234**, 23-34 (2000).
31. Saravanan, P., Shrivastava, S. & Kumar, S. Synthesis of Highly Immunogenic Multiple Antigenic Peptides for Epitopes of Viral Antigen to Use in ELISA. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **15**, 313-321 (2009).
32. Pérez, T., Ercilla, G., Chan, W.C. & Haro, I. Antigenicity of chimeric and cyclic synthetic peptides based on nonstructural proteins of GBV-C/HGV. *Journal of Peptide Science* **12**, 267-278 (2006).
33. Fernandez-Vidal, M., Cubero, M.D., Ercilla, G., Gomara, M.J. & Haro, I. Application of a chimeric synthetic peptide in the development of a serologic method for the diagnosis of hepatitis G virus infection. *Protein Pept. Lett.* **14**, 865-870 (2007).
34. Rojo, N., Ercilla, G. & Haro, I. GB virus C (GBV-C) hepatitis G virus (HGV): Towards the design of synthetic peptides-based biosensors for immunodiagnosis of GBV-C/HGV infection. *Current Protein & Peptide Science* **4**, 291-298 (2003).
35. Mellors, J.W. et al. Prognosis in HIV-1 Infection Predicted by the Quantity of Virus in Plasma. *Science* **272**, 1167-1170 (1996).
36. Gao, F. et al. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in West Africa. *Nature* **358**, 495-499 (1992).
37. Boyer, P.L., Sarafianos, S.G., Clark, P.K., Arnold, E. & Hughes, S.H. Why Do HIV-1 and HIV-2 Use Different Pathways to Develop AZT Resistance? *PLoS Pathog* **2**, e10 (2006).
38. Popper, S.J. et al. Lower Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 2 Viral Load Reflects the Difference in Pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. *Journal of Infectious Diseases* **180**, 1116-1121 (1999).

39. Kanki, P.J. et al. Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *The Lancet* **343**, 943-946 (1994).
40. Adjorlolo-Johnson, G. et al. Prospective Comparison of Mother-to-Child Transmission of HIV-1 and HIV-2 in Abidjan, Ivory Coast. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **272**, 462-466 (1994).
41. Jung, S. et al. HIV entry inhibition by the envelope 2 glycoprotein of GB virus C. *AIDS* **21**, 645-647 (2007).
42. Chang, Q., McLinden, J.H., Stapleton, J.T., Sathar, M.A. & Xiang, J. Expression of GB virus C NS5A protein from genotypes 1, 2, 3 and 5 and a 30 aa NS5A fragment inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in a CD4+ T-lymphocyte cell line. *Journal of General Virology* **88**, 3341-3346 (2007).
43. Herrera, E. et al. Effect of Synthetic Peptides Belonging to E2 Envelope Protein of GB Virus C on Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Journal of Medicinal Chemistry* **53**, 6054-6063 (2010).
44. Champagne, K., Shishido, A. & Root, M.J. Interactions of HIV-1 Inhibitory Peptide T20 with the gp41 N-HR Coiled Coil. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 3619-3627 (2009).
45. Münch, J. et al. Discovery and Optimization of a Natural HIV-1 Entry Inhibitor Targeting the gp41 Fusion Peptide. *Cell* **129**, 263-275 (2007).
46. Antonucci, G., Girardi, E., Cozzi Lepri, A., Capobianchi, M.R. & Morsica, G. Response to HAART and GB virus type C coinfection in a cohort of antiretroviral-naïve HIV-infected individuals. *Antiviral therapy* **10**, 109-117 (2005).
47. Alcaro, M.C.l.a.u.d.i.a., Peroni, E., Rovero, P. & Papini, A.M.a.r.i.a. Synthetic Peptides in the Diagnosis of HIV Infection. *Current Protein and Peptide Science* **4**, 285-290 (2003).

48. Zhao, X.H., He, X.W., Li, W.M., Yang, L.S. & Wang, J.H. Development and evaluation of a line immunoassay as a confirmatory test for human immunodeficiency virus (HIV)-1/2 infections. *Afr. J. Biotechnol.* **10**, 8434-8439 (2011).
49. Hernández, P. et al. Highly Effective Serodiagnosis for Chagas' Disease. *Clinical and Vaccine Immunology* **17**, 1598-1604 (2010).
50. Noya, O., Patarroyo, M.E., Guzman, F. & de Noya, B.A.l.a.r.c.o.n. Immunodiagnosis of Parasitic Diseases with Synthetic Peptides. *Current Protein and Peptide Science* **4**, 299-308 (2003).
51. Vordermeier, H.M. et al. Use of Synthetic Peptides Derived from the Antigens ESAT-6 and CFP-10 for Differential Diagnosis of Bovine Tuberculosis in Cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**, 571-578 (2001).
52. Tam, J.P. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**, 5409-5413 (1988).
53. Sadler, K. & Tam, J.P. Peptide dendrimers: applications and synthesis. *Reviews in Molecular Biotechnology* **90**, 195-229 (2002).
54. Niederhafner, P., Sebestik, J. & Jezek, J. Peptide dendrimers. *Journal of Peptide Science* **11**, 757-788 (2005).
55. Pau, C.-P., Luo, W. & McDougal, J.S. Chimeric multiple antigenic peptides for simultaneous detection of specific antibodies to HIV-1 groups M, N, O, and HIV-2. *Journal of Immunological Methods* **318**, 59-64 (2007).
56. Zaccaro, L., Gatto, A.d., Pedone, C. & Saviano, M. Peptides for Tumour Therapy and Diagnosis: Current Status and Future Directions. *Current Medicinal Chemistry* **16**, 780-795 (2009).
57. Heegaard, P.M.H., Boas, U. & Sorensen, N. Dendrimers for Vaccine and Immunostimulatory Uses. A Review. *Bioconjugate Chemistry* **21**, 405-418 (2010).

58. Luganini, A. et al. Peptide-derivatized dendrimers inhibit human cytomegalovirus infection by blocking virus binding to cell surface heparan sulfate. *Antiviral Res.* **85**, 532-540 (2010).
59. Donalisio, M., Rusnati, M., Civra, A., Bugatti, A. & Allemand, D. Identification of a Dendrimeric Heparan Sulfate-Binding Peptide That Inhibits Infectivity of Genital Types of Human Papillomaviruses. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**, 4290-4299 (2010).
60. Welch, B., VanDemark, A., Heroux, A., Hill, C. & Kay, M. Potent D-peptide inhibitors of HIV-1 entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 16828-16833 (2007).
61. Perez, T., Ercilla, G., Chan, W.C. & Haro, I. Antigenicity of chimeric and cyclic synthetic peptides based on nonstructural proteins of GBV-C/HGV. *Journal of Peptide Science* **12**, 267-278 (2006).
62. Larios, C. et al. Characterization of a putative fusogenic sequence in the E2 hepatitis G virus protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **442**, 149-159 (2005).
63. Larios, C., Christiaens, B., Gómara, M.J., Alsina, M.A. & Haro, I. Interaction of synthetic peptides corresponding to hepatitis G virus (HGV/GBV-C) E2 structural protein with phospholipid vesicles. *FEBS Journal* **272**, 2456-2466 (2005).
64. Sánchez-Martín, M.J.s., Haro, I., Alsina, M.A.n., Busquets, M.A. & Pujol, M. A Langmuir Monolayer Study of the Interaction of E1(145–162) Hepatitis G Virus Peptide with Phospholipid Membranes. *The Journal of Physical Chemistry B* **114**, 448-456 (2009).
65. Rojo, N., Gómara, M.J., Haro, I. & Alsina, M.A. Lipophilic derivatization of synthetic peptides belonging to NS3 and E2 proteins of GB virus-C (hepatitis G virus) and its effect on the interaction with model lipid membranes. *The Journal of Peptide Research* **61**, 318-330 (2003).

66. Rojo, N., Gómara, M.a.J., Busquets, M.a.A., Alsina, M.a.A. & Haro, I. Interaction of E2 and NS3 synthetic peptides of GB virus C/hepatitis G virus with model lipid membranes. *Talanta* **60**, 395-404 (2003).
67. Fernández-Vidal, M., Rojo, N., Herrera, E., Gómara, M.J. & Haro, I. Liposome destabilization induced by synthetic lipopeptides corresponding to envelope and non-structural domains of GBV-C/HGV virus. Conformational requirements for leakage. *Biophysical Chemistry* **132**, 55-63 (2008).
68. Herrera, E., Gomara, M.J., Mazzini, S., Ragg, E. & Haro, I. Synthetic Peptides of Hepatitis G Virus (GBV-C/HGV) in the Selection of Putative Peptide Inhibitors of the HIV-1 Fusion Peptide. *Journal of Physical Chemistry B* **113**, 7383-7391 (2009).
69. Sánchez-Martín, M.J. et al. Analysis of HIV-1 fusion peptide inhibition by synthetic peptides from E1 protein of GB virus C. *J. Colloid Interface Sci.* **360**, 124-131 (2011).
70. Sánchez-Martín, M.J. et al. Biophysical Investigations of GBV-C E1 Peptides as Potential Inhibitors of HIV-1 Fusion Peptide. *ChemPhysChem* **12**, 2816-2822 (2011).
71. Haro, I. et al. Study of the inhibition capacity of an 18-mer peptide domain of GBV-C virus on gp41-FP HIV-1 activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1808**, 1567-1573 (2011).
72. Templin, M. et al. Protein Microarray Technology. *Drug Discovery Today* **7**, 815-822 (2002).
73. Yanagida, M. Functional Proteomics; Current achievements. *Journal of Chromatography. B* **771**, 89-106 (2002).
74. Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. & Brown, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470 (1995).
75. Bier, F. et al. DNA microarrays. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **109**, 433-453 (2008).

76. Yoo, S.M., Choi, J.H., Lee, S.Y. & Yoo, N.C. Applications of DNA Microarray in Disease Diagnostics. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **19**, 635-646 (2009).
77. Kononen, J. et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine* **4**, 844-847 (1998).
78. Uetz, P. et al. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**, 623-627 (2000).
79. Ross Macdonald, P. et al. Large-scale analysis of the yeast genome by transposon tagging and gene disruption. *Nature* **402**, 413-418 (1999).
80. Matarraz, S., Gonzalez-Gonzalez, M., Jara, M., Orfao, A. & Fuentes, M. New technologies in cancer. Protein microarrays for biomarker discovery. *Clinical & Translational Oncology* **13**, 156-161 (2011).
81. Chandra, H., Reddy, P.J. & Srivastava, S. Protein microarrays and novel detection platforms. *Expert Review of Proteomics* **8**, 61-79 (2011).
82. Wang, D. et al. Carbohydrate microarrays for the recognition of cross-reactive molecular markers of microbes and host cells. *Nature biotechnology* **20**, 275-281 (2002).
83. Houseman, B., Mrksich, M. & Mrksich, M. Carbohydrate arrays for the evaluation of protein binding and enzymatic modification. *Chemistry & biology* **9**, 443-454 (2002).
84. MacBeath, G., Koehler, A.N. & Schreiber, S.L. Printing small molecules as microarrays and detecting protein-ligand interactions en masse. *Journal of the American Chemical Society* **121**, 7967-7968 (1999).
85. Uttamchandani, M.Y., Shao Q. Peptide Microarrays: Next Generation Biochips for Detection, Diagnostics and High-Throughput Screening. *Current Pharmaceutical Design* **14**, 2428-2438 (2008).
86. Xu, X.J. et al. The development and preliminary application of multiple antigenic peptide microarray platform. *Progress in Biochemistry and Biophysics* **33**, 473-478 (2006).

87. Robinson, W.H. et al. Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nature Medicine* **8**, 295-301 (2002).
88. Reineke, U., Schneider-Mergener, J. & Schutkowski, M. in. (eds. M. Ferrari, M. Ozkan & M.J. Heller) 161-282 (Springer US, 2007).
89. Tapia, V.E.A., B.; Volkmer, R. Exploring and Profiling Proteing Function with Peptide Arrays. *Methods in Molecular Biology* **570**, 3-17 (2009).
90. Geysen, H., Meloen, R. & Barteling, S. Use Of Peptide-Synthesis To Probe Viral-Antigens For Epitopes To A Resolution Of A Single Amino-Acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 3998-4002 (1984).
91. Frank, R., Guler, S., Krause, S. & Lindenmaier, W. in Peptides 1990. (eds. E. Giralt & D. Andreu) 151-152 (Escom Science Publ Bv, Ae Leiden; 1991).
92. Ronald, F. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* **48**, 9217-9232 (1992).
93. Ronald, F. The SPOT-synthesis technique: Synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications. *Journal of Immunological Methods* **267**, 13-26 (2002).
94. Fodor, S. et al. Light-Directed, Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis. *Science* **251**, 767-773 (1991).
95. Gaseitsiwe, S. et al. Pattern Recognition in Pulmonary Tuberculosis Defined by High Content Peptide Microarray Chip Analysis Representing 61 Proteins from *M. tuberculosis*. *Plos One* **3**, e3840 (2008).
96. Cretich, M., Breda, D., Damin, F., Borghi, M. & Sola, L. Allergen microarrays on high-sensitivity silicon slides. *Analytical and bioanalytical chemistry* **398**, 1723-1733 (2010).
97. Flinterman, A.E. et al. Peanut epitopes for IgE and IgG4 in peanut-sensitized children in relation to severity of peanut allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology* **121**, 737-743.e710 (2008).

98. Duburcq, X. et al. Peptide–Protein Microarrays for the Simultaneous Detection of Pathogen Infections. *Bioconjugate Chemistry* **15**, 307-316 (2004).
99. Andresen, H. et al. Functional peptide microarrays for specific and sensitive antibody diagnostics. *Proteomics* **6**, 1376-1384 (2006).
100. List, C. et al. Serodiagnosis of Echinococcus spp. Infection: Explorative Selection of Diagnostic Antigens by Peptide Microarray. *PLoS Negl Trop Dis* **4**, e771 (2010).
101. Hueber, W. et al. Antigen microarray profiling of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis & rheumatism* **52**, 2645-2655 (2005).
102. Stempfer, R. et al. Tumour auto-antibody screening: performance of protein microarrays using SEREX derived antigens. *Bmc Cancer* **10** (2010).
103. Asano, A., Torigoe, D., Sasaki, N. & Agui, T. Identification of antigenic peptides derived from B-cell epitopes of nucleocapsid protein of mouse hepatitis virus for serological diagnosis. *Journal of Virological Methods* **177**, 107-111 (2011).
104. Reilly, M. & Valentini, D. Visualisation and Pre-processing of Peptide Microarray Data. *Methods in Molecular Biology* **570**, 373-389 (2009).
105. Tong, W. et al. Development of public toxicogenomics software for microarray data management and analysis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **549**, 241-253 (2004).
106. Nahtman, T. et al. Validation of peptide epitope microarray experiments and extraction of quality data. *Journal of Immunological Methods* **328**, 1-13 (2007).
107. Mezzasoma, L. et al. Antigen Microarrays for Serodiagnosis of Infectious Diseases. *Clin Chem* **48**, 121-130 (2002).
108. Miller, J.C. et al. Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: Antibody screening and identification of potential biomarkers. *Proteomics* **3**, 56-63 (2003).

109. Stillman, B.A. & Tonkinson, J.L. FAST slides: a novel surface for microarrays. *BioTechniques* **29**, 630-635 (2000).
110. Haab, B.B., Dunham, M.J. & Brown, P.O. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome biology* **2**, research0004.0001 - research0004.0013 (2001).
111. Angenendt, P., Glökler, J., Sobek, J., Lehrach, H. & Cahill, D.J. Next generation of protein microarray support materials: evaluation for protein and antibody microarray applications. *J Chromatogr A* **1009**, 97-104 (2003).
112. Afanassiev, V., Hanemann, V. & Wöfl, S. Preparation of DNA and protein micro arrays on glass slides coated with an agarose film. *Nucleic Acids Research* **28**, e66 (2000).
113. Guschin, D. et al. Manual Manufacturing of Oligonucleotide, DNA, and Protein Microchips. *Analytical Biochemistry* **250**, 203-211 (1997).
114. Rubina, A.Y., Kolchinsky, A., Makarov, A.A. & Zasedatelev, A.S. Why 3-D? Gel-based microarrays in proteomics. *Proteomics* **8**, 817-831 (2008).
115. Gryadunov, D. et al. Gel-based microarrays in clinical diagnostics in Russia. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **11**, 839-853 (2011).
116. Olle, E. et al. Comparison of antibody array substrates and the use of glycerol to normalize spot morphology. *Experimental and Molecular Pathology* **79**, 206-209 (2005).
117. Kusnezow, W., Jacob, A., Walijew, A., Diehl, F. & Hoheisel, J.D. Antibody microarrays: An evaluation of production parameters. *Proteomics* **3**, 254-264 (2003).
118. MacBeath, G. & Schreiber, S.L. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* **289**, 1760-1763 (2000).
119. Rao, P.R. et al. Interheavy disulfide bridge in immunoglobulin G (IgG) reacting with dithionitrobenzoate - A unique feature in serum proteins. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **34**, 227-236 (1997).

120. Zhang, W. & Czupryn, M.J. Free Sulfhydryl in Recombinant Monoclonal Antibodies. *Biotechnology Progress* **18**, 509-513 (2002).
121. Cha, T., Guo, A. & Zhu, X.-Y. Enzymatic activity on a chip: The critical role of protein orientation. *Proteomics* **5**, 416-419 (2005).
122. Steinhauer, C. et al. Improved affinity coupling for antibody microarrays: Engineering of double-(His)₆-tagged single framework recombinant antibody fragments. *Proteomics* **6**, 4227-4234 (2006).
123. Wingren, C. et al. Microarrays based on affinity-tagged single-chain Fv antibodies: Sensitive detection of analyte in complex proteomes. *Proteomics* **5**, 1281-1291 (2005).
124. Barbulovic-Nad, I. et al. Bio-Microarray Fabrication Techniques—A Review. *Critical Reviews in Biotechnology* **26**, 237-259 (2006).
125. Weibel, C. “The Spotting Accelerator™”, Customizable Head Assembly for Advanced Microarraying. *Journal of the Association for Laboratory Automation* **7**, 89-94 (2002).
126. Sheehan, P.E., Edelstein, R.L., Tamanaha, C.R. & Whitman, L.J. A simple pen-spotting method for arraying biomolecules on solid substrates. *Biosens Bioelectron* **18**, 1455-1459 (2003).
127. Shalon, D., Smith, S.J. & Brown, P.O. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Research* **6**, 639-645 (1996).
128. Lee, K.-B., Park, S.-J., Mirkin, C.A., Smith, J.C. & Mrksich, M. Protein Nanoarrays Generated By Dip-Pen Nanolithography. *Science* **295**, 1702-1705 (2002).
129. Wadu-Mesthrige, K., Amro, N.A., Garno, J.C., Xu, S. & Liu, G.-y. Fabrication of Nanometer-Sized Protein Patterns Using Atomic Force Microscopy and Selective Immobilization. *Biophysical Journal* **80**, 1891-1899 (2001).

130. Lin, S.L., Tseng, F.T., Huang, H.H., Huang, C.H. & Chieng, C.C. Microsized 2D protein arrays immobilized by micro-stamps and micro-wells for disease diagnosis and drug screening. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **371**, 202-208 (2001).
131. Lin, S.C. et al. Simultaneous immobilization of protein microarrays by a micro stamper with back-filling reservoir. *Sensors and Actuators B* **99**, 174-185 (2004).
132. Pirrung, M.C. & Huang, C.-Y. A General Method for the Spatially Defined Immobilization of Biomolecules on Glass Surfaces Using "Caged" Biotin. *Bioconjugate Chemistry* **7**, 317-321 (1996).
133. McGall, G.H. et al. The Efficiency of Light-Directed Synthesis of DNA Arrays on Glass Substrates. *Journal of the American Chemical Society* **119**, 5081-5090 (1997).
134. Heller, M.J., Forster, A.H. & Tu, E. Active microelectronic chip devices which utilize controlled electrophoretic fields for multiplex DNA hybridization and other genomic applications. *ELECTROPHORESIS* **21**, 157-164 (2000).
135. Livache, T. et al. Polypyrrole DNA Chip on a Silicon Device: Example of Hepatitis C Virus Genotyping. *Analytical Biochemistry* **255**, 188-194 (1998).
136. Ringeisen, B.R. et al. Picoliter-Scale Protein Microarrays by Laser Direct Write. *Biotechnology Progress* **18**, 1126-1129 (2002).
137. Steinert, C.P. et al. A highly parallel picoliter dispenser with an integrated, novel capillary channel structure. *Sensors and Actuators A: Physical* **116**, 171-177 (2004).
138. Allain, L., Askari, M., Stokes, D. & Vo-Dinh, T. Microarray sampling-platform fabrication using bubble-jet technology for a biochip system. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **371**, 146-150 (2001).
139. Allain, L.R., Stratis-Cullum, D.N. & Vo-Dinh, T. Investigation of microfabrication of biological sample arrays using piezoelectric and bubble-jet printing technologies. *Analytica Chimica Acta* **518**, 77-85 (2004).

140. Morozov, V., Morozova, Tamara Ya Electro spray apparatus for mass fabrication of chips and libraries. *US. Patent. 6787313* (2004).
141. Morozov, V.N. & Morozova, T.Y. Electro spray Deposition as a Method for Mass Fabrication of Mono- and Multicomponent Microarrays of Biological and Biologically Active Substances. *Analytical Chemistry* **71**, 3110-3117 (1999).
142. Morgan, A., Garcia, B., Hargrave, A., Hommema, E. & Kilmer, G. Antibody microarray analysis of inflammatory mediator release by human leukemia T cells and human non-small cell lung cancer cells. *The FASEB journal* **21**, A632-A632 (2007).
143. Pérez, M.L., Gómara, M.J., Ercilla, G., Sanmartí, R. & Haro, I. Antibodies to Citrullinated Human Fibrinogen Synthetic Peptides in Diagnosing Rheumatoid Arthritis. *Journal of Medicinal Chemistry* **50**, 3573-3584 (2007).
144. Seurnyck-Servoss, S.L., White, A.M., Baird, C.L., Rodland, K.D. & Zangar, R.C. Evaluation of surface chemistries for antibody microarrays. *Analytical Biochemistry* **371**, 105-115 (2007).
145. Hart, A. Mann-Whitney test is not just a test of medians: differences in spread can be important. *BMJ* **323**, 391-393 (2001).
146. Tillmann, H.L. et al. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *New England Journal of Medicine* **345**, 715-724 (2001).
147. Maidana, M.T., Sabino, E.C. & Kallas, E.G. GBV-C/HGV and HIV-1 coinfection. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* **9**, 122-125 (2005).
148. Dille, B.J. et al. An ELISA for detection of antibodies to the E2 protein of GB virus C. *The Journal of infectious diseases* **175**, 458-461 (1997).
149. GraphPad Prim version 5.01 for Windows. *GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com* (2007).
150. Stata: Release 12. Statistical Software. *College Station, TX: StataCorp LP* (StataCorp. 2011).

151. Burgueño, M.J., García-Bastos, J.L., González-Bultrago, J.M. Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. *Medicina Clínica* **104**, 661-670 (1995).
152. Bewick, V., Cheek, L. & Ball, J. Statistics review 13: Receiver operating characteristic curves. *Crit. Care* **8**, 508-512 (2004).
153. Obuchowski, N.A., Lieber, M.L. & Wians, F.H. ROC curves in Clinical chemistry: Uses, misuses, and possible solutions. *Clinical Chemistry* **50**, 1118-1125 (2004).
154. Eng, J. Receiver Operating Characteristic Analysis a Primer. *Acad. Radiol.* **12**, 909-916 (2005).
155. Pepe, M.S. The Estastistical Evaluation of Medical Test for Classification and Prediction. (Atkinson, A. C. and Pierce, D. A., Eds.). *Oxford University Press, Oxford, UK*, 66-95 (2003).
156. Hanley, J.A. & McNeil, B.J. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* **143**, 29-36 (1982).
157. Lasko, T.A., Bhagwat, J.G., Zou, K.H. & Ohno-Machado, L. The use of receiver operating characteristic curves in biomedical informatics. *Journal of Biomedical Informatics* **38**, 404-415 (2005).
158. Larios, C., Alsina, M.A. & Haro, I. Péptidos de Fusión del Virus de la Hepatitis G: Definición, Síntesis y Caracterización Biofísica. *Tesis doctoral* (2005).
159. Larios, C., Busquets, M.A., Carilla, J., Alsina, M.A. & Haro, I. Effects of Overlapping GB Virus C/Hepatitis G Virus Synthetic Peptides on Biomembrane Models. *Langmuir* **20**, 11149-11160 (2004).
160. Pérez, T., Haro, I. & Ercilla, G. Diseño y Síntesis de Péptidos para el Diagnóstico de la Infección por el Virus de la Hepatitis G (GBV-C/HGV). *Tesis doctoral* (2007).
161. Hopp, T.P. & Woods, K.R. Prediction of Protein Antigenic Determinants from Amino-Acid-Sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **78**, 3824-3828 (1981).

162. Chou, P.Y. & Fasman, G.D. Secondary structural prediction of proteins from their amino acid sequence. *Trends in Biochemical Sciences* **2**, 128-131 (1977).
163. Janin, J. Surface and Inside Volumes in Globular Proteins. *Nature* **277**, 491-492 (1979).
164. Merrifield, R.B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **85**, 2149-2154 (1963).
165. Lloyd-Williams, P.A., F.; Giralt, E. Chemical Approaches to Synthesis of Peptides and Proteins. *CRC Press, New York*. (1997).
166. Tulla-Puche, J.A., F. The Power of Functional Resins in Organic Synthesis. *Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim*. (2008).
167. Barlos, K.G., D.; Kapos, S.; Papaphotiu, G.; Wenqing, Y.; Schäfer, W. Darstellung geschützter peptid-fragmente unter einatz substituerter triphenylmethyl-harze. *Tetrahedron Letters* **30**, 3943-3946 (1989).
168. Barlos, K.G., D.; Kapos, S. Papathotiu, G.; Schäfer, W.; Wenqing, Y Esterification of several partially protected peptide fragments with resin. Use of 2-chlorotriyl chloride for the synthesis of Leu15-gastrin I. *Tetrahedron Letters* **30**, 3947-3950 (1989).
169. Benoiton, N.L. 2-alkoxy-5(4H)-oxazolones and the enantiomerization of N-alkoxycarbonylamino acids. *Biopolymers* **40**, 245-254 (1996).
170. Sheehan, J.C. & Hess, G.P. A New Method of Forming Peptide Bonds. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 1067-1068 (1955).
171. Merrifield Solid-Phase Peptide Synthesis. 3. An Improved Synthesis Of Bradykinin. *Biochemist* **3**, 1385-1390 (1964).
172. Sarantakis, D., Teichman, J., Lien, E.L. & Fenichel, R.L. A novel cyclic undecapeptide, Wy-40,770, with prolonged growth hormone release inhibiting activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **73**, 336-342 (1976).

173. König, W.G., R. A new method for the synthesis of peptides: activation of the carboxy group with dicyclohexylcarbodiimide and 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazine. *Chem. Ber.* **103**, 2034-2040 (1970).
174. Carpino, L.A. 1-Hydroxy-7-Azabenzotriazole - an Efficient Peptide Coupling Additive. *Journal of the American Chemical Society* **115**, 4397-4398 (1993).
175. Carpino, L., Elfaham, A., Minor, C. & Albericio, F. Advantageous Applications Of Azabenzotriazole (Triazolopyridine)-Based Coupling Reagents To Solid-Phase Peptide-Synthesis. *Journal of the Chemical Society. Chemical communications*, 201-203 (1994).
176. Castro, B., Dormoy, J.R., Evin, G. & Selve, C. Reactions of Peptide Bond .4. Benzotriazolonyl-N-Oxytridimethylamino Phosphonium Hexafluorophosphate (Bop). *Tetrahedron Letters*, 1219-1222 (1975).
177. Martinez, J. et al. Synthesis and Biological-Activities of Some Pseudo-Peptide Analogs of Tetragastrin - the Importance of the Peptide Backbone. *Journal of Medicinal Chemistry* **28**, 1874-1879 (1985).
178. Coste, J., Lenguyen, D. & Castro, B. PyBOP - A New Peptide Coupling Reagent Devoid Of Toxic By-Product. *Tetrahedron letters* **31**, 205-208 (1990).
179. Knorr, R., Trzeciak, A., Bannwarth, W. & Gillessen, D. New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Letters* **30**, 1927-1930 (1989).
180. Poulain, R.F., Tartar, A.L. & Déprez, B.P. Parallel synthesis of 1,2,4-oxadiazoles from carboxylic acids using an improved, uronium-based, activation. *Tetrahedron Letters* **42**, 1495-1498 (2001).
181. Miranda, L. & Alewood, P. Accelerated chemical synthesis of peptides and small proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 1181-1186 (1999).
182. Albericio, F. et al. On the use of PyAOP, a phosphonium salt derived from HOAt, in solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron letters* **38**, 4853-4856 (1997).

183. Albericio, F., Bofill, J., El Faham, A. & Kates, S. Use of onium salt-based coupling reagents in peptide synthesis. *Journal of organic chemistry* **63**, 9678-9683 (1998).
184. Haro, I., Pérez, S., García, M., Chan, W.C. & Ercilla, G. Liposome entrapment and immunogenic studies of a synthetic lipophilic multiple antigenic peptide bearing VP1 and VP3 domains of the hepatitis A virus: a robust method for vaccine design. *FEBS Letters* **540**, 133-140 (2003).
185. Carpino, L.A. & Elfaham, A. Effect Of Tertiary Bases On O-Benzotriazolyluronium Salt-Induced Peptide Segment Coupling. *Journal of Organic Chemistry* **59**, 695-698 (1994).
186. Carpino, L.A., Elfaham, A. & Albericio, F. Racemization Studies During Solid-Phase Peptide-Synthesis Using Azabenzotriazole-Based Coupling Reagents. *Tetrahedron Letters* **35**, 2279-2282 (1994).
187. White, P., Keyte, J.W., Bailey, K. & Bloomberg, G. Expediting the Fmoc solid phase synthesis of long peptides through the application of dimethyloxazolidine dipeptides. *Journal of Peptide Science* **10**, 18-26 (2004).
188. de Oliveira, E., Villén, J., Giralt, E. & Andreu, D. Synthetic Approaches to Multivalent Lipopeptide Dendrimers Containing Cyclic Disulfide Epitopes of Foot-and-Mouth Disease Virus. *Bioconjugate Chemistry* **14**, 144-152 (2003).
189. Thumshirn, G., Hersel, U., Goodman, S.L. & Kessler, H. Multimeric Cyclic RGD Peptides as Potential Tools for Tumor Targeting: Solid-Phase Peptide Synthesis and Chemoselective Oxime Ligation. *Chemistry – A European Journal* **9**, 2717-2725 (2003).
190. Dijkgraaf, I. et al. Synthesis of DOTA-conjugated multivalent cyclic-RGD peptide dendrimers via 1,3-dipolar cycloaddition and their biological evaluation: implications for tumor targeting and tumor imaging purposes. *Organic & Biomolecular Chemistry* **5** (2007).
191. Wängler, C. et al. Multimerization of cRGD Peptides by Click Chemistry: Synthetic Strategies, Chemical Limitations, and Influence on Biological Properties. *Chembiochem* **11**, 2168-2181 (2010).

192. Spetzler, J.C. & Tam, J.P. Self-assembly of cyclic peptides on a dendrimer: Multiple cyclic antigen peptides. *Peptide Research* **9**, 290-296 (1996).
193. Dawson, P.E., Muir, T.W., Clark-Lewis, I. & Kent, S.B. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* **266**, 776-779 (1994).
194. Kent, S.B.H. Modulation of reactivity in Native Chemical Ligation through the Use of thiol additives. *J. Am.Chem. Soc.* **119**, 4325-4329 (1997).
195. Hackeng, T.M., Griffin, J.H. & Dawson, P.E. Protein synthesis by native chemical ligation: Expanded scope by using straightforward methodology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 10068-10073 (1999).
196. Tan, Z.P., Shang, S.Y. & Danishefsky, S.J. Insights into the Finer Issues of Native Chemical Ligation: An Approach to Cascade Ligations. *Angewandte Chemie-International Edition* **49**, 9500-9503 (2010).
197. Zhang, L. & Tam, J.P. Synthesis and Application of Unprotected Cyclic Peptides as Building Blocks for Peptide Dendrimers. *Journal of the American Chemical Society* **119**, 2363-2370 (1997).
198. Brugghe, H.F. et al. Simultaneous Multiple Synthesis And Selective Conjugation Of Cyclized Peptides Derived From A Surface Loop Of A Meningococcal Class-1 Outer-Membrane Protein. *International Journal of Peptide and Protein Research* **43**, 166-172 (1994).
199. Katsara, M., Tselios, T., Deraos, S., Deraos, G. & Matsoukas, M.-T. Round and round we go: Cyclic peptides in disease. *Current Medicinal Chemistry* **13**, 2221-2232 (2006).
200. Schellekens, G.A. et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* **43**, 155-163 (2000).
201. Andersen, A., Palmqvist, E., Bang, S., Shaw, A. & Hubalek, F. Backbone cyclic insulin. *Journal of Peptide Science* **16**, 473-479 (2010).
202. Tam, J.P. Peptide synthesis using unprotected peptides through orthogonal coupling methods. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 12485-12489 (1995).

203. Burns, J.A., Butler, J.C., Moran, J. & Whitesides, G.M. Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-Carboxyethyl)Phosphine. *Journal of Organic Chemistry* **56**, 2648-2650 (1991).
204. Kowalczyk, W., de la Torre, B.G. & Andreu, D. Strategies and Limitations in Dendrimeric Immunogen Synthesis. The Influenza Virus M2e Epitope as a Case Study. *Bioconjugate Chemistry* **21**, 102-110 (2010).
205. Kowalczyk, W., Monso, M., de la Torre, B.G. & Andreu, D. Synthesis of multiple antigenic peptides (MAPs) - strategies and limitations. *Journal of Peptide Science* **17**, 247-251 (2011).
206. Judith M, N. in *Methods in enzymology*, Vol. Volume 182. (ed. P.D. Murray) 239-253 (Academic Press, 1990).
207. Marston, F.A.O. & Hartley, D.L. in *Methods in enzymology*, Vol. Volume 182. (ed. P.D. Murray) 264-276 (Academic Press, 1990).
208. Monsó, M. et al. Peptide vaccine candidates against classical swine fever virus: T cell and neutralizing antibody responses of dendrimers displaying E2 and NS2-3 epitopes. *Journal of Peptide Science* **17**, 24-31 (2011).
209. Galande, A.K., Hilderbrand, S.A., Weissleder, R. & Tung, C.-H. Enzyme-Targeted Fluorescent Imaging Probes on a Multiple Antigenic Peptide Core. *Journal of Medicinal Chemistry* **49**, 4715-4720 (2006).
210. Lu, Y.A. & Tam, J.P. Peptide ligation by a reversible and reusable C-terminal thiol handle. *Organic Letters* **7**, 5003-5006 (2005).
211. Salvatore, R.N. A mild and highly convenient chemoselective alkylation of thiols using Cs₂CO₃-TBAI. *Tetrahedron Letters* **41**, 8931-8935 (2005).
212. Nam, J. et al. Asymmetric nucleophilic substitution of alpha-bromo amides via dynamic kinetic resolution for the preparation of dipeptide analogues. *Tetrahedron* **60**, 6311-6318 (2004).

213. Jakab, A. et al. Synthesis and Antibody Recognition of Cyclic Epitope Peptides, Together with Their Dimer and Conjugated Derivatives Based on Residues 9-22 of Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein D. *Bioconjugate Chemistry* **20**, 683-692 (2009).
214. Manea, M., Przybylski, M., Hudecz, F. & Mezö, G. Design, structural, and immuno-analytical properties of antigenic bioconjugates comprising a β -amyloid-plaque specific epitope. *Peptide Science* **90**, 94-104 (2008).
215. Gallo, S.A. et al. θ -Defensins Prevent HIV-1 Env-mediated Fusion by Binding gp41 and Blocking 6-Helix Bundle Formation. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 18787-18792 (2006).
216. Wild, C.T., Shugars, D.C., Greenwell, T.K., McDanal, C.B. & Matthews, T.J. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 9770-9774 (1994).
217. Gómara, M.J. et al. Hexapeptides that interfere with HIV-1 fusion peptide activity in liposomes block GP41-mediated membrane fusion. *Febs Letters* **580**, 2561-2566 (2006).
218. Lorizate, M., Gómara, M.J., de la Torre, B.G., Andreu, D. & Nieva, J.L. Membrane-transferring Sequences of the HIV-1 Gp41 Ectodomain Assemble into an Immunogenic Complex. *Journal of Molecular Biology* **360**, 45-55 (2006).
219. Tim, M. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**, 55-63 (1983).
220. Denizot, F. & Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods* **89**, 271-277 (1986).
221. Tim, M. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**, 55-63 (1983).

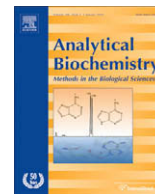
-
222. Berridge, M.V. & Tan, A.S. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **303**, 474-482 (1993).
223. Liu, S. et al. Different from the HIV Fusion Inhibitor C34, the Anti-HIV Drug Fuzeon (T-20) Inhibits HIV-1 Entry by Targeting Multiple Sites in gp41 and gp120. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 11259-11273 (2005).
224. Naider, F. & Anglister, J. Peptides in the treatment of AIDS. *Current Opinion in Structural Biology* **19**, 473-482 (2009).
225. Liu, S.W. et al. Different from the HIV fusion inhibitor C34, the anti-HIV drug fuzeon (T-20) inhibits HIV-1 entry by targeting multiple sites in gp41 and gp120. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 11259-11273 (2005).
226. Haro, I., Gomara, M., Perez, M., Vinas, O. & Ercilla, G. Antibodies against beta-fibrin synthetic peptides: A study of their association with the immunogenetic background and disease course of rheumatoid arthritis patients. *European journal of medicinal chemistry* **46**, 1095-1102 (2011).
227. Linhart, B. et al. A hypoallergenic hybrid molecule with increased immunogenicity consisting of derivatives of the major grass pollen allergens, Phl p 2 and Phl p 6. *Biological Chemistry* **389**, 925-933 (2008).
228. Engvall, E. & Perlmann, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Elisa .3. Quantitation Of Specific Antibodies By Enzyme-Labeled Anti-Immunoglobulin In Antigen-Coated Tubes. *The journal of immunology* **109**, 129 (1972).
229. Gómara, M.J., Fernández, L., Pérez, T., Ercilla, G. & Haro, I. Assessment of synthetic chimeric multiple antigenic peptides for diagnosis of GB virus C infection. *Analytical Biochemistry* **396**, 51-58 (2010).
230. Gómara, M.J. et al. Diagnostic Value of Anti-GBV-C Antibodies in HIV-Infected Patients. *Chemical Biology & Drug Design* **78**, 277-282 (2011).

-
231. Kim, P. & Pau, C.P. Comparing tandem repeats and multiple antigenic peptides as the antigens to detect antibodies by enzyme immunoassay. *Journal of Immunological Methods* **257**, 51-54 (2001).
232. Gruber, P., Suhr, M., Frey, A., Becker, W.M. & Hofmann, T. Development of an epitope-specific analytical tool for the major peanut allergen Ara h 2 using a high-density multiple-antigenic peptide strategy. *Molecular Nutrition & Food Research* **48**, 449-458 (2004).
233. Ndongmo, C.B. et al. New multiple antigenic peptide-based enzyme immunoassay for detection of simian immunodeficiency virus infection in nonhuman primates and humans. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 5161-5169 (2004).
234. Saravanan, P., Kumar, S. & Kataria, J.M. Use of multiple antigenic peptides related to antigenic determinants of infectious bursal disease virus (IBDV) for detection of anti-IBDV-specific antibody in ELISA - quantitative comparison with native antigen for their use in serodiagnosis. *Journal of Immunological Methods* **293**, 61-70 (2004).
235. Prieto, L., Lamarca, R., Casado, A. La evaluación de la fiabilidad en las observaciones clínicas: el coeficiente de correlación intraclase. *Medicina Clínica* **110**, 142-145 (1998).
236. Fleiss, J.L. The design and analysis of clinical experiments. *New York: Wiley* (1986).
237. Bravo, G. & Potvin, L. Estimating the reliability of continuous measures with cronbach's alpha or the intraclass correlation coefficient: Toward the integration of two traditions. *Journal of Clinical Epidemiology* **44**, 381-390 (1991).
238. Gleason, J.R. sg103: Within subjects (repeated measures) ANOVA, including between subjects factors. *Stata Technical Bulletin* **47**, 40-45 (1999).
239. Kuehl, R.O. Design of Experiments: Statistical Principles of Research Design and Analysis. *2nd ed. Belmont CA: Duxbury* (2000).
240. Snedecor, G.W., Cochran, W.G. Statistical Methods. . *8th ed. Ames, IA: Iowa State University Press.* (1989).

-
241. Winer, B.J., Brown, D.R., and Michels, K.M. Statistical Principles in Experimental Design. 3rd. Edition. *New York McGraw-Hill* (1991).
242. Wilcoxon, F. Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin* **1**, 80-83 (1945).
243. Kruskal, W.H. Historical Notes on the Wilcoxon Unpaired Two-Sample Test. *Journal of the American Statistical Association* **52**, 356-360 (1957).
244. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **57**, 289-300 (1995).
245. Newson, R.B. Frequentist q-values for multiple-test procedures. *Stata Journal* **10**, 568-584 (2010).
246. SIMES, R.J. An improved Bonferroni procedure for multiple tests of significance. *Biometrika* **73**, 751-754 (1986).
247. Benjamini, Y. & Yekutieli, D. The Control of the False Discovery Rate in Multiple Testing under Dependency. *The Annals of Statistics* **29**, 1165-1188 (2001).
248. Thaler, A., Seebach, D. & Cardinaux, F. Lithium-Salt Effects in Peptide Synthesis. Part II. Improvement of Degree of Resin Swelling and of Efficiency of Coupling in Solid-Phase Synthesis. *Helvetica Chimica Acta* **74**, 628-643 (1991).
249. Kaiser, E., Rl, C., Cd, B. & Cook, P. Color Test For Detection Of Free Terminal Amino Groups In Solid-Phase Synthesis Of Peptides. *Analytical biochemistry* **34**, 595 (1970).
250. Christensen, T. Qualitative Test for Monitoring Coupling Completeness in Solid-Phase Peptide-Synthesis Using Chloranil. *Acta Chemica Scandinavica Series B-Organic Chemistry and Biochemistry* **33**, 763-766 (1979).
251. Hancock, W. & Battersby, J. New Micro-Test For Detection Of Incomplete Coupling Reactions In Solid-Phase Peptide-Synthesis Using 2,4,6-Trinitrobenzene-Sulphonic Acid. *Analytical biochemistry* **71**, 260-264 (1976).

252. Herrera, E. et al. Effect of Synthetic Peptides Belonging to E2 Envelope Protein of GB Virus C on Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Journal of medicinal chemistry* **53**, 6054-6063 (2010).
253. MedCalc for Windows, version 8.0. *MedCalc Software, Mariakerke, Belgium.*

TRABAJOS RELACIONADOS



Assessment of synthetic chimeric multiple antigenic peptides for diagnosis of GB virus C infection

Maria J. Gómará^a, Leticia Fernández^a, Teresa Pérez^a, Guadalupe Ercilla^b, Isabel Haro^{a,*}

^a Unit of Synthesis and Biomedical Applications of Peptides IQAC-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

^b Immunology Service, CDB, IDIBAPS, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 July 2009

Available online 12 September 2009

Keywords:

GB virus C

Immunoassays

Multiple antigen peptide

Peptides

Surface plasmon resonance

ABSTRACT

The use of synthetic peptides of both structural and nonstructural proteins of GB virus C (GBV-C) has been studied for the development of new systems to diagnose infection caused by this virus. In an attempt to increase the antigenicity of linear peptide sequences, chimeric multiple antigenic peptides (MAPs) containing epitopes from E2, NS4, and NS5 GBV-C proteins have been synthesized. The synthetic constructs were evaluated by ELISA to establish whether the epitopes in chimeric branched peptides are more efficiently recognized by the specific antibodies compared to the monomeric linear sequences. Moreover, we have investigated the application of a commercial biosensor instrument for the detection of antibodies against the GBV-C in human serum samples. The results of the immunoassays reported in this work highlight the usefulness of synthetic tetrameric branched peptides containing sequences from envelope and nonstructural GBV-C proteins for the diagnosis of GBV-C infection. The potential clinical value of the MAP₄(E2-NS5a) for the serodiagnosis of GBV-C infection was demonstrated, thus providing the basis for performing prevalence studies of the infection among the hemodialyzed and hepatitis C virus (HCV)-infected population.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

The GB virus C (GBV-C)¹ (also formerly known as hepatitis G virus) is a virus made of a single chain of RNA that belongs to the Flaviviridae family. It is related to the hepatitis C virus (HCV) because it has a genomic structure and homology in the sequence very close to this hepatotropic virus. However, unlike HCV, it does not appear to cause hepatitis nor any other type of pathology [1,2].

There is clear evidence that GBV-C is transmitted by sexual and percutaneous routes and is frequently found in populations at risk for blood-borne or sexually transmitted viruses. Thus, GBV-C is more frequently detected in groups at higher risk for infection with hepatitis viruses by similar routes of transmission as well as in patients treated with multiple hemodialysis procedures and higher units of transfused blood products [3].

Particularly, GBV-C prevalence among patients with HCV mono-infection varies from 11% to 24% depending on the population

studied [4–7]. GBV-C has been reported to have no impact on the outcome of HCV infection, HCV-related chronic liver disease, hepatic fibrosis, or transaminase levels [8]. However, in HCV/HIV-coinfected patients, the course of HCV disease is accelerated, with a considerable increase in progression of hepatic fibrosis [9]. Recently, Berzsenyi et al. [10] provided evidence of a significant reduction in HCV-related liver morbidity associated with GBV-C viremia in HCV/HIV-coinfected patients. In this sense, they pointed out that GBV-C infection may contribute to the unpredictable clinical outcomes in HCV/HIV-coinfected patients and could have a role as a prognostic marker in this setting.

Otherwise, it has been proposed that GBV-C might be a good indicator for demonstrating nosocomial parenteral transmission of viral agents [11]. Thus, GBV-C could be introduced as a good predictor for hospital-acquired infection as this virus is common in North America and Western Europe.

Although, there are currently no commercial systems to detect specific markers of GBV-C infection, active GBV-C infection has been detected by RT-PCR [12] while past infection has been detected by the presence of anti-E2 antibodies [13] using an ELISA assay involving the E2 recombinant protein. The development of an anti-E2 detection method has promoted a complete definition of the prevalence of GBV-C since E2 antibodies are several times more frequently detectable than RNA in blood donors [14]. Although the appearance of anti-E2 antibodies is considered to be an indication

* Corresponding author. Address: C/Jordi Girona 18-26, Barcelona 08034, Spain. Fax: +34 932045904.

E-mail address: isabel.haro@iqac.csic.es (I. Haro).

¹ Abbreviations used: AUC, area under the curve; BSA, bovine serum albumin; CM dextran, carboxymethyl dextran; DIPCDI, *N,N'*-diisopropylcarbodiimide; DMF, dimethylformamide; GBV-C, GB virus C; HCV, hepatitis C virus; HOBt, hydroxybenzotriazole; MAPs, multiple antigenic peptides; PBS, phosphate-buffered saline; ROC, receiver operating characteristic; TBTU, 2-(1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborate; *t*Bu, *tert*-butyl; TFA, trifluoroacetic acid; TIS, triisopropylsilane.

of past infection, and detection of these antibodies and the active presence of GBV-C [15,16] are unlikely to be concomitant, recent literature provides descriptions of results that feature duality insofar as the positive presence of anti-E2 antibodies and the presence of viral RNA [17] are concerned.

On the other hand, it has been proposed that E2 antibodies are not a reliable marker of past GBV-C infection in populations with impaired immune function [18]. Particularly, HCV-coinfected patients receiving interferon therapy can also eliminate the virus without the development of anti-E2 antibodies. Thus, the elimination of the infection without antibodies against E2 protein raised questions about the usefulness of E2 antibodies as a marker of past GBV-C infection among HIV or HIV-HCV-coinfected patients.

The above noted results point to the need for further studies on the development of the antibodies to provide an understanding of the effect of exposure to GBV-C on human health in the context of other viral infections.

In our group, the use of synthetic peptides of both structural and nonstructural proteins of GBV-C has been studied for the development of new systems to diagnose infection caused by this virus. Our work has mainly involved the use of chemically well-defined antigens that guarantee less inter- and intra-assay variability. Hence, epitopes have been localized in E1 and E2 structural and NS3, NS4, and NS5 nonstructural proteins of GBV-C and new linear, chimeric, and cyclic antigens have been designed [19–21]. Our results have shown that the combination of different antigens is clearly necessary to achieve both a good degree of sensitivity in the immunoenzymatic assay and a greater specificity in results.

In an attempt to increase the antigenicity of previously reported linear peptide sequences, chimeric multiple antigenic peptides (MAPs) containing epitopes from E2, NS4, and NS5 GBV-C proteins have been synthesized. The synthetic constructs were evaluated by ELISA to establish whether the epitopes in chimeric branched peptides are more efficiently recognized by the specific antibodies compared to the monomeric linear sequences. Moreover, we have investigated the application of a commercial surface plasmon resonance-based biosensor instrument for the detection of antibodies against the GBV-C in human serum samples.

Experimental

Peptide synthesis

Multiple synthesis of 24 linear peptides related to the domain (89–149) of the E2 envelope protein of GBV-C was carried out in parallel in the solid phase using a semiautomatic synthesizer (MultisynTech GmbH). The 15-mer peptides are overlapped sequences by 13 residues. A Rink amide resin (TentaGel R RAM, RAPP Polymere GmbH) of functionalization 0.2 mmol/g, which allows carboxamide peptides to be obtained at the C-terminal end, was used. The Fmoc/*t*Bu strategy based on the use of the 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) group, labile to piperidine/DMF, was used as temporary protection for the α -amino functions and *tert*-butyl (*t*Bu) groups, labile to 95% trifluoroacetic acid (TFA), as semipermanent protection for the different functions of the side chains of the amino acids (*t*Bu esters or ethers). The reagent groups were activated essentially by means of treatment with *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIPCDI) and hydroxybenzotriazole (HOBT). The coupling reaction was carried out in duplicate using threefold excess of reagents. For the second coupling, the carboxyl group was activated by means of addition of a phosphonium salt, benzotriazole-1-yl-oxy-tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate (PyBop), in the presence of HOBT and a base such as diisopropylethylamine (DIEA).

Once the synthesis was complete, the cleavage and deprotection process of the peptidyl resins was carried out in a semiauto-

matic synthesizer using the MultisynTech accessories available for this purpose. This reaction was taken place by means of treatment with 95% TFA in the presence of scavengers, basically H₂O and triisopropylsilane (TIS).

The peptides were characterized by analytical high performance liquid chromatography (HPLC) and electrospray mass spectrometry.

The syntheses of MAP₄(E2-NS5a) and MAP₄(E2-NS4a) were carried out manually in a Rink amide resin (NovaSyn TGR, NovaBiochem) of functionalization 0.29 mmol/g. Amino acid side chain protection was effected by the following: trityl (triphenylmethyl) for glutamine, asparagine, and histidine; *tert*-butyl for aspartic acid, glutamic acid, serine, and threonine; 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl (Pmc) for arginine; Fmoc or 1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene) 3-methyl-butyl (Dde) and *tert*-butoxycarbonyl (Boc) for tryptophan. The Cys residues present in the E2(99–118) at positions 112 and 114 were replaced by 2-aminobutyric acid (Abu) residues. This amino acid has the same hydrophobic and steric properties as cysteine, but avoids the reactivity of the Cys thiol group without modifying the immunochemical properties of the parent peptide [22].

The first amino acid coupled to the resin was β -Ala. The tetravalent lysine core was obtained by sequential coupling of 0.4 mmol of Fmoc-Lys(Fmoc)-OH and 0.8 mmol of Fmoc-Lys(Dde)-OH, which were incorporated through 2-(1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborate (TBTU):HOBT:DIEA (1:1:2)-mediated carboxyl activation. The assembly of the peptide sequences E2(99–118) or E2(7–26) was then accomplished at both *N* α -lysine positions. An eightfold molar excess of Fmoc-amino acids, DIPCDI/HOBT was used throughout the synthesis. The N-terminal amino acid was introduced as a *tert*-butoxycarbonyl (Boc) *N* α -protected residue.

The *N* ϵ -Dde-protecting group was removed by treatment with 2% hydrazine in DMF [23]. The assembly of the NS5a(112–126) or NS4a(27–43) sequences was then performed at both exposed lysine *N* ϵ -amino groups of the monoepitopic MAP resin intermediates. For difficult couplings TBTU and DIEA agents were used. The efficiency of these reactions was evaluated by the Kaiser (ninhydrin) test and repeated couplings were carried out when a positive ninhydrin test was observed.

The diepitopic MAPs were concomitantly side chain deprotected and cleaved from the resins by treatment with a mixture of TFA in the presence of TIS and water as scavengers (TFA:TIS:H₂O, 9.5:0.25:0.25) for 6 h with occasional agitation at room temperature. Then, the resin was filtered and washed with TFA. The filtrates were evaporated in vacuum to dryness and the crude peptides were precipitated with diethyl ether to afford white solids, which were collected, dissolved in 30% acetic acid in water, and lyophilized.

MALDI-TOF mass spectrometry spectra confirmed the expected molecular mass of the diepitopic MAPs: [MH⁺] = 7899.9 and [MH⁺] = 8356.8 for MAP₄(E2-NS5a) and MAP₄(E2-NS4a), respectively. Purification of the crude molecules was achieved by semipreparative HPLC on a Kromasil C18 column (250 × 4.6 mm).

The synthesis of the linear peptides E2(7–26), GSRPFEPGLTWQ SCSCRANG; NS4a(27–43), TDWDVKGGSPLYRHGD; NS4b(8–22), GESAPSDAKVTDAVD; NS5a(112–126), GTSGWAEVVVTPHVD; Qm1 [NS5a(112–126)-GGG-NS4b(8–22)], GTSGWAEVVVTPHVDG GGGESAPSDAKVTDAVD; and Qm2 (NS4b(8–22)-GGG-NS5a(112–126)), GESAPSDAKVTDAVDGGGGTSGWAEVVVTPHVD has been described previously [20].

Serum specimens

Three panels of serum samples from the Hospital Clinic of Barcelona were studied. The first and second groups consisted of 95

sera from hemodialyzed patients and 65 sera from chronic hepatitis patients, respectively. The third group consisted of 50 control sera from volunteer blood donors. Thirty-five samples of the hemodialyzed and 36 samples of the chronic hepatitis panels were tested for the presence of anti-HGV E2 protein (Roche Diagnostics + GmbH).

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Peptides were coupled to assay plates (Costar Corp. DNABind *N*-oxysuccinimide surface) at 1 µg per well. Coupling was performed overnight at room temperature at pH 9.6 in carbonate/bicarbonate buffer (0.05 M).

Each plate contained control wells that included all reagents except the serum sample in order to estimate the background reading and control wells that included all reagents except the peptide to evaluate nonspecific reactions of sera. For blank controls, wells were coupled with BSA (2 µg/well). After incubation, the plates were blocked with 2% BSA in carbonate/bicarbonate (0.05 M, pH 9.6) buffer for 1 h at room temperature. Sera were diluted 50-fold in RIA buffer (1% BSA, 350 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1% vol/vol Triton X-100, 0.5 wt%/vol sodium deoxycholate, 0.1% SDS) supplemented with 10% fetal bovine serum. An amount of 100 µl/well was added, and the mixture was incubated for 1.5 h at room temperature. After the mixture was washed six times with PBS/0.05% Tween 20, 100 µl/well of antihuman IgG conjugated to peroxidase diluted in RIA buffer (1:1000) was added. After incubation for 1 h at room temperature, the plates were washed six times with PBS/0.05% Tween 20 and bound antibodies were detected with *o*-phenylenediamine dihydrochloride (OPD, Sigma Chemical Company) and 30% hydrogen peroxide (0.8 µl/10 ml). The plates were incubated at room temperature for 30 min. The reaction was stopped with H₂SO₄ (2 N, 50 µl) per well, and absorbance values were measured at a wavelength of 492 nm. All sera were tested in duplicate. Control sera were also included to monitor inter- and intra-assay variations.

Biospecific interaction analysis (BIA)

The Biacore T100 analytical instrument, CM5 sensor chip, and the running buffer (HBS-EP) containing 10 mM HEPES, pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3.4 mM, and 0.05% P20 surfactant were provided by Biacore (GE Healthcare).

Prior to peptide immobilization on the CM5 chip, optimal conditions for diffusion into the hydrophilic matrix were obtained. Different pH values (ranging from 3.1 to 5, depending on the *pI* of the synthetic construct) and different peptide concentrations (ranging from 12.6 nM to 1.26 µM) were assayed in order to optimize the signal for capture of anti-GBV-C/HGV antibodies (data not shown). Immobilization was performed at 25 °C and at a flow rate of 10 µl/min in HBS-EP as a running buffer. The sensor chip CM5 was activated by injecting *N*-hydroxysuccinimide (NHS) (0.05 M) and *N*-ethyl-*N'*-(3-diethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) (0.2 M) (1:2, v:v). Peptides were then covalently coupled to the sensor chip through reaction with primary amines. Excess reactive groups were deactivated by injecting 50 µl of 1 M ethanolamine adjusted to pH 8.5. Thus, 0.17, 0.19, 0.14, and 0.11 pmol/mm² of NS4b(8–22), NS5a(112–126), Qm1 (NS5a(112–126)-GGG-NS4b(8–22)), and Qm2 (NS4b(8–22)-GGG-NS5a(112–126)), respectively, were immobilized in different flow cells. Moreover, 0.034, 0.091, and 0.24 pmol/mm² of diepitopic MAP were immobilized in three different flow cells of one CM5 chip. Control experiments were performed using sensor chips activated according to the protocol described but without any peptide coupled.

Sera were diluted 1/50, 1/100, and 1/200 in running buffer containing 0.1% CM dextran (CM dextran). Samples were injected at

25 °C into the flow cells at a flow rate of 10 µl/min using HBS-EP as running buffer. The contact time between a sample and the specific surface was 10 min. The same peptide surface was used repeatedly to study several samples. This was accomplished by washing away the associated antibodies by an injection of 1 min pulse of NaOH (100 mM) between tests. To determine whether peptide-antibody binding had occurred, the cutoff of the analysis was calculated for each peptide relative to negative control sera (mean + 2 standard deviations).

Statistical analysis

Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis, Mann-Whitney *U* test was conducted using MedCalc version 7.6 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). Samples were considered positive when the absorbance was equal to or higher than the CO. The CO value was calculated from the ROC analysis.

The reactivities of each peptide construct with the panel of sera were compared using the *t* test analysis. Probability values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results and discussion

Selection of antigenic peptide sequences

There is currently great interest in work on the design of peptidic sequences that are three dimensionally similar to the most significant protein epitopes and meanwhile ensure total homogeneity of the antigen used in immunoassays. A number of approaches, including experimental and computational, have been described to select peptides that functionally mimic B-cell epitopes at the level of single amino acids. In an attempt to design a chimeric multiple antigen peptide as a better antigenic peptide that could improve the sensitivity and specificity of immunoassays based on linear monomeric peptides, we have selected the epitopes taking into account both previous studies carried out in our group and epitope mapping of a selected E2 region.

We have previously reported the usefulness of E2(99–118) and E2(125–139) peptides for the diagnosis of GBV-C infection [21]. In the present work, in order to better comprehend the GBV-C sera reactivities with E2 peptides, we proceeded to analyze the amino acid requirements by synthesizing 15-mer overlapped peptides in 12 residues that scan the (89–149) region of GBV-C E2 protein. The peptides that are shown in Table 1 were successfully synthesized by multiple synthesis and characterized by analytical HPLC and electrospray mass spectrometry (ES-MS). Considering that viral hepatitis is highly prevalent in the dialysis population and patients in maintenance hemodialysis have high risk of GBV-C infection as well as patients coinfecting with HCV, antibody reactivity to these synthetic peptides was assessed in a cohort of hemodialyzed and chronic C hepatitis patients. These peptides were analyzed in a direct binding assay (ELISA test) to evaluate their recognition by the antibodies present in both panels of sera. To identify the best recognized epitope, the 24 peptides were first assayed with 8 hemodialyzed and 8 chronic C hepatitis patient sera and 4 samples of serum from healthy blood donors. As shown in Fig. 1, an increase in sensitivity was seen predominantly for P6, P7, P8, and P9 peptides. Moreover, the region corresponding to P18 and P19 peptides also rendered a good performance in the ELISA assay. Nevertheless, a lower specificity of this last region compared to the P6–P9 sequences was obtained, the reactivity measured against blood donor sera being clearly higher for P18–P19 peptides (Table 1, supplementary material). Taking into account these results, the (99–118) sequence of E2 protein corresponding to P6–P9 peptides was selected as an antigenic peptide domain to be included in the

Table 1
Primary structure and ES-MS data of synthetic peptides that scan the (89–149) region of GBV-C E2 protein.

	E2 (99–118)	E2 (125–139)	ES-MS	
	SVSVTCVWGSVSWFASTGGRDSKIDVWSLVPVGSASCTIAALGSSDRDTVVELSEWGVPCA		Observed masses	Expected masses
P1	SVSVTCVWGSVSWFA		1613.75	1613.84
P2	SVTCVWGSVSWFAST		1615.73	1615.81
P3	TCVWGSVSWFASTGG		1543.68	1543.70
P4	VWGSVSWFASTGGRD		1610.75	1610.73
P5	GSVSWFASTGGRDSK		1540.73	1540.64
P6	VSWFASTGGRDSKID		1624.78	1624.76
P7	WFASTGGRDSKIDVW		1723.83	1723.89
P8	ASTGGRDSKIDVWSL		1590.80	1590.74
P9	TGGRDSKIDVWSLVP		1628.85	1628.83
P10	GRDSKIDVWSLVPVG		1626.87	1626.86
P11	DSKIDVWSLVPVGS		1571.82	1571.78
P12	KIDVWSLVPVGSASC		1559.80	1559.83
P13	DVWSLVPVGSASCTI		1532.75	1532.76
P14	WSLVPVGSASCTIAA		1460.73	1460.70
P15	LVPVGSASCTIAALG		1357.73	1357.62
P16	PVGSASCTIAALGSS		1319.64	1319.48
P17	GSASCTIAALGSSDR		1394.65	1394.51
P18	ASCTIAALGSSDRDT		1466.67	1466.57
P19	CTIAALGSSDRDTVV		1506.73	1506.68
P20	IAALGSSDRDTVEL		1544.80	1544.71
P21	ALGSSDRDTVVELSE		1576.76	1576.67
P22	GSSDRDTVVELSEWG		1635.74	1635.69
P23	SDRDTVVELSEWGV		1687.81	1687.81
P24	RDTVVELSEWGVPCA		1659.79	1659.86

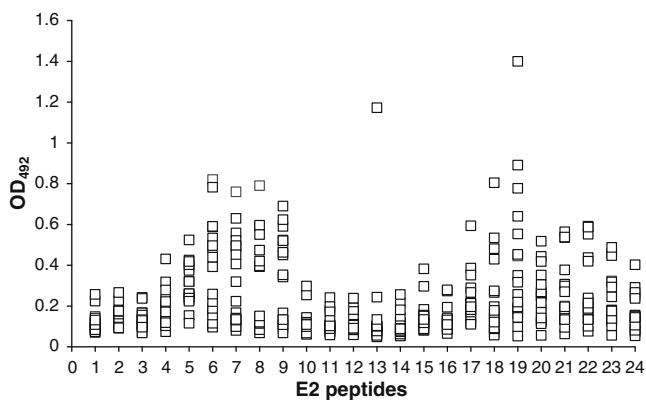


Fig. 1. Reactivity of hemodialyzed and chronic hepatitis patient sera with 24 overlapped peptides that scan the (89–149) region of GBV-C E2 protein.

tetrameric structure of one chimeric MAP. Besides, the NS5a(112–126) peptide was also selected according to the results previously obtained [20]. As described, the reactivity of the NS5a(112–126) peptide with the sera considered negative by the commercial E2 recombinant-protein test was quite significant, supporting the idea that the combination of antigens belonging to different viral proteins is necessary to ensure good sensitivity. Thus, MAP₄[E2(99–118) and NS5a(112–126)] was decided to be tested for reactivity in the above described panels of sera.

On the other hand, to further analyze the usefulness of MAP constructs and to investigate the antigenic domain dependence of the antibody response, MAP₄[(E2(7–26), NS4a(27–43))] was also selected for synthesis. This chemical structure combines a linear peptide corresponding to the N-terminus of the E2 protein which was demonstrated to be highly reactive against sera containing anti-GBV-C antibodies (results to be published), and a previously defined antigenic region of the NS4a protein [20].

Reactivity of chimeric multiple antigenic peptides by ELISA

As previously described, a useful attempt to increase the antigenicity of peptide sequences is the covalent attachment of epitopes to synthetic branched polymeric scaffolds of controlled chemical composition [24]. In this sense, the MAP system based on a small immunogenically inert core matrix of lysine residues bearing radially branching synthetic peptides has been described as a multimeric form that improves the antigenic capacity of monomeric linear peptides. The main advantages of MAP constructs are that they consist of pure antigens and provide scaffolding for close packing of peptide antigens which permit stabilization of the secondary structure and reverse turns of peptide antigens. MAPs of different complexity have been used for detection of specific antibodies of human diseases such as HIV-1 infection [25,26], hepatitis A [27], allergy [28], herpes simplex virus (HSV) infection [29], human herpes virus (HHV) infection [30], and systemic lupus erythematosus [31].

In this work, the synthesis of two heterogeneous and tetrameric macromolecular constructs was successfully accomplished using a combination of orthogonal Dde amino protection and Fmoc-based solid-phase chemistry [32]. The structure of the diepitopic MAPs that are based on a tetrameric lysine core is represented in Fig. 2. The crude peptides were purified by semipreparative reversed-phase HPLC and the identity of the purified synthetic protein constructs was confirmed by MALDI-TOF and electrospray MS analysis (Fig. 1, supplementary material).

With the aim of investigating the synergistic effects of presenting two copies of epitopes from different GBV-C proteins in the same macromolecule, antibody reactivity to the synthetic MAPs were assessed in a cohort of 95 hemodialyzed and 65 chronic C hepatitis patient sera. Fifty sera from healthy blood donors were used as control.

Diepitopic MAP containing two copies of E2(99–118) and NS5a(112–126) epitopes was compared with the corresponding

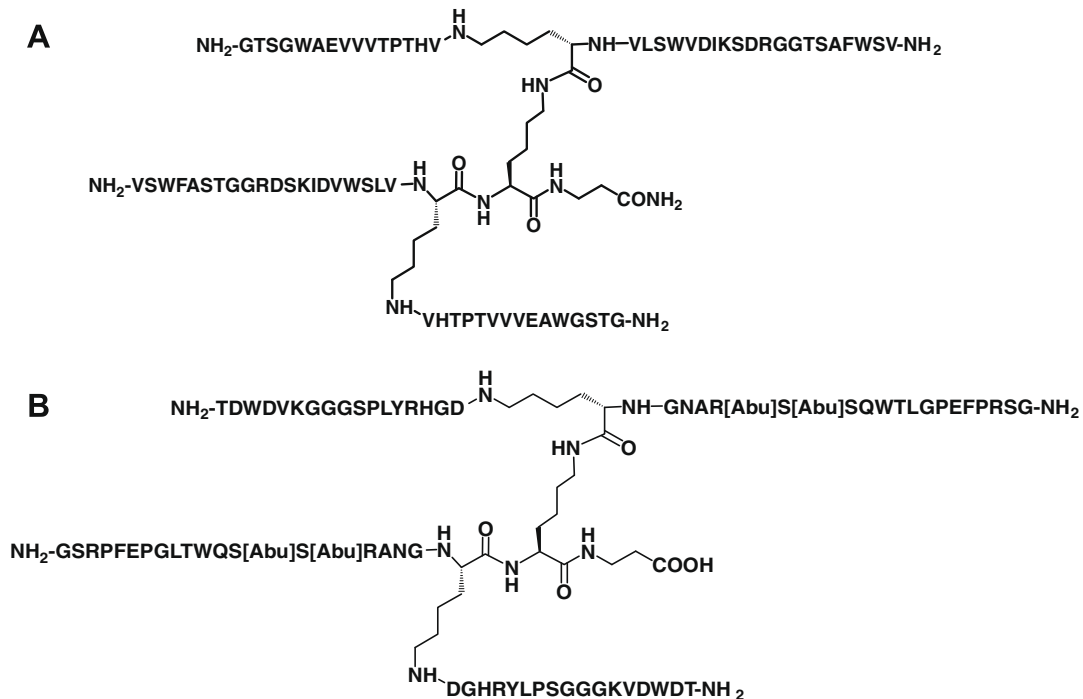


Fig. 2. Primary structure of: (A) MAP₄[E2(99–118)-NS5a(112–126)] and (B) MAP₄[E2(7–26)-NS4a(27–43)]. Abu: L- α -aminobutyric acid.

monomeric peptides as coating antigens in the ELISA. As shown in Fig. 3, the ROC curve analysis showed higher area under the curve (AUC) value for MAP₄(E2-NS5a) (0.874) compared to the linear monomeric peptides (0.719 and 0.751 for NS5a(112–126) and E2(99–118), respectively). The higher specificity obtained for the MAP compared with the monomeric linear peptides as well as the increase in the sensitivity indicates that this multimeric peptide bearing peptide sequences from envelope and nonstructural GBV-C proteins within the same molecule is more antigenic than the corresponding parent peptides and can be used to detect spe-

cific anti-GBV-C antibodies to more than one epitope simultaneously.

Considering the success of the results obtained with the above described MAP construct, the antigenic capacity of the MAP₄(E2-NS4a) was also analyzed with the same panels of sera. In Fig. 4 the relationship between the sensitivity and the specificity of the assays performed with the two diepitopic MAP constructs for different cutoff values is presented graphically by means of the ROC curve analysis. We could observe a significantly higher area under the curve value for the synthetic MAP₄(E2-NS5a) (AUC = 0.806 and 0.947) compared to the MAP₄(E2-NS4a) (AUC = 0.626 and 0.764) for both panels of sera, hemodialyzed and chronic hepatitis patients, respectively. Fig. 4b shows the reactivity of both MAP₄(E2-NS5a) and MAP₄(E2-NS4) with three panels of sera, hemodialyzed, chronic C hepatitis, and blood donors, respectively. The cutoff selected from the ROC curve results corresponded to 98% specificity. The reactivities of the MAP₄(E2-NS5a) for hemodialyzed and chronic C hepatitis patient sera were significantly higher than those of the MAP₄(E2-NS4).

These results clearly indicate that the presence of peptides belonging to the NS5a nonstructural protein is necessary to ensure a good balance sensitivity/specificity.

In the development of tests to identify antibodies to HCV the addition of antigens from the NS5 region in the third generation ELISA assays improved the sensitivity of the tests [33]. The reactivity to NS5 proteins can also be identified individually by supplementary assays, as recombinant immunoblot assay (RIBA), which detects antibodies to each of the HCV proteins in a support membrane. Furthermore, antibodies to HCV-NS5 in HCV infection may be a surrogate marker of viremia [34,35]. In the same way and considering that the genetic structure and codified viral products are similar among the Flaviviridae virus, the inclusion of GBV-C NS5 epitopes in the peptide antigen allows the amelioration of a peptide-based test for the diagnosis of GBV-C infection.

Finally, the ELISA results obtained with the chimeric MAP constructs were compared to the results obtained when using the commercial E2 recombinant protein-based test. Diepitopic MAPs

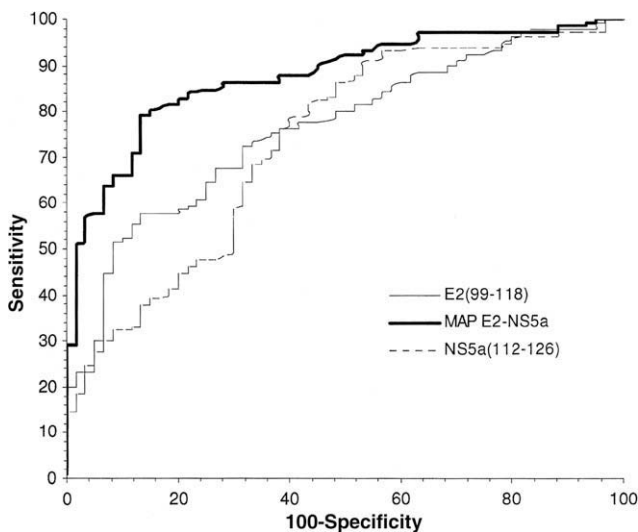


Fig. 3. ROC curve analysis for E2(99–118), NS5a(112–126), and MAP₄(E2-NS5a) antibody reactivity in the cohort of both hemodialyzed and chronic hepatitis patient sera. Sensitivity and specificity were calculated for all potential cutoff values and plotted ROC curves ($n = 95$ hemodialyzed and 65 chronic hepatitis patients, $n = 50$ blood donors). The area under the ROC curves was 0.751, 0.719, and 0.874 for E2, NS5a, and MAP E2-NS5a, respectively.

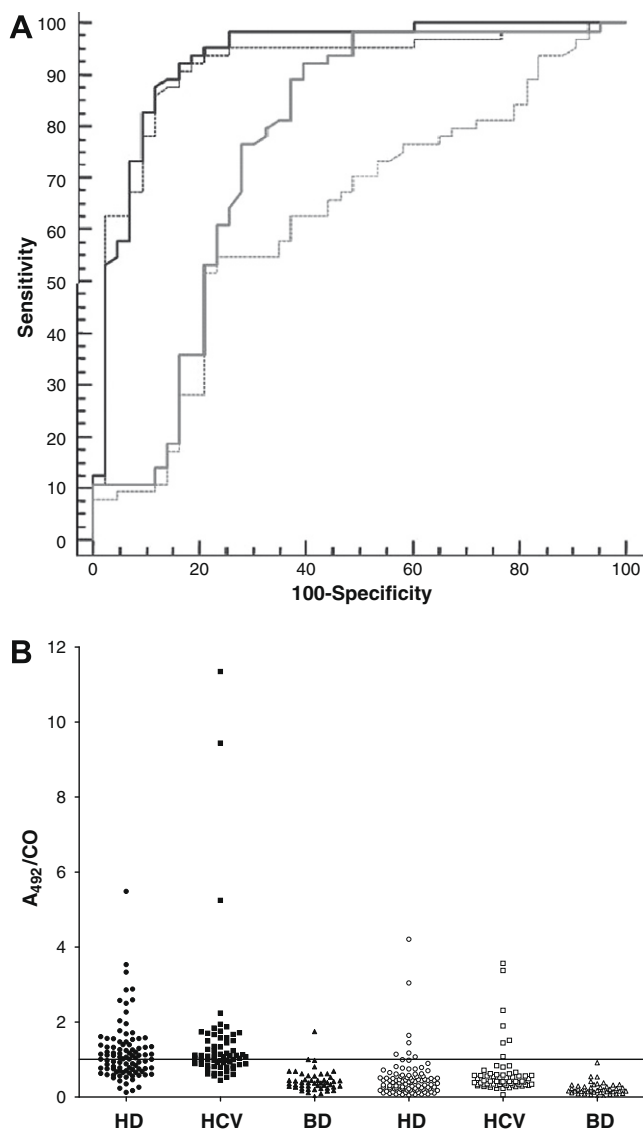


Fig. 4. (A) ROC curve analysis for MAP E2-NS5a (black) and MAP E2-NS4a (grey) antibody reactivity in the cohort of both hemodialyzed (HD, solid line) and chronic hepatitis (CH, dotted line) patient sera. Sensitivity and specificity were calculated for all potential cutoff values and plotted ROC curves. (B) Reactivity in ELISA of MAP₄(E2-NS5a) (black symbols) and MAP₄(E2-NS4) (white symbols) with HD, hemodialyzed patients; HCV, hepatitis C patients; and BD, blood donors. The samples were considered anti-GBV-C antibodies positive when Abs/CO \geq 1.

were able to detect several samples that were scored as negative by the commercial E2 protein test, particularly in the chronic hepatitis panel sera (data not shown). These results reinforce the idea that the inclusion of nonstructural related sequences in the antigenic peptide increases the sensitivity of immunoassays based on E2 recombinant protein.

Detection of anti-GBV-C antibodies in human sera by surface plasmon resonance assay

Surface plasmon resonance (SPR) technology represents a promising alternative to current routine immunoassay-based methods. Due to the fact that the interaction measurements between the biomolecules are based on the changes in the refractive index on the surface of the sensor, the detection of an analyte takes place directly and without the presence of markers. The analyte does not therefore require special characteristics (scattering

bands) or markers (radioactive or fluorescent) and can be detected directly without the need to use detection protocols in which multiple steps are used, for example, sandwich-type tests. However, the sensitivity, reproducibility, and robustness of SPR-based protein detection compared to the established and commonly used sandwich-based or other labeling-based methods remain to be critically assessed [36]. Comparative assessment of methodology can be complicated for complex media such as body fluids [37].

Nevertheless, the high analytical performance and the potential clinical value of this technology in the diagnosis of several infectious diseases have been reported. Thus, peptide-based biosensor assays have been performed directly on crude plasma samples for detection of specific antibodies as biomarkers of viral infectious diseases such as hepatitis A virus [38], hepatitis G virus [21], herpes simplex virus [39], rubella virus [40], and recently, Epstein-Barr virus [41] as well as other human diseases as type I diabetes [42] and cancer [43].

In this work, we have also investigated the application of a commercial biosensor instrument for the detection of specific anti-GBV-C antibodies in human serum samples. First, we tested by means of SPR technology, monomeric linear NS4b(8–22), NS5a(112–126), and two chimeric linear peptides Qm1 [NS5a(112–126)-GGG-NS4b(8–22)] and Qm2 [NS4b(8–22)-GGG-NS5a(112–126)] whose antigenicities have been previously analyzed by classical solid-phase immunoassay [20]. The chimeric peptides contained the same antigens colinearly linked via a triglycyl spacer but with two different epitope orientations. These four linear peptides were covalently linked to the CM5 sensor chip surface in order to ascertain their ability to detect anti-GBV-C antibodies in a panel of 35 hemodialyzed patient sera. The amine-coupling chemistry was used as the method of ligand immobilization in order to reproduce the same conditions of antigen presentation as in the ELISA format. Moreover a serum dilution of 1/50 was used as it has been assayed by the ELISA test.

Since the major disadvantage of SPR is the nonspecific binding of sample components to the sensor surface when analyzing complex samples such as blood serum, carboxymethyl dextran has been added to the serum samples in order to reduce the nonspecific binding to CM-coated surfaces via a competition effect. Moreover, a reference channel was also used to allow for subtraction of the signal from nonspecifically bound molecules from the total response. The reference channel was obtained after activation and deactivation of the surface without coupling a protein.

Fig. 2 (supplementary material) summarizes the serological results obtained with the different peptides using SPR methodology.

Compared to serological results previously obtained by the peptide-based immunoassays [20], the reactivity observed with the Qm1 peptide was significantly higher using SPR technology. By means of the Biacore assay the sensitivity was increased to 65% with 23 of the 35 tested sera being positive, while only 14 of 35 hemodialyzed sera samples were scored as positive in the ELISA test (sensitivity of 40%). These differences were significant ($P = 0.013$). Nevertheless, no significant differences were obtained when NS4b(8–22), NS5a(112–126), and Qm2 were immobilized in the sensor chip compared to the sensitivity previously obtained in the ELISA test (Table 2).

Taking into account that, on one hand, chimeric peptides can improve the sensitivity of the peptide biosensor assay and, on the other hand, the epitope presentation within the peptide antigen is crucial to the specific antibody recognition, we decided to analyze the other chimeric format based on a branched scaffold.

Since this chimeric branched molecule presented a good sensitivity/specificity balance in the ELISA test based on the covalent immobilization of the peptide via its amino groups, we performed the immobilization of the MAP in the sensor chip via the same amino-coupling chemistry.

Table 2

Comparison in sensitivity between SPR and ELISA assays using a panel of 35 sera from hemodialyzed patients.

	NS4b(8–22)	NS5a(112–126)	Qm1	Qm2
ELISA	8/35 (23%)	11/35 (31%)	14/35 (40%)	16/35 (46%)
SPR assay	9/35 (25%)	14/35 (11%)	23/35 (65%)	12/35 (34%)
ELISA vs. SPR	$P = 0.455$	$P = 0.053$	$P = 0.013$	$P = 0.298$

In order to allow a better discrimination of specific antibody binding from low-avidity background reactivity present frequently in human sera we optimized different conditions in the SPR analysis. First, we varied the injection time of the same concentration of the MAP peptide to obtain different immobilization levels on the three flow cells. Then, for these different peptide immobilization levels, we measured antibody binding responses at 1/50, 1/100, and 1/200 sera dilutions (Fig. 3, supplementary material).

Using these conditions, 25 sera from chronic C hepatitis patients that were considered as positive on the basis of the preliminary screening by ELISA and 11 sera from blood donors were tested. Binding of the serum antibodies was detected according to the magnitude of SPR signal before and after injection of the sample. No differences were obtained between positive and negative samples at 1/100 and 1/200 dilutions when injected over 0.034, 0.091, and 0.24 pmol mm⁻² peptide-functionalized surfaces. Despite using reference channels and adding CM dextran to the serum samples to avoid nonspecific interaction, many serum samples behaved in an inconsistent way. Only considering the flow cell with the highest amount of peptide immobilized we could discriminate between positive and negative samples at the highest concentration of sera (1/50). However, 14 of the 25 positive samples tested gave positive results for the presence of specific serum antibodies and 5 of the 11 negative samples also a rendered positive response. Thus, the specificity of the MAP-based biosensor was significantly lower than that obtained by the conventional immunoassay.

It has been described that in immune reaction based on SPR, the specificity of the assay is enhanced by a sandwich technique, because the amplified antibody can mostly interact with its antigen [44]. The advantage of this approach does not change the physical, chemical, or biological characteristics of the antibodies. Moreover, since polyclonal antibodies contain the entire antigen-specific antibody population, one antigen molecule can form a complex with several antibody molecules. In this sense, in order to enhance the specificity of the MAP-based biosensor a sandwich strategy could be performed since the specificity of the antibody–antigen–antibody will presumably be higher than that of the antigen–antibody.

Conclusions

In our hands, nonspecific binding to the sensor surface, which would hinder a specific biological interaction, is a serious obstacle for the development of the MAP-based biosensor handling serum samples. In this sense, the MAP SPR-based biosensor was not considered as a useful tool for detecting the presence of specific serum antibodies against GBV-C since it did not give any advantage over the peptide-based ELISA. Our results demonstrated that the immunoenzymatic assays, such as peptide-based ELISA, constitute a simple, cheap, and sensitive method for detection of specific antibodies. This assay is easy to perform, cost effective, and reliable without compromising sensitivity and specificity.

The results of the immunoassays reported here highlight the usefulness of synthetic tetrameric branched peptides containing sequences from envelope and nonstructural GBV-C proteins in

hepatitis G diagnosis. The potential clinical value of MAP₄(E2-NS5a) for the serodiagnosis of GBV-C infection has been demonstrated, thus giving information for performing prevalence studies of the infection among the hemodialyzed and HCV-infected population. In this sense, we are also currently investigating the ability of the chimeric MAP to recognize specific anti-GBV-C antibodies in HIV and HCV/HIV-coinfected patients in order to provide an understanding of the effect of exposure to GBV-C in the progression of illness caused by HIV infection as well as the putative role as a prognostic marker in the context of other viral infections.

Acknowledgments

This work was funded by Grants CTQ2006-15396-CO2-01/BQU from the Ministerio de Ciencia e Innovación and PIE-I3(2008801081) from Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Spain. L.F. is a recipient of a FPI Grant from the Ministerio de Ciencia, Spain.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ab.2009.09.011.

References

- [1] M.J. Mphahlele, G.K. Lau, W.F. Carman, HGV: the identification, biology and prevalence of an orphan virus, *Liver* 18 (3) (1998) 143–155.
- [2] D. Theodore, S.M. Lemon, GB virus C, hepatitis G virus, or human orphan flavivirus?, *Hepatology* 25 (5) (1997) 1285–1286.
- [3] G.L. Baggio-Zappia, C.F. Hernandez Granato, HIV-GB virus C co-infection: an overview, *Clin. Chem. Lab. Med.* 47 (1) (2009) 12–19.
- [4] A.M. Di Bisceglie, Hepatitis G virus infection: a work in progress, *Ann. Intern. Med.* 125 (9) (1996) 772–773.
- [5] H.H. Feucht, B. Zollner, S. Polywka, et al., Prevalence of hepatitis G viremia among healthy subjects, individuals with liver disease, and persons at risk for parenteral transmission, *J. Clin. Microbiol.* 35 (3) (1997) 767–768.
- [6] H. Saitoh, M. Moriyama, H. Matsumura, I. Goto, N. Tanaka, Y. Aarakawa, The clinical significance of GBV-C/HGV exposure in C-viral chronic liver disease and blood donors, *Hepatology* 36 (4) (2002) 288–296.
- [7] E. Tanaka, H.J. Alter, Y. Nakatsujii, et al., Effect of hepatitis G virus infection on chronic hepatitis C, *Ann. Intern. Med.* 125 (9) (1996) 740–743.
- [8] E.G. Rambusch, H. Wedemeyer, H.L. Tillmann, S. Heringlake, M.P. Manns, Significance of coinfection with hepatitis G virus for chronic hepatitis C—a review of the literature, *Z. Gastroenterol.* 36 (1) (1998) 41–53.
- [9] Y. Benhamou, M. Bochet, M.V. Di, et al., Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multivirc Group, *Hepatology* 30 (4) (1999) 1054–1058.
- [10] M.D. Berzsenyi, D.S. Bowden, H.A. Kelly, et al., Reduction in hepatitis C-related liver disease associated with GB virus C in human immunodeficiency virus coinfection, *Gastroenterology* 133 (6) (2007) 1821–1830.
- [11] S.M. Hosseini-Moghaddam, H. Keyvani, M. Samadi, et al., GB virus type C infection in hemodialysis patients considering co-infection with hepatitis C virus, *J. Med. Virol.* 80 (7) (2008) 1260–1263.
- [12] U. Kunkel, M. Hohne, T. Berg, et al., Quality control study on the performance of GB virus C/hepatitis G virus PCR, *J. Hepatol.* 28 (6) (1998) 978–984.
- [13] M. Tacke, K. Kiyosawa, K. Stark, et al., Detection of antibodies to a putative hepatitis G virus envelope protein, *Lancet* 349 (9048) (1997) 318–320.
- [14] V.I. Reshetnyak, T.I. Karlovich, L.U. Ilchenko, Hepatitis G virus, *World J. Gastroenterol.* 14 (30) (2008) 4725–4734.
- [15] M. Tacke, S. Schmolke, V. Schlueter, et al., Humoral immune response to the E2 protein of hepatitis G virus is associated with long-term recovery from infection and reveals a high frequency of hepatitis G virus exposure among healthy blood donors, *Hepatology* 26 (6) (1997) 1626–1633.
- [16] D.L. Thomas, D. Vlahov, H.J. Alter, et al., Association of antibody to GB virus C (hepatitis G virus) with viral clearance and protection from reinfection, *J. Infect. Dis.* 177 (3) (1998) 539–542.
- [17] P. Toniutto, C. Fabris, F. Barbone, et al., Immunoreactivity to putative B-cell epitopes of hepatitis G virus polypeptide in viremic and nonviremic subjects, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6 (4) (1999) 573–576.
- [18] M.D. Berzsenyi, S.K. Roberts, What is the role of GB virus C infection in hepatitis C virus/HIV coinfection?, *J. Infect. Dis.* 194 (4) (2006) 407–409.
- [19] M. Fernandez-Vidal, M.D. Cubero, G. Ercilla, M.J. Gómara, I. Haro, Application of a chimeric synthetic peptide in the development of a serologic method for the diagnosis of hepatitis G virus infection, *Protein Pept. Lett.* 14 (9) (2007) 865–870.

- [20] T. Perez, G. Ercilla, W.C. Chan, I. Haro, Antigenicity of chimeric and cyclic synthetic peptides based on nonstructural proteins of GBV-C/HGV, *J. Pept. Sci.* 12 (4) (2006) 267–278.
- [21] N. Rojo, G. Ercilla, I. Haro, GB virus C (GBV-C)/hepatitis G virus (HGV): towards the design of synthetic peptides-based biosensors for immunodiagnosis of GBV-C/HGV infection, *Curr. Protein Pept. Sci.* 4 (4) (2003) 291–298.
- [22] I. Haro, S. Perez, M. Garcia, W.C. Chan, G. Ercilla, Liposome entrapment and immunogenic studies of a synthetic lipophilic multiple antigenic peptide bearing VP1 and VP3 domains of the hepatitis A virus: a robust method for vaccine design, *FEBS Lett.* 540 (1–3) (2003) 133–140.
- [23] B.W. Bycroft, W.C. Chan, S.R. Chhabra, N.D. Hone, A novel lysine-protecting procedure for continuous-flow solid-phase synthesis of branched peptides, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (9) (1993) 778–779.
- [24] J.P. Tam, Recent advances in multiple antigen peptides, *J. Immunol. Methods* 196 (1) (1996) 17–32.
- [25] P. Kim, C.P. Pau, Comparing tandem repeats and multiple antigenic peptides as the antigens to detect antibodies by enzyme immunoassay, *J. Immunol. Methods* 257 (1–2) (2001) 51–54.
- [26] C.P. Pau, W. Luo, J.S. McDougal, Chimeric multiple antigenic peptides for simultaneous detection of specific antibodies to HIV-1 groups M, N, O, and HIV-2, *J. Immunol. Methods* 318 (1–2) (2007) 59–64.
- [27] M.J. Gomara, S. Riedemann, I. Vega, H. Ibarra, G. Ercilla, I. Haro, Use of linear and multiple antigenic peptides in the immunodiagnosis of acute hepatitis A virus infection, *J. Immunol. Methods* 234 (1–2) (2000) 23–34.
- [28] P. Gruber, M. Suhr, A. Frey, W.M. Becker, T. Hofmann, Development of an epitope-specific analytical tool for the major peanut allergen Ara h 2 using a high-density multiple-antigenic peptide strategy, *Mol. Nutr. Food Res.* 48 (6) (2004) 449–458.
- [29] D.K. Oladepo, P.E. Klapper, H.S. Marsden, Peptide based enzyme-linked immunoassays for detection of anti-HSV-2 IgG in human sera, *J. Virol. Methods* 87 (1–2) (2000) 63–70.
- [30] L.L. Lam, C.P. Pau, S.C. Dollard, P.E. Pellett, T.J. Spira, Highly sensitive assay for human herpesvirus 8 antibodies that uses a multiple antigenic peptide derived from open reading frame K8.1, *J. Clin. Microbiol.* 40 (2) (2002) 325–329.
- [31] A. Ghirardello, L. Caponi, F. Franceschini, et al., Diagnostic tests for antiribosomal p protein antibodies: a comparative evaluation of immunoblotting and ELISA assays, *J. Autoimmun.* 19 (1–2) (2002) 71–77.
- [32] W.C. Chan, P.D. White, W.C. Chan, P.D. White (Eds.), *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, 2000.
- [33] J.M. Barrera, B. Francis, G. Ercilla, et al., Improved detection of anti-HCV in post-transfusion hepatitis by a third-generation ELISA, *Vox Sang.* 68 (1) (1995) 15–18.
- [34] S. Cavazza, M. Lagging, Indeterminate third-generation hepatitis C recombinant immunoblot assay and HCV RNA analysis: isolated reactivity against NS5 associated with HCV viraemia in clinical patients but not blood donors, *Scand. J. Infect. Dis.* 37 (6–7) (2005) 488–492.
- [35] S. Maylin, M. Martinot-Peignoux, M.P. Ripault, et al., Sustained virological response is associated with clearance of hepatitis C virus RNA and a decrease in hepatitis C virus antibody, *Liver Int.* 29 (4) (2009) 511–517.
- [36] H. Vaisocherova, V.M. Faca, A.D. Taylor, S. Hanash, S. Jiang, Comparative study of SPR and ELISA methods based on analysis of CD166/ALCAM levels in cancer and control human sera, *Biosens. Bioelectron.* 24 (7) (2009) 2143–2148.
- [37] J. Homola, Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species, *Chem. Rev.* 108 (2) (2008) 462–493.
- [38] M.J. Gomara, G. Ercilla, M.A. Alsina, I. Haro, Assessment of synthetic peptides for hepatitis A diagnosis using biosensor technology, *J. Immunol. Methods* 246 (1–2) (2000) 13–24.
- [39] C. Wittekindt, B. Fleckenstein, K. Wiesmuller, B.R. Eing, J.E. Kuhn, Detection of human serum antibodies against type-specifically reactive peptides from the N-terminus of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 and type 2 by surface plasmon resonance, *J. Virol. Methods* 87 (1–2) (2000) 133–144.
- [40] K.M. Wilson, C. Di Camillo, L. Doughty, E.M. Dax, Humoral immune response to primary rubella virus infection, *Clin. Vaccine Immunol.* 13 (3) (2006) 380–386.
- [41] H. Vaisocherova, K. Mrkvova, M. Piliarik, P. Jinoch, M. Steinbachova, J. Homola, Surface plasmon resonance biosensor for direct detection of antibody against Epstein-Barr virus, *Biosens. Bioelectron.* 22 (6) (2007) 1020–1026.
- [42] C. Ayela, F. Roquet, L. Valera, C. Granier, L. Nicu, M. Pugniere, Antibody-antigenic peptide interactions monitored by SPR and QCM-D. A model for SPR detection of IA-2 autoantibodies in human serum, *Biosens. Bioelectron.* 22 (12) (2007) 3113–3119.
- [43] C. Campagnolo, K.J. Meyers, T. Ryan, et al., Real-time, label-free monitoring of tumor antigen and serum antibody interactions, *J. Biochem. Biophys. Methods* 61 (3) (2004) 283–298.
- [44] C. Cao, J.P. Kim, B.W. Kim, et al., A strategy for sensitivity and specificity enhancements in prostate specific antigen-alpha1-antichymotrypsin detection based on surface plasmon resonance, *Biosens. Bioelectron.* 21 (11) (2006) 2106–2113.

Supplementary material

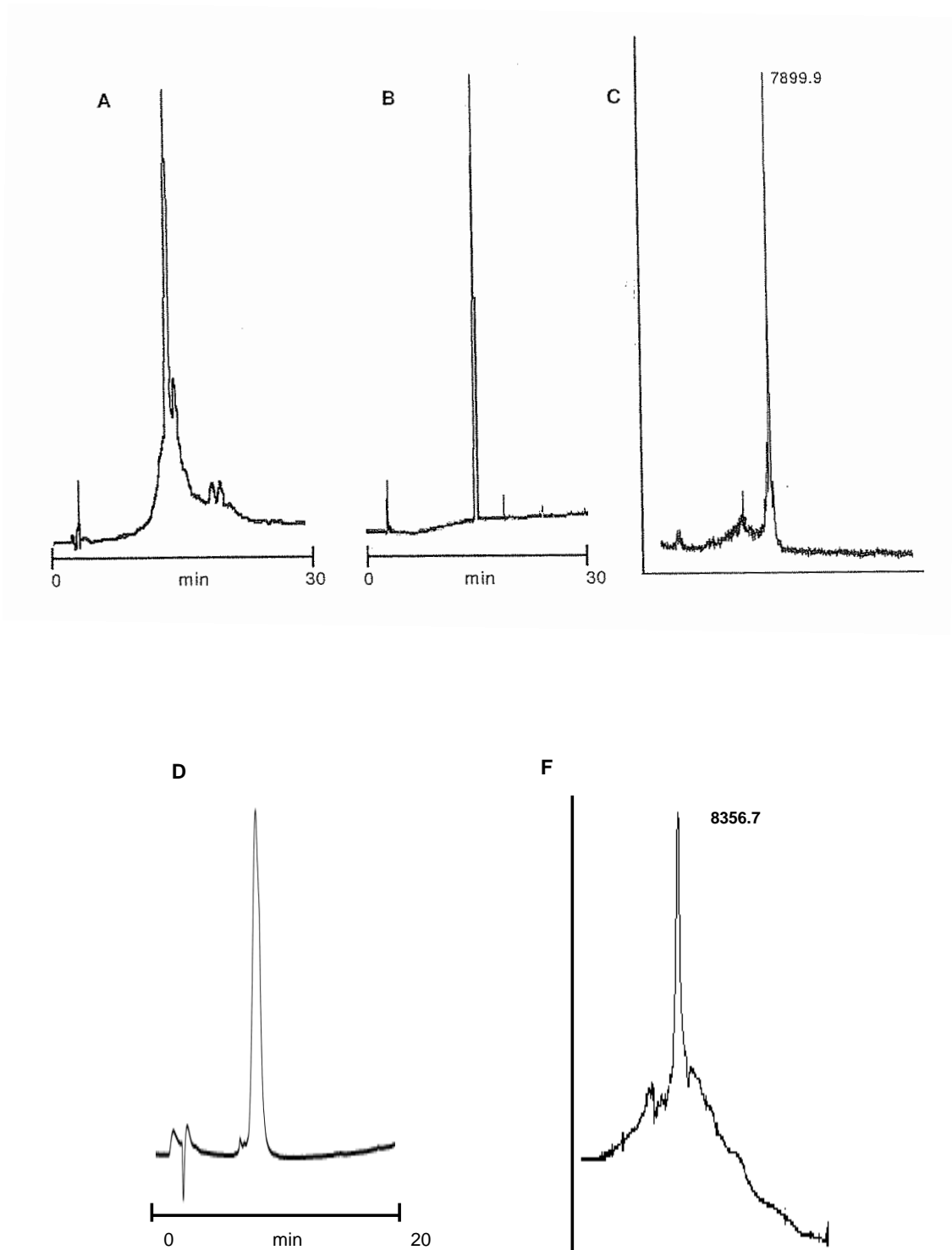


Figure 1. Characterization of MAP₄(E2-NS5a): A) HPLC chromatogram of crude peptide; B) HPLC chromatogram of purified peptide; C) MALDI-TOF MS analysis of purified peptide; and MAP₄(E2-NS4a): D) HPLC chromatogram of purified peptide and E) MALDI-TOF MS analysis of purified peptide

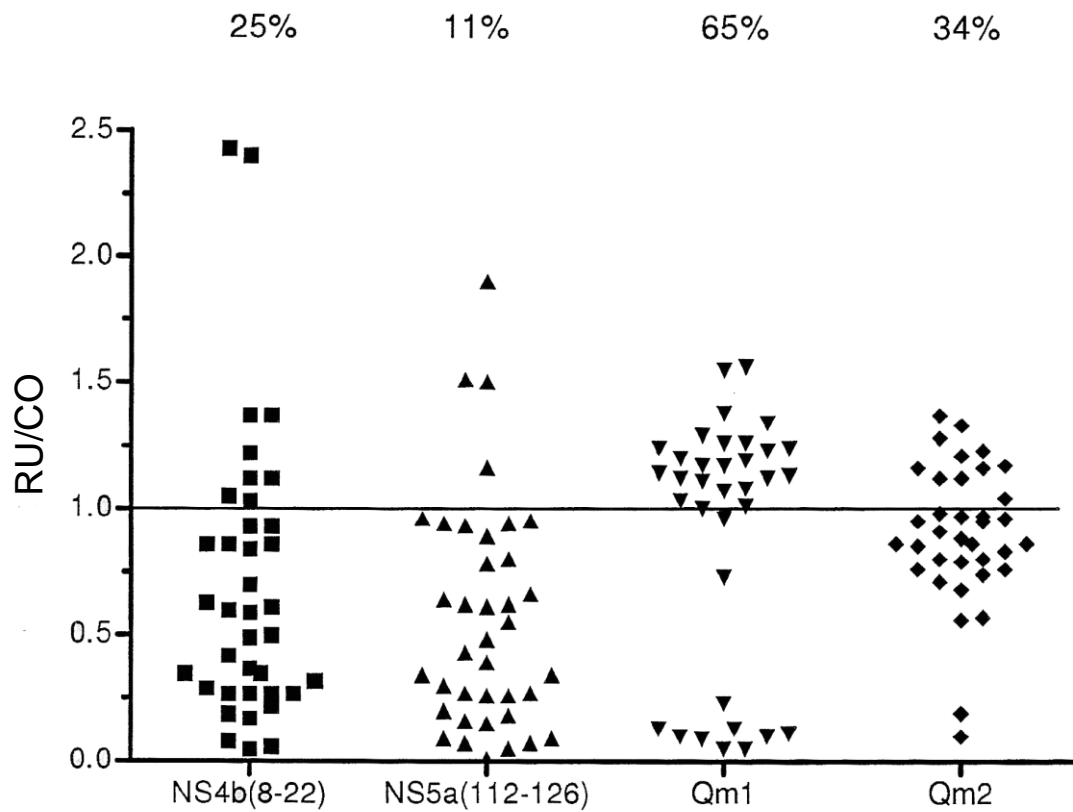


Figure 2. Reactivity of the synthetic linear monomeric and chimeric peptides with haemodialyzed patient sera using SPR methodology. The samples were considered anti-GBV-C antibodies positive when $RU/CO \geq 1$.

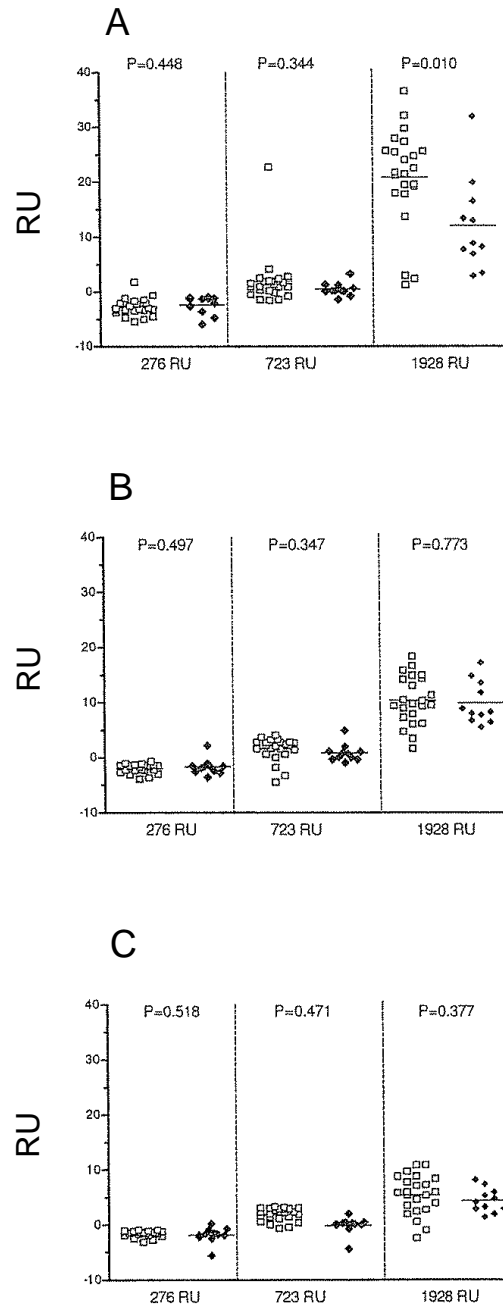


Figure 3. Reactivity of the MAP₄(E2-NS5a) peptide with chronic hepatitis patient sera using SPR methodology. A) dilution sera of 1/50; B) dilution sera of 1/100; C) dilution sera 1/200. White squares are chronic hepatitis patient sera and black diamonds are sera from blood donors.

Table 1. Reactivity (OD₄₉₂) of 4 healthy blood donor sera with 24 overlapped peptides that scan the (89-149) region of GBV-C E2 protein.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24
BD1	0,048	0,068	0,079	0,063	0,139	0,104	0,082	0,064	0,061	0,091	0,053	0,057	0,05	0,058	0,054	0,08	0,069	0,204	0,41	0,28	0,278	0,273	0,266	0,159
BD2	0,082	0,111	0,096	0,099	0,05	0,116	0,099	0,1	0,106	0,165	0,064	0,061	0,071	0,07	0,092	0,085	0,122	0,35	0,299	0,23	0,288	0,287	0,182	0,199
BD3	0,115	0,159	0,172	0,134	0,078	0,13	0,125	0,15	0,107	0,098	0,098	0,085	0,077	0,093	0,142	0,112	0,135	0,45	0,325	0,117	0,123	0,127	0,11	0,191
BD4	0,091	0,128	0,113	0,105	0,95	0,118	0,153	0,144	0,152	0,097	0,089	0,048	0,103	0,102	0,11	0,107	0,123	0,15	0,12	0,107	0,111	0,117	0,196	0,188

Diagnostic Value of Anti-GBV-C Antibodies in HIV-Infected Patients

Maria J. Gómará¹, Leticia Fernández¹,
Teresa Pérez¹, Solveig Tenckhoff²,
Aurora Casanovas³, Hans L. Tillmann^{2,4}
and Isabel Haro^{1,*}

¹Unit of Synthesis and Biomedical Applications of Peptides IQAC-CSIC, Jordi Girona 18–26, 08034 Barcelona, Spain

²Faculty of Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany

³Department of Microbiology, Hospital Universitari de Bellvitge, IDIBELL, L' Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

⁴Division of Gastroenterology, GI/Hepatology Research Program, Duke Clinical Research Institute, Duke University, Durham, NC, USA

*Corresponding author: Isabel Haro, isabel.haro@iqac.csic.es

The beneficial effect of co-infection by GB virus C (GBV-C) in the course of the disease in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients has been described, although its mechanism of action is yet to be determined. The role of anti-GBV-C antibodies in HIV-infected patients also remains unknown. At present, there are no commercial systems to detect specific markers of GBV-C infection. The research presented follows our previous work from which we obtained chimeric molecules formed by two domains of different GBV-C proteins with good sensitivity/specificity balances in the detection of anti-GBV-C antibodies in hemodialyzed and chronic hepatitis patient samples. It has been investigated the ability of the synthetic peptides to recognize specific anti-GBV-C antibodies in HIV and HCV/HIV co-infected patients by a peptide-based ELISA immunoassay. The results showed that human immunodeficiency virus-infected patients have a significantly higher frequency of anti-GBV-C antibodies than healthy controls. A comparison between HCV⁺/HIV⁺ and HCV⁻/HIV⁺ was analyzed. Although a higher percentage of HCV/HIV-positive sera were positive for antibodies against GBV-C peptides, the difference was not significant. The presence of anti-GBV-C antibodies could represent a good marker of exposure to GBV-C in HIV-infected patients to facilitate a further analysis of the effect of this exposure in the progression of illness caused by HIV infection.

Key words: GB virus C, hepatitis C virus, human immunodeficiency virus, human immunodeficiency virus diagnosis, immunoassays, peptides

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; AUC, area under the curve; BSA, bovine serum albumin; CI, confidence interval; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; GBV-C, GB virus C; HAART, highly active antiretroviral therapy; HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; HPLC, high-performance liquid chromatography; LP, linear peptide; MAP, multiple antigenic peptide; ODU, optic density units; OR, odds ratio; PBS, phosphate-buffered saline; ROC, receiver operating characteristic.

Received 13 July 2010, revised 4 January 2011 and accepted for publication 23 April 2011

GB virus C (GBV-C) was the third in a set of viruses identified in a search for new human hepatitis viruses (1). Another isolate of the same virus has also been named hepatitis G virus (2). While GBV-A and GBV-B have not been identified in humans, GBV-C is a human-tropic virus and is the close relative of hepatitis C virus in humans (3). However, while GBV-C could not be associated with any harmful effect in humans, there is a strong evidence for GBV-Cs association with ameliorated course of human immunodeficiency virus (HIV) disease (4).

Antibodies against the E2 region of GBV-C were demonstrated to prevent from GBV-C viraemia and indicate past infection (5,6). Although the evidence that these antibodies prevent viraemia is not clear, an association with decreased transmission has been reported (7,8). While the role of GBV-C viraemia has been studied more widely, the significance of antibodies against GBV-C E2 protein beyond its role in preventing GBV-C viraemia is currently unknown. One study suggested an ameliorated course of HIV infection in GBV-C E2 antibody-positive patients (9).

There are currently no commercial systems to detect specific markers of GBV-C infection. The basic marker used to diagnose active GBV-C viraemia is the RNA, which is detected using RT-PCR (10). Moreover, an enzyme-linked immunosorbent assay trial has been developed to detect anti-GBV-C antibodies by using the recombinant E2 protein of the viral envelope as an antigen (11,12). However, the presence of false negatives in some cases, low sensitivity in others, and diagnostic errors associated with the variability of these assays recommend the use of more than one of E2 protein regions to unmistakably detect GBV-C infection.

Thus, as none of the earlier assays are currently available, there is a need to develop new assays. In addition, it would be good

to be able to evaluate the relevance of antibodies directed against different GBV-C proteins. Therefore, peptides related to GBV-C envelope and non-structural proteins were designed and synthesized to establish ELISA assays in our group, as described previously (13). One concept to keep in mind is that data published so far basically focus on GBV-C RNA for proving infection and anti-GBV-C E2 associated with clearance of GBV-C (5), while in most infections, antibodies are detectable not only after clearance but also during infection, i.e., in hepatitis B, the anti-HBs occurs in case of viral clearance, while anti-HBc is present in both persistent and cleared infection (14). In hepatitis C virus (HCV) infection, antibodies against various non-structural and structural proteins do occur within weeks after infection and are not related to viral clearance (15).

In this work, we investigate the ability of the synthetic peptides to recognize anti-GBV-C antibodies in HIV and HCV/HIV co-infected patients to provide better understanding of the effect of exposure to GBV-C in the progression of illness caused by HIV infection as well as the putative role as a prognostic marker in the context of other viral infections.

Materials and Methods

Peptides

The synthesis of the linear and branched peptides was accomplished by Fmoc-based solid phase methodologies and has been previously published (16–20). The purity of the samples after high-performance liquid chromatography (HPLC) purification was checked by analytical HPLC and was found to be higher than 95% in all cases. The primary sequence and analytical characterization of the peptides are shown in Table 1.

Serum specimens

Four different panels of serum samples were analyzed:

The first group consisted of 95 sera from HIV-infected patients who attended outpatient clinic from Medizinische Hochschule Hannover, in Hannover, Germany and tested positive for GBV-C anti-E2 antibodies (Abbott test) and negative for GBV-C RNA (9).

The second group consisted of 164 sera from HIV-infected patients from the Hospital of Bellvitge of Barcelona. Seventy-seven samples of this panel were screened for HCV infection (anti-HCV Abbott AxSYM test).

The third one corresponded to 88 sera from the same patients of the second group but collected after the initiation of HAART therapy.

The fourth panel consisted of 143 control sera from volunteer blood donors from two different Hospitals of Barcelona (Hospital of Bellvitge and Hospital Clinic).

This study was approved by the Ethics Committee of the Hospitals.

ELISA

Peptides were coupled to assay plates (DNABind N-oxysuccinimide surface; Corning Incorporated, Corning, NY, USA) at 1 μg per well. Coupling was performed overnight at room temperature at pH 9.6 (0.05 M carbonate/bicarbonate buffer).

Each plate contained control wells that included all reagents except the serum sample to estimate the background reading and control wells that included all reagents except the peptide to evaluate non-specific reactions of sera. For blank controls, wells were coupled with 2 μg of bovine serum albumin (BSA)/well. After incubation, the plates were blocked with 2% BSA in 0.05 M carbonate/bicarbonate (pH 9.6) buffer for 1 h at room temperature. Sera were diluted 50-fold in RIA buffer (1% BSA, 350 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1% v/v Triton-X-100, 0.5 wt %/v sodium deoxycholate, and 0.1% sodium dodecyl sulfate) supplemented with 10% fetal bovine serum. An amount of 100 μL /well was added, and the mixture was incubated for 1.5 h at room temperature. After the mixture was washed six times with phosphate-buffered saline (PBS)/0.05% Tween-20, 100 μL /well of antihuman IgG conjugated to peroxidase diluted 1:1000 in RIA buffer was added. After incubation for 1 h at room temperature, the plates were washed six times with PBS/0.05% Tween-20 and bound antibodies were detected with *o*-phenylenediamine dihydrochloride (OPD; Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA) and 8 μL /10 mL of 30% hydrogen

Table 1: GB virus C (GBV-C) synthetic peptide characterization

Peptide	Primary sequence	HPLC (k') ^a	[M] ⁺ _{exp}
E1(3–17)	APATHACRANGQYFL	3.4 ⁱ	1619.8 ^b
E2(7–26)	GSRPFEPGLTWQTCSCRANG	5.2 ⁱⁱ	2152.8 ^c
E2(125–139)	CTIAALGSSDRDVT	3.5 ⁱⁱⁱ	1507.4 ^b
E2(279–298)	AGLTGGFYEPVRRCSKLMG	3.9 ⁱ	2093.2 ^b
NS3(440–460)	AIAYYRGKDSIIKDGDLVVC	7 ^{iv}	2286.4 ^b
NS4b(8–22)	GESAPSDAKTVTDAVD	2.5 ⁱⁱ	1562.6 ^b
MAP ₄ [E2(99–118)-NS5a(112–126)]	(VSWFASTGGRDSKIDVWVSLV) ₂ (GTSGWAEVVVTPTHV) ₂ (K) ₂ K β A	6.5 ⁱ	7899.9 ^c

^aKromasil C18 column (5 μm , 25 \times 0.46). Eluents: (A) 0.05% TFA in water; (B) 0.05% TFA in acetonitrile. Flow rate 1 mL/min, detection at 215 and 280 nm. Gradient elution: ⁱ95% (A) to 5% (A) in 30 min; ⁱⁱ85% (A) to 65% (A) in 30 min; ⁱⁱⁱ75% (A) to 55% (A) in 30 min; and ^{iv}50% (A) to 5% (A) in 30 min.

^bExperimental mass obtained by electrospray mass spectrometry.

^cExperimental mass obtained by MALDI-TOF mass spectrometry.

peroxide. The plates were incubated at room temperature for 30 min. The reaction was stopped with 50 μ L of 2 N H₂SO₄ per well, and absorbance values were measured at a wavelength of 492 nm. All sera were tested in duplicate. Control sera were also included to monitor inter- and intra-assay variations. Moreover, each plate contained control wells coated with an irrelevant peptide for GBV-C (mellitin, a 26-mer peptide that constitutes the principal active component of bee venom) to control the specificity of the GBV-C peptides–serum interaction.

Receiver operating characteristic analysis was performed using MedCalc version 7.6 (MedCalc Software, Mariakerte, Belgium).

Results and Discussion

Selection of peptides for diagnosing GBV-C infection in HIV-infected patients

Previous work of our group has demonstrated the usefulness of synthetic peptides from envelope and non-structural GBV-C proteins for the serodiagnosis of this infection among hemodialyzed and chronic hepatitis C-infected patients (13). The epitope peptides were identified by computer-aided prediction of antigenicity, and they were mainly located in hydrophilic, accessible and β -turn regions of GBV-C proteins (20).

In an attempt to apply GBV-C derived peptides for the diagnosis of GBV-C in HIV co-infected patients, a serological screening using linear peptides from different GBV-C proteins (E1, E2, NS3, NS4b, and NS5a) as well as a multiple antigenic peptide (MAP), which provides scaffolding for close packing of E2(99–118) and NS5(112–126) peptide antigens permitting the stabilization of the secondary structure and reverse turns (Figure 1), was carried out using a panel of eighteen sera: six serum samples tested positive and six tested negative for the commercial E2 recombinant protein-based test and six control sera from volunteer blood donors.

The immunoreactive patterns of the peptides tested indicated that some of them, such as E2(125–139), showed randomly distributed reactivities, while the absorbance values for NS3(440–460), E1(3–17), E2(279–298), and NS4b(8–22) peptides were low (data not shown). Figure 2 shows the serological profile of peptides E2(7–26)

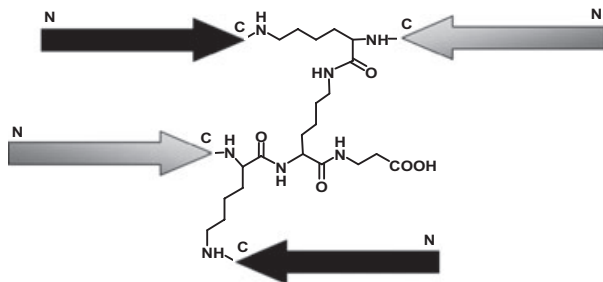


Figure 1: Structure of a tetrameric and heterogeneous Multiple Antigenic Peptide (MAP) black arrow: NS5a(112–126); GTSGWAEVWVTPHV grey arrow: E2(99–118); VSWFASTGGRDS-KIDVWSLV.

and MAP₄[E2(99–118)-NS5a(112–126)] by direct binding ELISA. These peptides showed a significant reactivity with the anti-E2-positive sera, while lower response was observed with anti-E2-negative and blood donors. Taking into account these preliminary results, E2(7–26) (linear peptide, LP1_{E2}) and MAP₄[E2(99–118)-NS5a(112–126)] (multiple antigenic peptide, MAP_{E2/NS5}) peptides were chosen to carry out the antigenicity study with the whole panels of HIV-infected patients sera.

We assessed the serological reactivity of the 95-sera panel from HIV-infected patients that were tested positive for GBV-C anti-E2 protein antibodies by the Abbott test, using LP1_{E2} and MAP_{E2/NS5} peptides. Moreover, a panel of 97 sera from blood donors was used as negative controls. Figure 3 shows the results obtained when performing the comparative ROC curve analysis of the two peptides. We could observe a higher area under the curve (AUC) value for the MAP_{E2/NS5} (0.976) compared with the LP1_{E2} peptide (0.708). Cutoff values for each ELISA test calculated according to this ROC curve analysis were 0.295 optic density units (ODUs) for MAP_{E2/NS5} and 0.357 ODU for LP1_{E2}. These cutoff values corresponded to 94.8% specificity.

To assess the risk for GBV-C infection, odds ratios (ORs) with 95% CIs were calculated for the presence of anti-LP1_{E2} and anti-MAP_{E2/NS5} antibodies in the panel of HIV-infected patients with unknown GBV-C/HIV co-infection (164 serum samples). The association was tested with Fisher's exact test.

As shown in Table 2, the presence of antibodies anti-LP1_{E2} and anti-MAP_{E2/NS5} in this panel of HIV-infected patients was

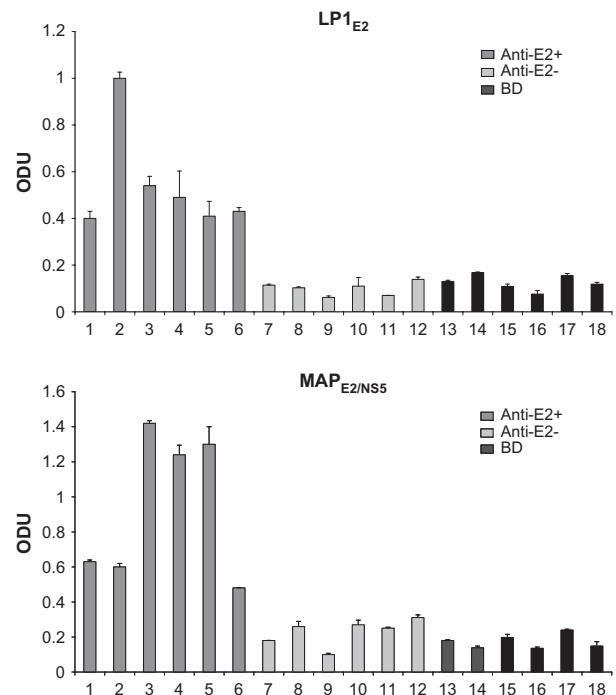


Figure 2: Serological profile of E2(7–26) (LP1_{E2}) and MAP₄[E2(99–118)-NS5a(112–126)] (MAP_{E2/NS5}).

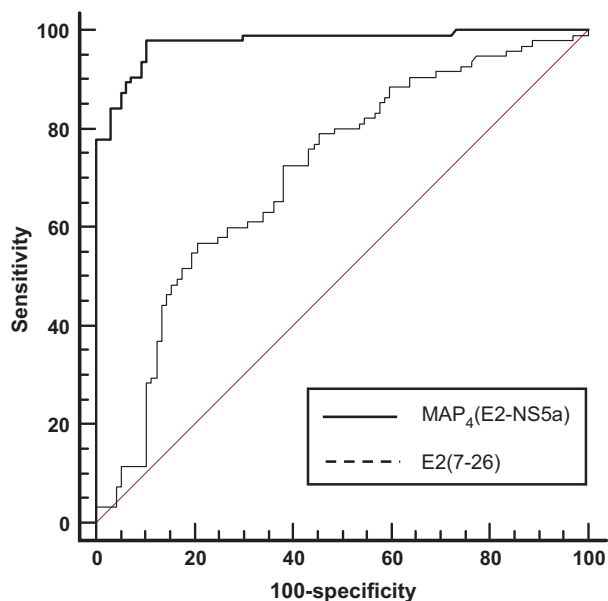


Figure 3: Receiver operating characteristic curves analysis for LP1_{E2} and MAP₄_{E2/NS5} reactivity in the cohort of patients with Human immunodeficiency virus (HIV; GBV-C E2 protein positive) or blood donors. Sensitivity and specificity was calculated for all potential cut-off values ($n = 95$ HIV patients, $n = 97$ blood donors).

Table 2: Association between anti-GBV-C synthetic peptide antibodies and human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients

Presence of antibodies	HIV-infected		OR (95% CI)	p-value
	patients $n = 164$	Controls $n = 143$		
Anti-LP1 _{E2}	79	6	21.22 (8.86–50.81)	<0.0001
Anti-MAP ₄ _{E2/NS5}	30	6	5.11 (2.06–12.68)	0.0004

Anti-LP1_{E2}, antibody against linear epitope E2(7–26), Anti-MAP₄_{E2/NS5}, antibody against a multi-antigen MAP₄[E2(99–118)-NS5a(112–126)].

significantly associated with HIV infection (OR: 21.22, $p < 0.0001$ and OR: 5.11 $p = 0.0004$, respectively), indicating that HIV-infected patients have a significantly higher frequency of anti-GBV-C peptide antibodies than healthy controls.

Peptide reactivity for diagnosing GBV-C in HCV/HIV co-infected patients

Recently, Berzsényi *et al.* (21) provided evidence of a significant reduction in HCV-related liver morbidity associated with GBV-C viraemia in HCV/HIV co-infected patients. In this sense, they pointed out that GBV-C infection may contribute to the unpredictable clinical outcomes in HCV/HIV co-infected patients and could have a role as a prognostic marker in this setting. It has also been described that HCV/HIV co-infected patients with active GBV-C replication had a lesser degree of histological lesions and lower HCV viral loads when compared with HCV/HIV-infected patients. Nevertheless, no differ-

Table 3: Effect of hepatitis C virus/human immunodeficiency virus (HCV/HIV) co-infection on the presence of anti-GBV-C synthetic peptide antibodies

Presence of antibodies	HCV ⁺ /HIV ⁺ $n = 25$	HCV ⁻ /HIV ⁺ $n = 52$	OR (95% CI)	p-value
Anti-LP1 _{E2}	17	27	1.97 (0.72–5.35)	0.185
Anti-MAP ₄ _{E2/NS5}	8	9	2.25 (0.74–6.79)	0.151

Anti-LP1_{E2}, antibody against linear epitope E2(7–26); Anti-MAP₄_{E2/NS5}, antibody against a multi-antigen MAP₄[E2(99–118)-NS5a(112–126)].

ences regarding biochemical markers, such as aspartate amino transferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), and γ -glutamyl transferase, were observed among HIV/HCV and triple HCV/GBV-C/HIV co-infected patients (22,23).

In an attempt to establish if the relationship between HCV and GBV-C infections in HIV-infected patients do correlate, the presence of anti-LP1_{E2} and anti-MAP₄_{E2/NS5} antibodies was studied by direct binding ELISA in HCV/HIV co-infected patients. To this purpose, 77 sera from the panel composed 164 sera of HIV-infected patients were screened for the HCV. Fifty-two were determined HCV-RNA or anti-HCV negative and 25 were determined HCV-RNA or anti-HCV positive using a commercial HCV test.

Table 3 shows the number of sera tested as positive for GBV-C peptides depending on the presence or absence of HCV infection. The reactivity of each peptide construct with both positive and negative HCV panels of sera was compared, and odds ratios were calculated and tested the association. Although a higher percentage of HCV-positive/HIV-positive sera were positive for antibodies against GBV-C peptides (68% and 32% for LP1_{E2} and MAP₄_{E2/NS5} versus 52% and 17%, respectively, Table 3), the difference was not significant.

Reactivity of GBV-C peptides in HIV-infected patients depending on HAART therapy

As reported by Tillman *et al.* (24), GBV-C viral load increased in patients who started highly active antiretroviral therapy (HAART). The presence of GBV-C RNA remained predictive of longer survival. Moreover, Rodríguez *et al.* (25) demonstrated that patients with concurrent GBV-C and HIV infection exhibit a better response to HAART as indicated by higher complete virological response rates. However, not all studies found a difference in response to HAART depending on GBV-C viraemia status (26). Nevertheless, no studies have addressed the role of GBV-C antibodies has on pre- and post-HAART in the setting of HIV co-infection.

In this work, serum levels of the antibodies against LP1_{E2} and MAP₄_{E2/NS5} peptides were measured in 88 HIV-infected patients at baseline and receiving HAART therapy. Antipeptides antibodies did not remain stable in most patients during the follow-up, because more than half of the serum samples scored as positive at baseline were in general declined and converted to negative at HAART (59% and 60% for MAP₄_{E2/NS5} and LP1_{E2}, respectively). Moreover, a percentage ranging 7–18% of serum samples scored as negative at

Table 4: Relation between human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients in highly active antiretroviral therapy (HAART) treatment and the presence of anti-GBV-C synthetic peptide antibodies

Presence of antibodies	HIV baseline <i>n</i> = 88	HIV HAART <i>n</i> = 88	OR (95% CI)	<i>p</i> -value
Anti-LP1 _{E2}	50	27	2.97 (1.60–5.52)	0.0006
Anti-MAP _{E2/NS5}	17	12	1.52 (0.68–3.40)	0.312

Anti-LP1_{E2}, antibody against linear epitope E2(7–26); Anti-MAP_{E2/NS5}, antibody against a multi-antigen MAP₄[E2(99–118)-NS5a(112–126)]

baseline were converted to positive at HAART. When the presence of anti-GBV-C peptides antibodies in HIV-infected patients was compared at baseline and receiving HAART therapy (Table 4), a trend was found toward association between anti-LP1_{E2} antibodies (OR: 2.97, *p* = 0.0006) and HAART treatment, whereas anti-MAP_{E2/NS5} antibodies did not correlate (*p* = 0.312). These results could suggest that anti-LP1_{E2} antibodies are associated with HIV disease outcome.

Conclusions and Future Directions

Our results demonstrate that reactivity against GBV-C synthetic peptides is strongly associated with HIV infection. Contrarily, no significant differences were seen in the number of positive sera against GBV-C peptides between HIV-infected patients with positive or negative HCV co-infection. Based on our results, we propose that the presence of these antibodies could represent a good marker of exposure to GBV-C in HIV-infected patients to facilitate a further analysis of the effect of this exposure in the progression of illness caused by HIV infection.

Acknowledgments

This work was funded by Grants CTQ2009-13969-CO2-01/BQU from the Ministerio de Ciencia e Innovación and PIE-I3(2008801081) from Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Spain. LF is a recipient of a FPI grant from the Ministerio de Ciencia, Spain. Authors declare no conflicts of interest.

References

- Leary T.P., Muerhoff A.S., Simons J.N., Pilot-Matias T.J., Erker J.C., Chalmers M.L., Schlander G.G., Dawson G.J., Desai S.M., Mushahwar I.K. (1996) Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the flaviviridae associated with human Non-A-E hepatitis. *J Med Virol*;48:60–67.
- Linnen J., Wages J. Jr, Zhang-Keck Z.Y., Fry K.E., Krawczynski K.Z., Alter H., Koonin E. *et al.* (1996) Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science*;271:505–508.
- Kaiser T., Tillmann H.L. (2005) GB virus C infection: is there a clinical relevance for patients infected with the human immunodeficiency virus? *AIDS Rev*;7:3–12.
- Shankar E.M., Solomon S.S., Vignesh R., Murugavel K.G., Sundaram M., Solomon S., Balakrishnan P., Kumarasamy N. (2008) GB virus infection: a silent anti-HIV panacea within? *Trans R Soc Trop Med Hyg*;102:1176–1180.
- Tacke M., Schmolke S., Schlueter V., Sauleda S., Esteban J.I., Tanaka E., Kiyosawa K., Alter H.J., Schmitt U., Hess G., Ofenloch-Haehnte B., Engel A.M. (1997) Humoral immune response to the E2 protein of hepatitis G virus is associated with long-term recovery from infection and reveals a high frequency of hepatitis G virus exposure among healthy blood donors. *Hepatology*;26:1626–1633.
- Tanaka E., Kiyosawa K., Shimoda K., Hino K., Tacke M., Schmolke S., Engel A.M., Hess G. (1998) Evolution of hepatitis G virus infection and antibody response to envelope protein in patients with transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. *J Viral Hepat*;5:153–159.
- Silini E., Belli L., Alberti A.B., Asti M., Cerino A., Bissolati M., Rondinara G., De Carlis L., Forti D., Mondelli M.U., Ideo G. (1998) HGV/GBV-C infection in liver transplant recipients: antibodies to the viral E2 envelope glycoprotein protect from de novo infection. *J Hepatol*;29:533–540.
- Tillmann H.L., Heringlake S., Trautwein C., Meissner D., Nashan B., Schlitt H.J., Kratochvil J., Hunt J., Qiu X., Lou S.C., Pichuiayr R., Manns M.P. (1998) Antibodies against the GB virus C envelope 2 protein before liver transplantation protect against GB virus C de novo infection. *Hepatology*;28:379–384.
- Tillmann H.L., Heiken H., Knapik-Botor A., Heringlake S., Ockenga J., Wilber J.C., Goergen B., Detmer J., Mc Morrow M., Stoll M., Schmidt R.E., Manns M.P. (2001) Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N Eng J Med*;345:715–724.
- Kao J.H., Chen P.J., Chen W., Hsiang S.C., Lai M.Y., Chen D.S. (1997) Amplification of GB virus-C hepatitis G virus RNA with primers from different regions of the viral genome. *J Med Virol*;51:284–289.
- Pilot-Matias T.J., Carrick R.J., Coleman P.F., Leary T.P., Surowy T.K., Simons J.N., Muerhoff A.S., Buijk S.L., Chalmers M.L., Dawson G.J., Desai S.M., Mushahwar I.K. (1996) Expression of the GB virus C E2 glycoprotein using the Semliki Forest virus vector system and its utility as a serologic marker. *Virology*;225:282–292.
- Tacke M., Kiyosawa K., Stark K., Schlueter V., Ofenloch-Haehnte B., Hess G., Engel A.M. (1997) Detection of antibodies to a putative hepatitis G virus envelope protein. *Lancet*;349:318–320.
- Gomara M.J., Fernandez L., Perez T., Ercilla G., Haro I. (2010) Assessment of synthetic chimeric multiple antigenic peptides for diagnosis of GB virus C infection. *Anal Biochem*;396:51–58.
- Huang C.F., Lin S.S., Ho Y.C., Chen F.L., Yang C.C. (2006) The immune response induced by hepatitis B virus principal antigens. *Cell Mol Immunol*;3:97–106.
- Gretch D.R. (1997) Use and interpretation of HCV diagnostic tests in the clinical setting. *Clin Liver Dis*;1:543–557.
- Fontvila O., Mestres C., Muñoz M., Haro I., Alsina M.A., Pujol M. (2008) Surface behaviour and peptide-lipid interactions of the E1(3-17)R and E1(3-17)G peptides from E1 capsid protein of GBV-C/HGV virus. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*;321:175–180.

17. Larios C., Busquets M.A., Carilla J., Alsina M.A., Haro I. (2004) Effects of overlapping GB virus C/Hepatitis G virus synthetic peptides on biomembrane models. *Langmuir*;20:11149–11160.
18. Larios C., Christiaens B., Gomara M.J., Alsina M.A., Haro I. (2005) Interaction of synthetic peptides corresponding to hepatitis G virus (HGV/GBV-C) E2 structural protein with phospholipid vesicles. *FEBS J*;272:2456–2466.
19. Rojo N., Ercilla G., Haro I. (2003) GB virus C (GBV-C) hepatitis G virus (HGV): towards the design of synthetic peptides-based biosensors for immunodiagnosis of GBV-C/HGV infection. *Curr Protein Pept Sci*;4:291–298.
20. Perez T., Ercilla G., Chan W.C., Haro I. (2006) Antigenicity of chimeric and cyclic synthetic peptides based on nonstructural proteins of GBV-C/HGV. *J Pept Sci*;12:267–278.
21. Berzsényi M.D., Bowden D.S., Kelly H.A., Watson K.M., Mijch A.M., Hammond R.A., Crowe S.M., Roberts S.K. (2007) Reduction in hepatitis C-related liver disease associated with GB virus C in human immunodeficiency virus coinfection. *Gastroenterology*;133:1821–1830.
22. Baggio-Zappia G.L., Hernandez Granato C.F. (2009) HIV-GB virus C co-infection: an overview. *Clin Chem Lab Med*;47:12–19.
23. Barbosa A.D.J., Baggio-Zappia G.L., Dobo C., Alves-Sousa V.K., Lanzara G.D.A., Da Silva I.D.C.G., Lanzoni V.P., Granato C.F.H. (2009) Analysis of GB virus C infection among HIV-HCV coinfecting patients. *Rev Soc Bras Med Trop*;42:591–593.
24. Tillmann H.L., Manns M.P. (2001) GB virus-C infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Antiviral Res*;52:83–90.
25. Rodriguez B., Woolley I., Lederman M.M., Zdunek D., Hess G., Valdez H. (2003) Effect of GB virus C coinfection on response to antiretroviral treatment in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis*;187:504–507.
26. Tillmann H.L., Kaiser T., Fox Z., Staszewski S., Antunes F., Monforte A.D., Vemazza P., Hill A., Dragsted U.B., Lundgren J.D. (2005) Impact of coinfection with HIV-1 and GB Virus C in patients receiving a ritonavir-boosted HAART regimen: a sub-study to the MaxCmin1 trial [2]. *J Acquir Immune Defic Syndr*;40:378–380.



Synthetic peptides derived from an N-terminal domain of the E2 protein of GB virus C in the study of GBV-C/HIV-1 co-infection

Leticia Fernández,^a Weng C. Chan,^b Meritxell Egido,^a María J. Gómara^{a*} and Isabel Haro^{a*}

Synthetic peptides derived from GB virus C (GBV-C) have previously been studied in our group for the development of new systems capable of diagnosing diseases caused by this humanotropic virus. We also recently described specific peptide domains of the E2 envelop protein of GBV-C that have the capacity to interfere with the HIV-1 fusion peptide, produce a notable decrease in cellular membrane fusion, and perturb HIV-1 infectivity in a dose-dependent manner.

The present work discloses the design and synthesis of both linear and cyclic branched peptides based on a previously reported N-terminal sequence of the GBV-C E2 protein. Immunoassays and cell–cell fusion assays were performed to evaluate their diagnostic value to detect anti-GBV-C antibodies in HIV-1 patients, as well as their putative anti-HIV-1 activity as entry inhibitors.

Our results showed that chemical modifications of the selected E2(7–26) linear peptide to afford cyclic architecture do not result in an enhanced inhibition of gp41 HIV-1-mediated cell–cell fusion nor improved sensitivity in the detection of GBV-C antibodies in HIV-1 co-infected patients. Thus, the ELISA data reinforce the potential utility of linear versions of the E2(7–26) region for the development of new peptide-based immunosensor devices for the detection of anti-GBV-C antibodies in HIV-1 co-infected patients. Copyright © 2012 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

Supporting information may be found in the online version of this article.

Keywords: GB virus C; E2 protein; peptide synthesis; multiple antigenic peptide; immunoassays; cell–cell fusion assay

Introduction

The recent development of improved synthetic, purification, and analytical methodologies have led to the broad application of MAPs in biomedical research. Among others, Tam and colleagues pioneered the design of branched peptide constructs based on polylysine scaffolds, and the group has extensively reported various synthetic methodologies to MAPs [1].

Although different types of branched peptide macromolecules have been reported, the constrained peptide dendrimers have been particularly investigated in an effort to generate molecules that closely mimic native protein conformations. The structure-stabilized cyclic peptides, which are predicted to adopt conformational features of the original antigenic sites of the native protein, can be presented in a branched scaffold. In fact, various constrained cyclic peptide dendrimers have been synthesized and investigated for their biological activities. For example, solid-phase and solution synthetic strategies were utilized to prepare a multivalent lipopeptide dendrimer containing four copies of the disulfide-mediated cyclic epitopes of foot and mouth disease virus [2]. Furthermore, different chemical approaches were applied for the presentation of cyclic RGD peptides on dendrimeric scaffolds as potential tools for tumor targeting. Thus, cyclic RGD peptides were synthesized by solid-phase strategy followed by chemoselective oxime ligation [3] to afford multimeric constructs. Similar dendrimeric constructs in which the cyclic RGD peptides were appended by Cu(I)-catalyzed 'click' chemistry have also been reported [4,5].

As indicated in the preceding examples, the preparation of the cyclic peptide dendrimers is synthetically challenging because direct synthesis of cyclic peptide on a branched scaffold is complicated by competing interchain and intrachain cyclization. In a branched MAP, these competing reactions could not be minimized by using high dilution. Moreover, the convergent assembly of a preformed cyclic peptide to a MAP core has the limitation of the insolubility of the protected precursors. Consequently, alternative approaches have been developed that exploit the conjugation of unprotected precursors to appropriately functionalized dendrimeric scaffolds [6]. One of these approaches entailed the formation of cyclic peptides by a modified native chemical ligation strategy introduced by Kent [7], which is based on an intramolecular *S,N*-acyl transfer resulting in the formation of a peptide bond at the ligation site. The cyclic peptide with a Cys residue at the cyclo-ligation site was then used to functionalize a pre-prepared branched MAP sub-unit. Here, chemoselective functionalization was achieved

* Correspondence to: Isabel Haro, Jordi Girona, Unit of Synthesis and Biomedical Applications of Peptides IQAC-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain. E-mail: isabel.haro@iqac.csic.es

^a Unit of Synthesis and Biomedical Applications of Peptides IQAC-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

^b School of Pharmacy, Centre for Biomolecular Sciences, University of Nottingham, University Park, Nottingham NG7 2RD, UK

using the unique chemistry of the Cys sulfhydryl side chain and an appropriately modified branched MAP sub-unit. Hence, fully functional MAPs were obtained upon the conjugation of pre-synthesized cyclic peptide monomers to functionalized branched sub-units [8].

Over the past two decades, many applications of MAPs in different research fields, such as molecular biology, immunology, biochemistry, and therapeutic research, have been described [9]. In particular, the usefulness of MAPs as immunoassay reagents for serodiagnosis [10], radiolabeled molecules for imaging diagnosis [11], immunostimulatory reagents for antibody production in vaccines [12], and therapeutic agents [13,14] has been extensively reported.

In our group, synthetic peptides derived from both the structural and non-structural proteins of GB virus C (GBV-C; also known as hepatitis G virus) have been studied for the development of new systems to diagnose infections caused by the virus. We have investigated the ability of the synthetic peptides to recognize anti-GBV-C antibodies in HIV-1 and HCV/HIV-1 co-infected patients in order to secure a better understanding of the effect of exposure to GBV-C on the progression of illness caused by HIV-1 infection, as well as the putative role as a prognostic marker in the context of other viral infections. The usefulness of synthetic tetrameric branched peptides containing sequences from both envelope and non-structural GBV-C proteins for the diagnosis of GBV-C infection has been reported, demonstrating the potential clinical value of these heterogeneous branched molecules to perform prevalence studies of the infections among the hemodialyzed HCV-infected and HIV-1-infected population [15,16]. The presence of antibodies against chimeric branched peptides formed by two domains of different GBV-C proteins could represent a good biomarker of exposure to GBV-C in HIV-1 patients.

On the other hand, dendrimers can act as polyvalent viral inhibitors by presenting multiple contact sites on a single molecule, which could efficiently prevent or disrupt the molecular interactions that mediate the entry of viruses into host cells [14]. In this context, the design of powerful HIV-1 entry inhibitors through the multimerization of D-peptides containing a disulfide bridge has been described [17].

We have also previously identified an N-terminal portion of the E2 protein of GBV-C that is most likely exposed on the virion surface by means of biophysical studies [18,19]. In addition, we have recently described specific domains of the envelop E2 GBV-C protein that interfered with the HIV-1 fusion peptide vesicle interaction, produced a notable decrease of the cellular membrane fusion, and interfered with the HIV-1 infectivity in a dose-dependent manner [20].

Bearing in mind the aforementioned results, we herein report the design and synthesis of both linear and cyclic branched peptides based on the previously reported N-terminal sequence of the GBV-C E2 protein. Immunoassays and cell-cell fusion assays were performed to evaluate their diagnostic value to detect anti-GBV-C antibodies in HIV-1 patients and their putative anti-HIV-1 activity as entry inhibitors, respectively.

Materials and Methods

Reagents

Fmoc-protected amino acids, NovaSyn®TGR, and 2-chlorotrityl resin were purchased from Novabiochem (Läufelfingen, Switzerland). Peptide-synthesis-grade *N,N*-DMF and TFA were obtained from Scharlau (Barcelona, Spain). HPLC-grade

acetonitrile diethyl ether and DCM were from Merck (NJ, USA). HATU was from Genscript (Piscataway, USA). Other coupling activators such as HOBt, DIPCl, and DIEA, as well as the scavengers, triisopropylsilane (TIS), and 1,2-ethanedithiol, were from Fluka-Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Methyl 3-mercaptopropionate and tris-(carboxyethyl)phosphine (TCEP) were obtained from Calbiochem, EMD Chemicals Inc. (New Jersey, USA), and Alfa Aesar (Massachusetts, USA), respectively.

Synthesis of Linear Tetrameric MAPs

Linear tetrameric MAPs were synthesized manually as described by Tam [21]. Amino acid side-chain protection was effected by the following: Trt for glutamine and asparagine; *tert*-butyl for glutamic acid, serine, and threonine; Pmc for arginine; and Boc for tryptophan. The Cys residues were replaced by Abu residues.

The first amino acid coupled to the Rink amide resin (NovaSyn®TGR, 0.1 mmol) was β -Ala. The tetravalent lysine core was obtained by sequential coupling of 0.4 and 0.8 mmol of Fmoc-Lys(Fmoc)-OH activated using HATU and DIEA. The assembly of the peptide sequences E2(17–26), E2(11–26), and E2(7–26) was then accomplished at both *N* α -lysine and *N* ϵ -lysine positions. An eightfold molar excess of Fmoc-amino acids, HATU/DIEA (1:2), was used throughout the synthesis. The efficiency of these reactions was evaluated by Kaiser's (ninhydrin) test, and repeated couplings were carried out when a positive ninhydrin test was observed.

The linear tetrameric MAPs were concomitantly side-chain-deprotected and cleaved from the resin by treatment with TFA in the presence of TIS and water as scavengers (TFA:TIS:H₂O, 9.5:2.5:2.5) for 3 h with occasional agitation at room temperature. The volatile reagents were removed *in vacuo*, and the crude peptides were precipitated with diethyl ether. The residual solids were dissolved in 30% acetic acid in water and lyophilized.

Linear MAPs were desalted using Oasis HLB Plus cartridge 225 mg/60 μ g from Waters. Yields of post SPPS reactions were 58%, 68%, and 72% for MAP_{LP1}, MAP_{LP2}, and MAP_{LP3}, respectively.

Purification of the desalted crude molecules was achieved by semi-preparative HPLC and characterization by analytical-scale HPLC and MS (ES-MS or MALDI-TOF). Final yields after HPLC purification were 5%, 10%, and 14% for MAP_{LP1}, MAP_{LP2}, and MAP_{LP3}, respectively.

Synthesis of Cyclic Tetrameric MAPs

Synthesis of a tetra-chloroacetylated branched Lys core

A tetravalent (chloroacetyl)lysyl core peptide was obtained on a Rink amide resin (NovaSyn®TGR) of functionalization 0.29 mmol/g, by sequential coupling of 0.4 mmol of Fmoc-Lys(Fmoc)-OH and 0.8 mmol of Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, which were incorporated through HATU:DIEA-mediated (1:2) carboxyl activation. After Fmoc deprotection, the tetravalent chloroacetyl moieties were introduced to the core peptide by using a fourfold excess of chloroacetic acid *via* HATU:DIEA (1:2) activation. The chloroacetylation reaction was repeated. The tetravalent (chloroacetyl)lysyl core peptide was cleaved from the resin by treatment of TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) for 2 h. The core peptide was characterized by analytical HPLC and ES-MS (observed mass = 778.3, calculated mass = 778.5). The yield of post SPPS was 78%.

Synthesis and cyclization of E2(7–26) and shorter analogs

The protected peptides were synthesized on a 2-chlorotrityl resin (200 mg, 1.3 mmol/g), by solid phase and following a

9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) strategy. The resin was left in 6 ml of dry DCM containing 0.1% DIEA for 15 min.

To obtain a lower functionalization of the resin, 0.13 mmol (0.5 eq relative to the resin) of Fmoc-Gly-OH and 0.52 mmol (4 eq relative to the carboxylic acid) of DIEA were dissolved in dry DCM and added to the above-described amount of resin. The mixture was stirred for 1 h. At the end of this time, the resin was washed with 10 ml 3 × DCM/MeOH/DIEA (17:2:1), 3 × 10 ml DCM, 2 × 10 ml DMF, and 2 × 10 ml DCM and dried *in vacuo* over KOH pellets for 24 h at room temperature. A Cys residue, protected with both Boc and Trt at N α and thiol group, respectively, was incorporated at the N-terminus of the peptide sequence to enable the 'head-to-tail' cyclization of the E2(7–26) peptide.

The couplings were performed by activating the reagent with HATU and DIEA. The efficiency of these reactions was evaluated by the ninhydrin colorimetric reaction, trinitrobenzene sulfonate, or chloranil tests when required.

The cleavage of the protected peptides from the 2-chlorotriptyl resin was carried out by treatment of 1% TFA in dry DCM for 20 min. The solution was filtered into a flask containing 10% pyridine in methanol (MeOH). The resin material was then washed with 3 × 3 ml DCM, 3 × 3 ml MeOH, 2 × 3 ml DCM, and 3 × 3 ml MeOH. The filtrate was evaporated under reduced pressure. Water was added to the residual material, and the mixture was cooled with ice to aid precipitation of the product, which was isolated by filtration through a sintered glass funnel. The product was dried in a desiccator under vacuum over KOH. All peptides were characterized by ultra-performance liquid chromatography (UPLC)–ES-MS. The yields of post-SPPS were 69%, 73%, and 76% for LP1, LP2, and LP3, respectively.

Subsequently, coupling of the protected peptides with methyl 3-mercaptopropionate (20 eq) was then conducted in DMF using a water-soluble carbodiimide (15 eq) and HOBt (15 eq) at 4 °C for 24 h [22]. Treatment of the protected thioester segment with 95% TFA, 2.5% TIS, and 2.5% H₂O at room temperature for 3 h and subsequent isolation by precipitation with cold diethyl ether, centrifugation, and lyophilization in 10% acetic acid afforded the desired thioester peptide. The yields of thioester peptides were between 46% and 48%.

The linear *N*-cysteinyl thioester peptides at a concentration of 1 mg/ml were dissolved in 0.2 M Na₂HPO₄, 0.1 M citric acid buffer (pH 7.5) containing TCEP (2 mg, 6 μ mol, 2 eq), and HSCH₂CH₂COOCH₃ (2 μ l, 15 μ mol, 5 eq). The cyclization reactions were followed by HPLC and judged to be completed after 24 h. The yields of cyclizations were 72%, 88%, and 98% for CP1, CP2, and CP3, respectively.

Thioether ligation

To the chloroacetylated oligolysine core (0.4 mg, 0.5 μ mol) dissolved in 0.1 M Tris–HCl buffer, pH 8.2, small portions in solid form of the cyclic peptide, CP1: cyc-HT-E2(7–26), CP2: cyc-HT-E2(11–26), or CP3: cyc-HT-E2(17–26), were added to the solution from time to time in order to obtain the cyclic tetrameric MAPs by means of a thioether ligation. In all cases, the thioether ligation reactions were monitored by HPLC and allowed to proceed until no changes in the HPLC profile were observed. The reactions were terminated by acidification. Fractions representative of different degrees of peptide incorporation were isolated by semi-preparative HPLC and characterized by analytical HPLC and ES-MS and MALDI-TOF spectrometry.

Chromatography

Analytical HPLC was performed on Kromasil C₁₈ or Kromasil C₈ (Teknokroma, 4.6 × 250 mm, 5 μ m particle size) and Poroshell 300-SB C₁₈ (Agilent Technologies, 2.1 × 75 mm, 5 μ m particle size) reverse-phase columns on Perkin Elmer or Agilent 1260 Infinity systems. Linear gradients of 0.05% TFA in acetonitrile (solvent B) into 0.05% TFA in water (solvent A) over 20–30 min at 1 ml/min flow rate, with UV detection at 220 nm, were used for the separation.

Analytical UPLC was performed on ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (Waters, 2.1 × 100 mm, 1.7 μ m particle size) or UHPLC Zorbax SB C₁₈ (Agilent Technologies, 2.1 × 150 mm, 1.8 μ m particle size) reverse-phase columns on a Waters ACQUITY UPLC system. Solvent A was 0.05% formic acid in water, and solvent B was 0.05% formic acid in acetonitrile. Elution was done with linear gradients of solvent B into A over 10 min at 0.3 ml/min. Both variable wavelength UV detector and ES-MS were connected to the UPLC for the peptide characterization.

Semi-preparative HPLC was performed on Kromasil C₁₈ and Kromasil C₈ (Teknokroma, 5 μ m, 22 × 250 mm, 5 μ m) in a Waters Delta Prep 4000 system or XBridge BEH300 prep C₁₈ (Waters, 10 × 250 mm, 5 μ m particle size) in an Agilent 1260 Infinity system. Linear gradients were performed at the same conditions as that of analytical HPLC but at a flow rate of 3.5–4 ml/min. Semi-preparative fractions characterized by analytical HPLC were pooled and lyophilized.

Mass Spectrometry

Electrospray ionization mass spectrometry was performed with a liquid chromatograph-TOF detector, LCT Premier XE (Micromass Waters), coupled to the UPLC (Waters). Samples were dissolved in a mixture of acetonitrile/water (1:1, v/v) and analyzed previously at the UPLC with a flow rate of 0.3 ml/min. Mass spectra were recorded in positive ion mode in the *m/z* 500–2500 range.

MALDI-TOF mass spectra were recorded in an Autoflex III Smartbeam (Bruker Daltonics), using either sinapinic or α -hydroxycinnamic acid matrixes on an MTP 384 target plate (Bruker). MS spectra were in linear positive mode.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Two different panels of serum samples were analyzed. The first panel consisted of 45 sera from HIV-infected patients from the Hospital of Bellvitge of Barcelona. The second panel corresponded to 45 control sera from volunteer blood donors from the Hospital Clinic of Barcelona.

Peptides were coupled to assay plates via their amine terminal groups and/or by means of the non-covalent adsorption of the molecules to the surface (preactivated *N*-oxysuccinimidyl active ester plates, Costar Corp., DNA Bind) at 1 μ g per well. Nunc Immobilizer amino plates were also used to bind CP1, CP2, and CP3 cyclic peptides by their thiol group. Coupling was performed at 4 °C overnight in 0.05 M carbonate/bicarbonate buffer pH 9.6.

Each plate contained control wells that included all reagents except the serum sample in order to estimate the background reading and control wells that included all reagents except the peptide to evaluate non-specific reactions of sera. For blank controls, wells were coupled with 2 μ g of BSA per well. After incubation, the plates were blocked with 2% BSA in 0.05 M carbonate/bicarbonate (pH 9.6) buffer for 1 h at room temperature. Sera were diluted 50-fold in RIA buffer (1% BSA, 350 mM NaCl, 10 mM Tris–HCl, pH 7.6, 1% Triton X-100, 0.5% sodium

deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate) supplemented with 10% fetal bovine serum. An amount of 100 μ l was added to each well, and the mixture was incubated for 1.5 h at room temperature. After the mixture was washed six times with phosphate-buffered saline/0.05% Tween-20, 100 μ l per well of antihuman IgG conjugated to peroxidase diluted 1 : 1000 in RIA buffer was added. After incubation for 1 h at room temperature, the plates were washed six times with phosphate-buffered saline/0.05% Tween-20, and bound antibodies were detected with *o*-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma Chemical Company) and 8 μ l/10 ml 30% hydrogen peroxide. The plates were incubated at room temperature for 30 min. The reaction was stopped with 50 μ l of 2 M aqueous H₂SO₄ per well, and absorbance values were measured at a wavelength of 492 nm. All sera were tested in duplicate. Control sera were also included to monitor inter-assay and intra-assay variations. The cutoff was calculated for each peptide from negative control sera (mean + 2 standard deviations). Statistical analysis was conducted using the GraphPad Prism 5 program.

This study was approved by the ethics committee of the hospitals.

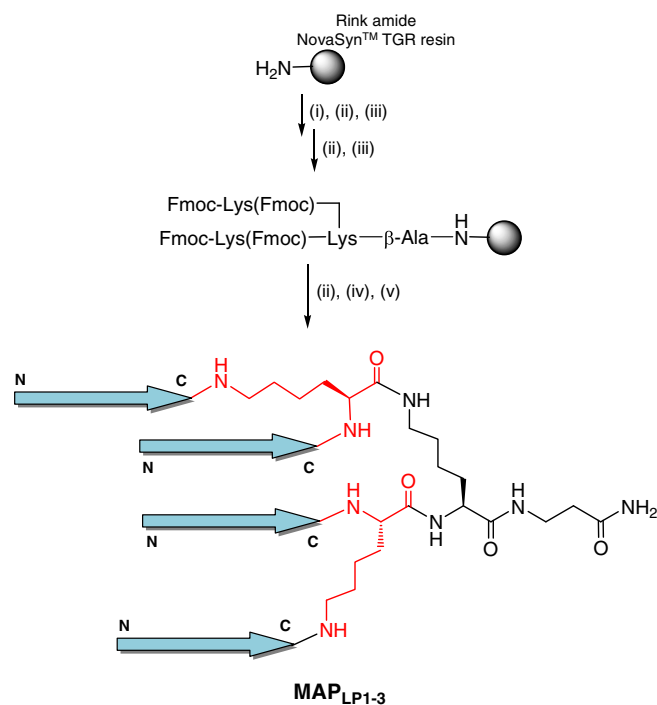


Figure 1. Synthesis of linear MAPs. Reagents: (i) Fmoc- β Ala-OH/HATU/DIEA, DMF; (ii) 20% piperidine/DMF; (iii) Fmoc-Lys(Fmoc)-OH/HATU/DIEA, DMF; (iv) SPPS; (v) TFA/H₂O/*i*Pr₃SiH (95/2.5/2.5).

Inhibition of Cell Binding Assay

Two cell lines were used: HeLa-env (donated by Dr Blanco from Fundació IRSI Caixa), which indicates the protein from the HIV-1 envelope and includes the HIV-1 LTR promoter in its genome, and TZM-bl (AIDS reagents Cat. No 8129), which expresses the membrane receptor from CD4 lymphocytes and co-receptors CCR5 and CXCR4 and includes the luciferase and β -galactosidase genes in its genome.

In short, the trial on the inhibition of cell binding induced by GBV-C peptides consists of the incubation of \sim 2500 HeLa-env cells per well (Cultek cat. plates no. 15–3596) for 1 h with increasing concentrations (up to 200 μ M) of the peptides to be tested, followed by the addition of around ten times (\sim 25 000 cells) TZM-bl and incubation for 24 h.

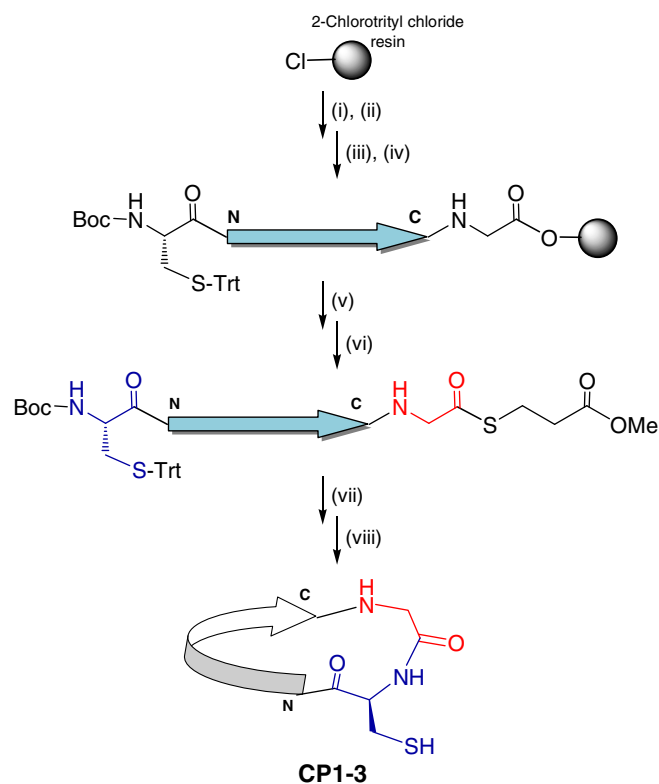


Figure 2. Synthesis and cyclization of linear peptides. Reagents and conditions: (i) Fmoc-Gly-OH/DIEA, CH₂Cl₂; (ii) 20% piperidine/DMF; (iii) SPPS; (iv) Boc-Cys(Trt)-OH/HATU/DIEA, DMF; (v) 1% TFA/CH₂Cl₂; (vi) HS(CH₂)₂CO₂CH₃, water-soluble carbodiimide/HCl, HOBt, 4 °C, 24 h; (vii) TFA/H₂O/*i*Pr₃SiH (95/2.5/2.5); (viii) 0.2 M aq. phosphate buffer pH 7.5, TCEP, HS(CH₂)₂CO₂CH₃.

Table 1. Characterization of linear tetrameric MAPs				
Name	Primary sequence	HPLC (<i>k'</i>) ^a	Calc. mass	Exp. mass ^b
MAP _{LP1}	GSRPFEPGLTWQS[Abu]S[Abu]RANG	2.3	8869.7	8869.9
MAP _{LP2}	FEPGLTWQS[Abu]S[Abu]RANG	2.4	7280.0	7280.2
MAP _{LP3}	WQS[Abu]S[Abu]RANG	1.8	4701.1	4701.1

^aKromasil C₁₈ column (5 μ m, 25 \times 0.46 cm). Eluents: (A) 0.05% TFA in water; (B) 0.05% TFA in acetonitrile. Flow rate: 1 ml/min, detection at 215 and 280 nm. Gradient elution: 95% (A) to 5% (A) in 30 min.

^bExperimental mass obtained by ES-MS

To control cell binding, wells without peptides were reserved, and a known cell binding inhibitor used, C-34 (AIDS reagents cat. no. 9824), as a positive control. The level of inhibition of cell binding was qualitatively assessed by observing the formation of syncytia under the microscope. The quantitative values were obtained by measuring the β -galactosidase activity. In the fluorimetric assay performed, 20% 5 μ l Igepal in a solution of 100 mM phosphate buffer pH 7.2 and 0.1 mM MgCl₂ were added to each well, and the contents were mixed. β -Galactosidase activity was quantified at 37 °C in a 96-well plate by mixing 50 μ l of each lysate and 50 μ l of 4-methylumbelliperyl- β -D-galactopiranoside (1 mM in phosphate buffer 100 mM, pH 7.2, 0.1 mM MgCl₂) and incubating for 30 min. Enzymatic reaction was stopped by the addition of 150 μ l glycine-NaOH buffer (100 mM, pH 10.6). The amount of 4-methylumbelliferone formed was determined using a SpectraMax M5 (Molecular devices) fluorimeter at 355 nm (excitation) and 460 nm (emission).

Results and Discussion

Different forms of presentation (linear, cyclic, and branched peptides) of an N-terminal peptide domain of the envelop E2 protein of GBV-C have been synthesized by solid-phase methodologies and evaluated regarding its diagnostic value to detect anti-GBV-C antibodies in HIV patients, as well as for their putative anti-HIV-1 activity as entry inhibitors.

Three antigenic overlapping peptides belonging to the E2 region, namely LP1: E2(7–26), LP2: E2(11–26), and LP3: E2(17–26), have been selected regarding the length of their primary sequence. The Cys residues in positions 20 and 22 were replaced by Abu residues because this amino acid has the same hydrophobic and steric properties as Cys but avoids the reactivity of the Cys thiol group without modifying the immunochemical properties of the parent peptide [23].

As described earlier, peptide dendrimers have many applications in different research fields and are potential new

Table 2. Characterization of linear and cyclic peptides

Name	Primary sequence	HPLC (<i>k'</i>) ^b	Calc. mass	Exp. mass ^c
LP1	(C)GSRPFEPGLTWQS[Abu]S[Abu]RANG	3.5	2116.0	2116.3
CP1 ^a		3.6	2201.0	2201.1
LP2	(C)FEPGLTWQS[Abu]S[Abu]RANG	3.2	1719.8	1719.6
CP2 ^a		3.3	1805.0	1804.8
LP3	(C)WQS[Abu]S[Abu]RANG	2.9	1074.5	1074.8
CP3 ^a		3.1	1159.5	1159.6

^acyc-HT: cyclic head-to-tail *N*-cysteinyll peptide. The *N*-terminal Cys residue is only present in CP peptides.

^bKromasil C₁₈ column (5 μ m, 25 \times 0.46 cm). Eluents: (A) 0.05% TFA in water; (B) 0.05% TFA in acetonitrile. Flow rate: 1 ml/min, detection at 215 and 280 nm. Gradient elution: 95% (A) to 5% (A) in 30 min.

^cExperimental mass obtained by ES-MS.

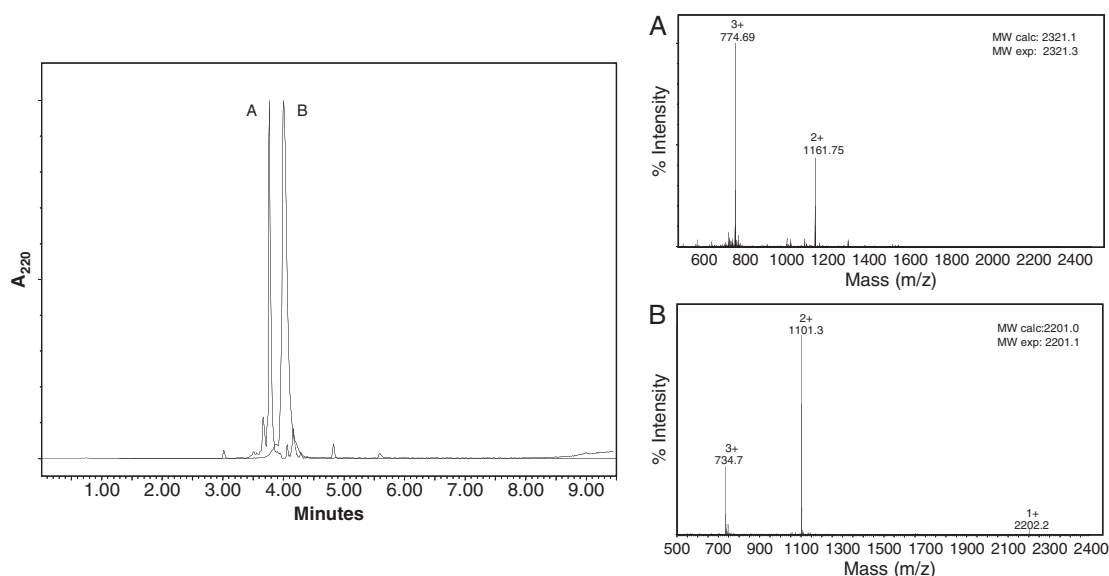


Figure 3. Progress of the cyclization reaction of LP1 monitored by UPLC/ES-MS at 0 and 24 h reaction time. UPLC conditions: 5–95% linear gradient of eluent B into A over 10 min at a flow rate of 0.3 ml/min. UPLC C₁₈ column. Solvent A was 0.05% HCOOH in water, and solvent B was 0.05% HCOOH in acetonitrile. (A) *N*-cysteinyll LP1 thioester, calculated mass: 2321.1, experimental mass: 2321.3. (B) CP1, calculated mass: 2201.0, experimental mass: 2201.1.

therapeutics. Among the several advantages of dendrimers, their ability to display multiple copies of epitopes required for biological recognition processes should be highlighted. In an attempt to improve both the antibody recognition and the anti-HIV-1 fusion activity of the selected E2 GBV-C protein N-terminal domain, different peptide dendrimers based on a polylysine scaffold were designed for the presentation of both linear and cyclic forms of this peptide region.

Firstly, a linear homogeneous tetrameric MAP of each overlapped peptide (MAP_{LP1}, MAP_{LP2}, and MAP_{LP3}) has been successfully synthesized. Their synthetic scheme is illustrated in Figure 1. Although some minor synthetic and analytical difficulties were encountered (e.g., repeated couplings were necessary and complex HPLC profiles of crude samples), the three tetrameric MAPs were obtained. Purification of the crude molecules was achieved by semi-preparative HPLC. HPLC chromatograms and MALDI-TOF and ES-MS spectra of purified tetrameric MAPs are shown in Figure S1 of the Supporting Information. Characterization of the final products by MALDI-TOF and ES-MS spectrometry confirmed the expected molecular mass of the linear tetrameric MAPs (Table 1).

In order to obtain cyclic tetrameric MAPs comprising the same N-terminal domain of E2 GBV-C protein, the synthesis of a tetra-chloroacetylated branched Lys core was firstly accomplished by solid-phase peptide chemistry. The core was appropriately characterized by analytical-scale HPLC and ES-MS (Figure S2 of Supporting Information).

The synthesis of cyclic E2 peptides bearing a free thiol for subsequent conjugation onto the chloroacetylated core was pursued. To this end, the three different linear E2 peptides were again synthesized in solid phase, and peptide cyclization was carried out by intramolecular native chemical ligation. As described earlier, this regiospecific method is based on an intramolecular transesterification reaction between a thioester group and the sulfhydryl group of a Cys residue specifically introduced in the N-terminal position of the peptide sequence. The synthetic strategy is outlined in Figure 2. As illustrated, a modular approach for the chemical macrocyclization of the E2 linear peptides, which would subsequently deliver scaffolds bearing reactive sulfhydryl functionality, was followed. This approach was based on a chemoselective head-to-tail cyclization using unprotected (native) *N*-cysteinyll peptide thioester *via* a proximity-driven S-to-N acyl transfer pathway.

The synthesis of the thioester at C-terminal position using Fmoc chemistry is considered to be troublesome because of their poor stability to strong nucleophiles such as piperidine. To overcome this limitation, an approach usually described in the literature consists of the synthesis in solution using partially protected peptides [24]. Because the major drawback of this method is the likely epimerization of a C-terminal residue during the thioesterification reaction, a Gly residue was incorporated in the C-terminus to overcome this limitation [25]. Thus, the desired linear peptides (listed in Table 2) were assembled on *o*-chlorotrityl resin using standard Fmoc/*t*-Bu chemistry, and for analytical purposes, samples of totally deprotected peptides were obtained and characterized by UPLC and ES-MS (Table 2).

Following cleavage of the partially protected peptides using mild conditions, thioester formation at the C-terminus was accomplished in organic solution. Upon removal of all protecting groups, the crude cysteinyl peptide thioesters were found to be sufficiently pure and were therefore used directly for intramolecular macrocyclization.

Efficient macrocyclization was ensured by the presence of TCEP to inhibit disulfide bond formation and a thiol auxiliary reagent [8]. As an example, the progress of the LP1 cyclization process, after 24 h, monitored by analytical HPLC is shown in Figure 3. The mass identification of each chromatographic peak is also shown. It has been reported by others that this cyclization occurs cleanly and efficiently in yields ranging from 75% to 82% for peptides of 14 and 16 residues [8]. In our hands, the cyclization reaction of the three E2 peptides proceeded also cleanly because oligomerization of the thioester peptide was not detected in any case; the yields of CP1: cyc-HT-E2(7–26), CP2: cyc-HT-E2(11–26), and CP3: cyc-HT-E2(17–26) were almost quantitative by HPLC. Characterization of purified cyclic peptides by analytical HPLC and ES-MS is shown in Figure S3 of the Supporting Information.

Finally, the assembly of each cyclic E2 peptide to the previously obtained tetra-chloroacetylated polylysine MAP subunit was performed in solution as illustrated in Figure 4.

The ligation reactions of the largest CP1 and medium-size CP2 cyclic E2 peptides, 21-mer and 17-mer, respectively, to the

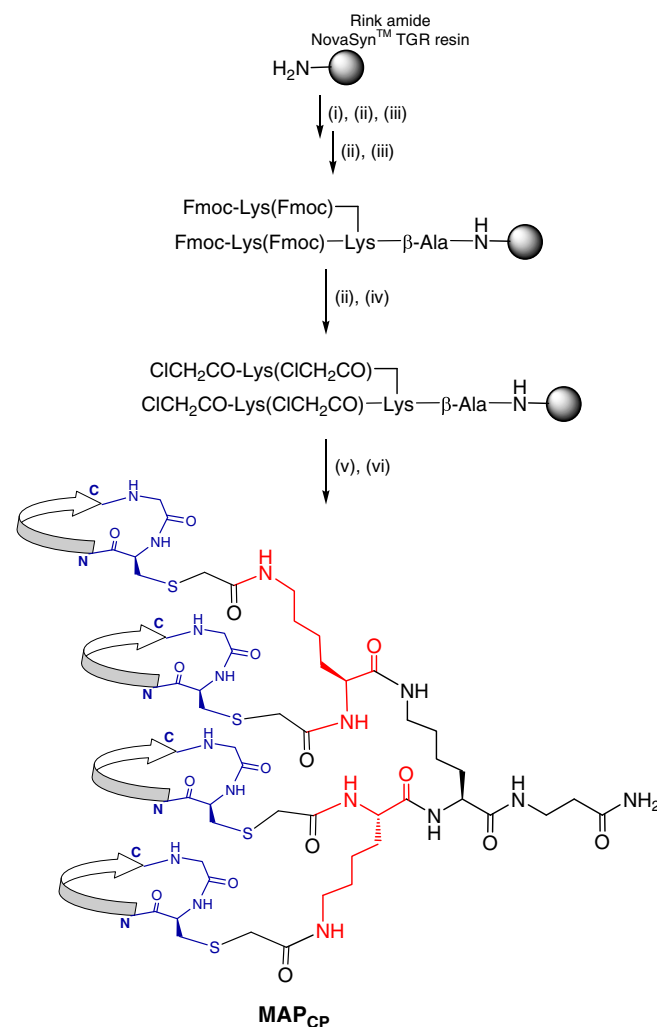


Figure 4. Synthesis of cyclic MAPs. Reagents and conditions: (i) Fmoc-βAla-OH/HATU/DIEA, DMF; (ii) 20% piperidine/DMF; (iii) Fmoc-Lys(Fmoc)-OH/HATU/DIEA, DMF; (iv) ClCH₂CO₂H/DIPICl/HOBt, DMF; (v) TFA/H₂O/iPr₃SiH (95/2.5/2.5); (vi) cyclic peptide added portionwise, 0.1 M Tris-HCl buffer pH 8.2.

tetra-chloroacetylated core were allowed to proceed for 48 h. In both cases, UPLC analysis showed that the expected final products were not obtained. MALDI-TOF or ES-MS analysis of the different fractions collected by UPLC did not show the presence of the expected cyclic tetrameric MAPs (Table 3). Nevertheless, we conclusively identified products showing the incorporation of one or two copies of each cycle (CP1 or CP2) into the derivatized

oligolysine sub-unit by MALDI-TOF (Figure S4, Supporting Information). MALDI-TOF analysis showed some differences between theoretical $[M+H]^+$ and observed masses. Because spectra were acquired in the linear TOF mode, we considered such differences to be within expectations.

In addition, the thioether ligation of CP3, the smaller cyclic E2 peptide comprised of 11 residues, was also sluggish, and a complex crude product was detected by UPLC. As shown in Figure 5, we could identify a set of peaks that were assigned to the MAPs containing different copies of CP3. It is worth nothing that, in this case, we were able to identify by MALDI-TOF and ES-MS the tetrameric MAP composed of four copies of the cyc-HT-Cys E2(17–26). Unfortunately, the complex crude product obtained did not enable a good isolation of the target product with four copies of CP3 in a desirable amount and purity to be used in biological assays. The difficulties found could be related with steric effects and have previously been reported by others [2,26,27].

Diagnostic value of antibodies against synthetic peptides derived from the N-terminal domain of E2 GBV-C. We investigated the ability of the E2(7–26)-derived peptides, as described earlier, to interact with anti-GBV-C antibodies in HIV-infected patients. This work follows our previous research using chimeric molecules formed by two domains of different GBV-C proteins, in which

Name		Mass calc.	Mass found
MAP _{CP1}	MAP _{CP1-1}	2944.50	2947.64
	MAP _{CP1-2}	5110.45	5118.59
	MAP _{CP1-3}	7276.40	—
	MAP _{CP1-4}	9442.34	—
MAP _{CP2}	MAP _{CP2-1}	2547.07	2547.94
	MAP _{CP2-2}	4315.58	4307.07
	MAP _{CP2-3}	6084.11	—
	MAP _{CP2-4}	7852.62	—
MAP _{CP3}	MAP _{CP3-1}	1903.34	1903.12
	MAP _{CP3-2}	3027.14	3027.93
	MAP _{CP3-3}	4150.94	4150.97
	MAP _{CP3-4}	5274.42	5276.69

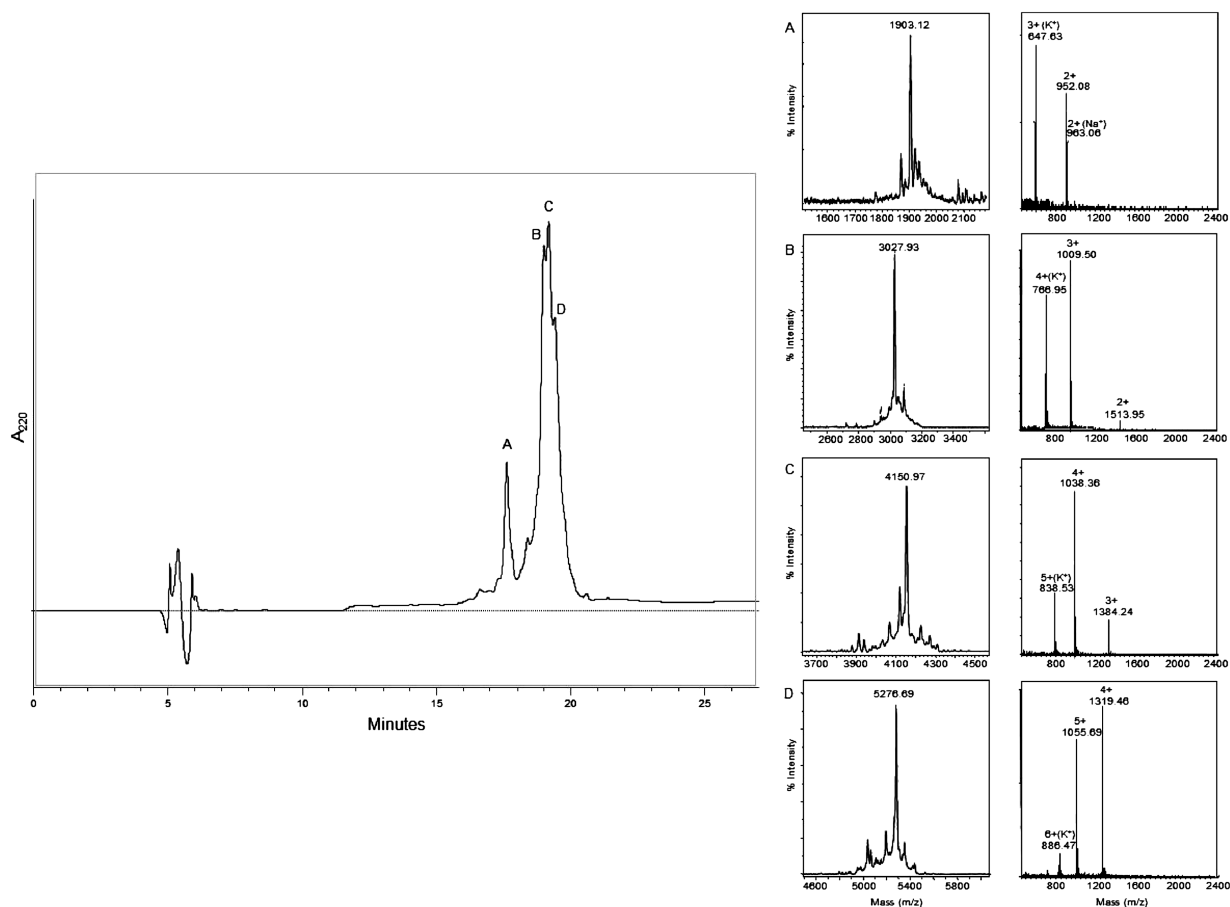


Figure 5. UPLC of the crude MAP_{CP3} and assignation of peaks by MS (MALDI-TOF and ES-MS). HPLC conditions: 10–50% linear gradient of eluent B into A over 27 min at a flow rate of 1 ml/min. HPLC C₁₈ column. Solvent A was 0.05% TFA in water, and solvent B was 0.05% TFA in acetonitrile. (A) MAP_{CP3-1} calculated mass: 1903.34, experimental mass (ES-MS): 1902.06; (B) MAP_{CP3-2} calculated mass (ES-MS): 3027.14, experimental mass (ES-MS): 3025.80; (C) MAP_{CP3-3} calculated mass: 4150.94, experimental mass (ES-MS): 4149.65; (D) MAP_{CP3-4} calculated mass: 5274.42, experimental mass (ES-MS): 5274.33.

we observed good sensitivity/specificity for the detection of anti-GBV-C antibodies in hemodialyzed chronic hepatitis and HIV-infected patient samples.

ELISA was performed as previously described [15]. Using the LP1 linear peptide, we initially assessed the serologic reactivity of the 95 sera panel from HIV-infected patients that previously tested positive for GBV-C anti-E2 protein antibodies by the Abbott test. Also, a panel of 97 sera from blood donors was used as negative controls. The results obtained when performing the comparative ROC curve analysis rendered a cutoff value of 0.357 ODU for LP1, which corresponded to 94.8% specificity [16]. Considering this cutoff value, seven sera from a panel of 45 HIV patients with unknown GBV-C/HIV-1 co-infection reported positive and were therefore selected for further evaluation. Hence, these seven samples were tested for their reactivity against the remaining E2(7–26)-derived peptides and multimer constructs, that is, LP2, LP3, and the corresponding cyclic (CP1, CP2, and CP3) and multimeric (MAP_{LP1}, MAP_{LP2}, and MAP_{LP3}) analogs. In Table 4, the obtained results are shown. As observed, only the CP3 cyclic peptide derived from the shorter E2 peptide reported positive for all the assayed sera.

For comparative purposes, the cutoff values for all peptides derived from the E2(7–26) region were calculated in this work by using the media + 2 standard deviation of the OD values obtained with a panel of 45 sera of blood donors that were considered as negative controls. With these cutoff values taken into account, when the LP1 is compared with their corresponding cyclic or multimeric versions, the linear LP1 peptide was significantly more reactive when probed using HIV-infected patients' sera (Figure 6). However, cyclization of the shorter linear versions of the E2 domain afforded relatively more reactive compounds, when compared with the parent linear versions. For example, the CP3 (Table 4) was the most reactive of the three cyclic compounds either using NOS-activated Costar (23 positive sera from the 45 assayed samples) or Nunc Immobilizer amino plates (15 positive sera from the 45 assayed samples) (Figure S5 of Supporting Information). Hence, we performed a further comparative analysis using the CP3 cyclic peptide and its corresponding MAP against the whole panel of HIV sera. Although the mean of the absorbance values was slightly lower for the MAP, no significant differences were observed between the monomeric and multimeric versions of the CP3 peptide (Figure 7). In both cases, 23 of the 45 sera of HIV-infected patients with unknown GBV-C/HIV-1 co-infection reported positive outcomes, which corresponded to a reactivity of 51%. These results are considered not to be significantly

Table 4. Reactivity of E2 peptides against sera of HIV-infected patients

Serum	LP1	LP2	LP3	CP1	CP2	CP3	MAP _{LP1}	MAP _{LP2}	MAP _{LP3}
S1	+	–	–	+++	–	+	++	+	–
S12	++	+++	++	+	–	+	–	+	–
S16	+	+	–	–	–	+	–	–	–
S30	+	++	+	+	+	+	++	+++	+
S39	+	+	+	+	–	+	+	+	+
S40	+	++	–	+	+	+	+	+	+
S41	+	–	+	–	+	+	+	+	–
	7/7	5/7	4/7	5/7	3/7	7/7	5/7	6/7	3/7

–, 1 > DO/CO; +, 2.5 > DO/CO ≥ 1; ++, 4 > DO/CO ≥ 2.5; +++, 4 ≥ DO/CO.

different to the ones previously reported for LP1 [16]. In this case, the presence of antibodies anti-LP1 was detected in 79 of 164 HIV-infected patients (48% sensitivity). These values agree well with the reported prevalence of GBV-C viremia ranging from 14% to 43% among people with HIV infection [28]. Consequently, in our hands, under the same ELISA conditions, neither the shorter versions of LP1 nor their head-to-tail cyclization or multimerization achieved diagnostic properties that are superior to the LP1 peptide.

Other ELISA plates could also be used in order to test if better antibody recognition is achieved with cyclic peptides. The secondary amino (Covalink NH, Nunc) grafted ELISA plates could

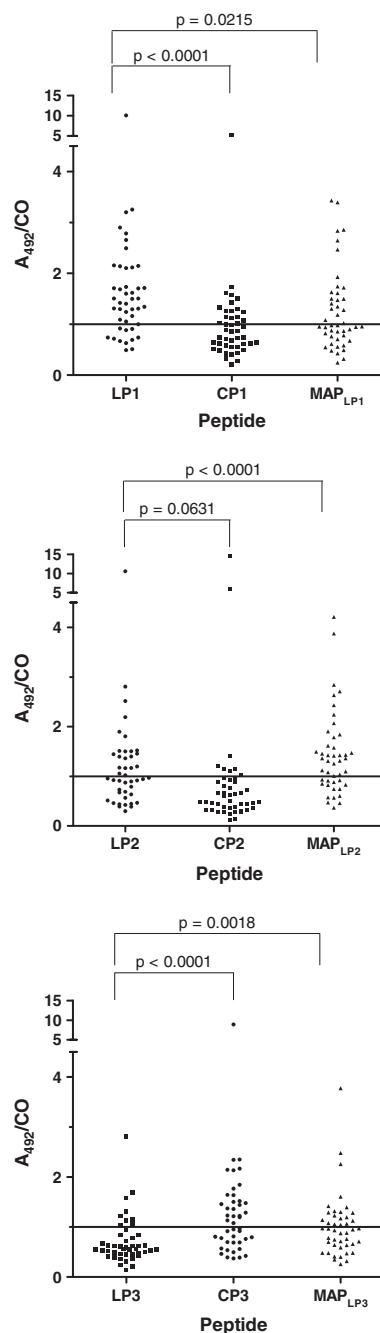


Figure 6. Reactivity of linear, cyclic, and MAP analogs of LP1, LP2, and LP3 peptides with a panel of 45 HIV-infected patient sera. The samples were considered anti-GBV-C positive when $A_{492}/CO \geq 1$.

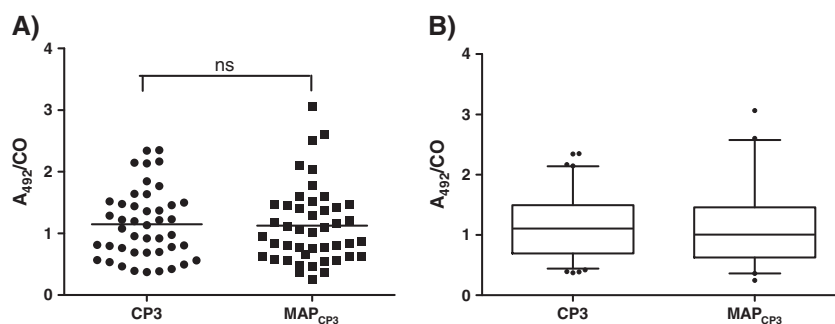


Figure 7. (A) Reactivity of CP3 and MAP_{CP3} with a panel of 45 HIV-infected patient sera. The samples were considered anti-GBV-C antibodies positive when $A_{492}/CO \geq 1$. (B) Distribution of test's values by populations. Boxes represent median and interquartile range (distance between the 25th and 75th percentiles). Whiskers represent values outside interquartile range. Single points represent outliers and extreme values. Serum levels of anti-GBV-C antibodies in 45 HIV-infected patients, CP3: mean = 1.148, $SD = 0.562$, MAP_{CP3}: mean = 1.125; $SD = 0.624$.

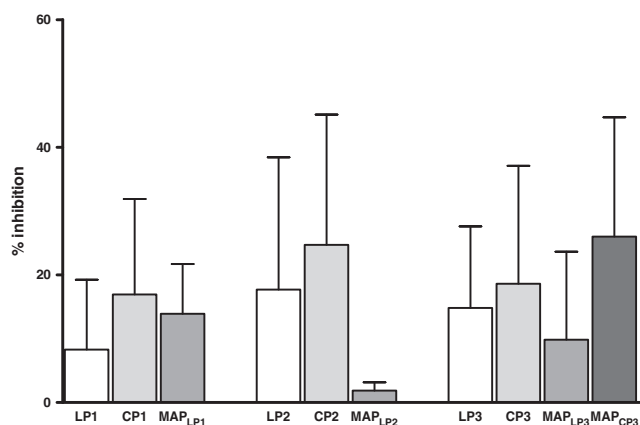


Figure 8. Inhibitory activity of linear, cyclic, and MAP E2 peptides on gp41-mediated cell-cell fusion assay at a concentration of 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. LP1: E2(7–26) linear; CP1: E2(7–26) cyclic; LP2: E2(11–26) linear; CP2: E2(11–26) cyclic; LP3: E2(17–26) linear; CP3: E2(17–26) cyclic, MAP_{LP1}: MAP₄E2(7–26); MAP_{LP2}: MAP₄E2(11–26); MAP_{LP3}: MAP₄E2(17–26); MAP_{CP3}: MAPE2(17–26) cyclic. This assay was performed in triplicate.

be used in future work to further analyze the potential utility of cyclic peptides for antibody recognition. In this context, these cyclic peptides would be conjugated *via* the Glu residues to the surfaces of the grafted ELISA plates.

Anti-HIV-1 activity of synthetic peptides derived from the N-terminal domain of E2 GBV-C. We have also investigated the potential anti-HIV-1 activity of different forms of presentation of the N-terminal sequence of GBV-C E2 protein as entry inhibitors, by examining their effect on cell–cell fusion assays and analyzing their capacity to block syncytium [20].

Before using the peptides on cells, we evaluated their cytotoxicity. Thus, both families of linear and cyclic peptides did not exhibit any observable cytotoxicity as evaluated by the MTT assay, at the maximum assayed concentration (300 μM). However, the MAPs (MAP_{LP1}, MAP_{LP2}, MAP_{LP3}, and MAP_{CP3}) precipitated at the highest concentrations; thus, the maximum non-cytotoxic concentration tested was 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Next, we examined the effect of the E2 synthetic constructs on cell–cell fusion assays, analyzing their capacity to block syncytium formation between HeLa cells expressing the envelope protein of HIV-1 and TZM-bl cells expressing the human

CD4 receptor CXCR4 or CCR5 HIV-1 co-receptors in the presence of various amounts of each peptide.

Values of cell–cell fusion inhibition lower than 50% for all the assayed peptides concentrations were obtained, and they were not produced in a dose-dependent manner (data not shown). In Figure 8, the comparative results obtained at 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ peptides concentration is shown. As observed, a clear but non-significant trend was obtained for the three overlapping peptides ($p > 0.05$), the cyclization being the modification that rendered higher inhibition values.

Because of the non-dose-dependent inhibition results obtained, we were not able to calculate the IC_{50} values. However, the potencies of the reported GBV-C E2 analogs were quite modest (close to millimolar range), the concentration needed to inhibit gp41-mediated cell–cell fusion being considerably higher compared with well-known entry inhibitors [29]. Consequently, it appeared that the chemical modifications carried out in the selected E2(7–26) peptide did not result in a substantial reduction of the concentration needed to inhibit virus entry.

Conclusions

Our results showed that chemical modifications of the selected E2(7–26) linear peptide to afford cyclic architecture do not result in an enhanced inhibition of gp41 HIV-1-mediated cell–cell fusion nor improved sensitivity in the detection of GBV-C antibodies in HIV co-infected patients. Thus, the ELISA data reinforce the potential utility of linear versions of the E2(7–26) region for the development of new peptide-based immunosensor devices.

Nevertheless, we envisaged that our overall construct design and synthetic strategy, especially to the unique cyclic peptide MAPs, could be exploited for exploring the effect of structural constraint and avidity in other biological systems.

Acknowledgement

This work was funded by grant CTQ2009-13969-CO2-01 from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain and grant FIPSE 36-0735-09 from the Fundación para la Investigación y Prevención del SIDA en España. LF is a recipient of an FPI grant from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain. The following reagent was obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: HIV-1 IIB C34 peptide from DAIDS, NIAID.

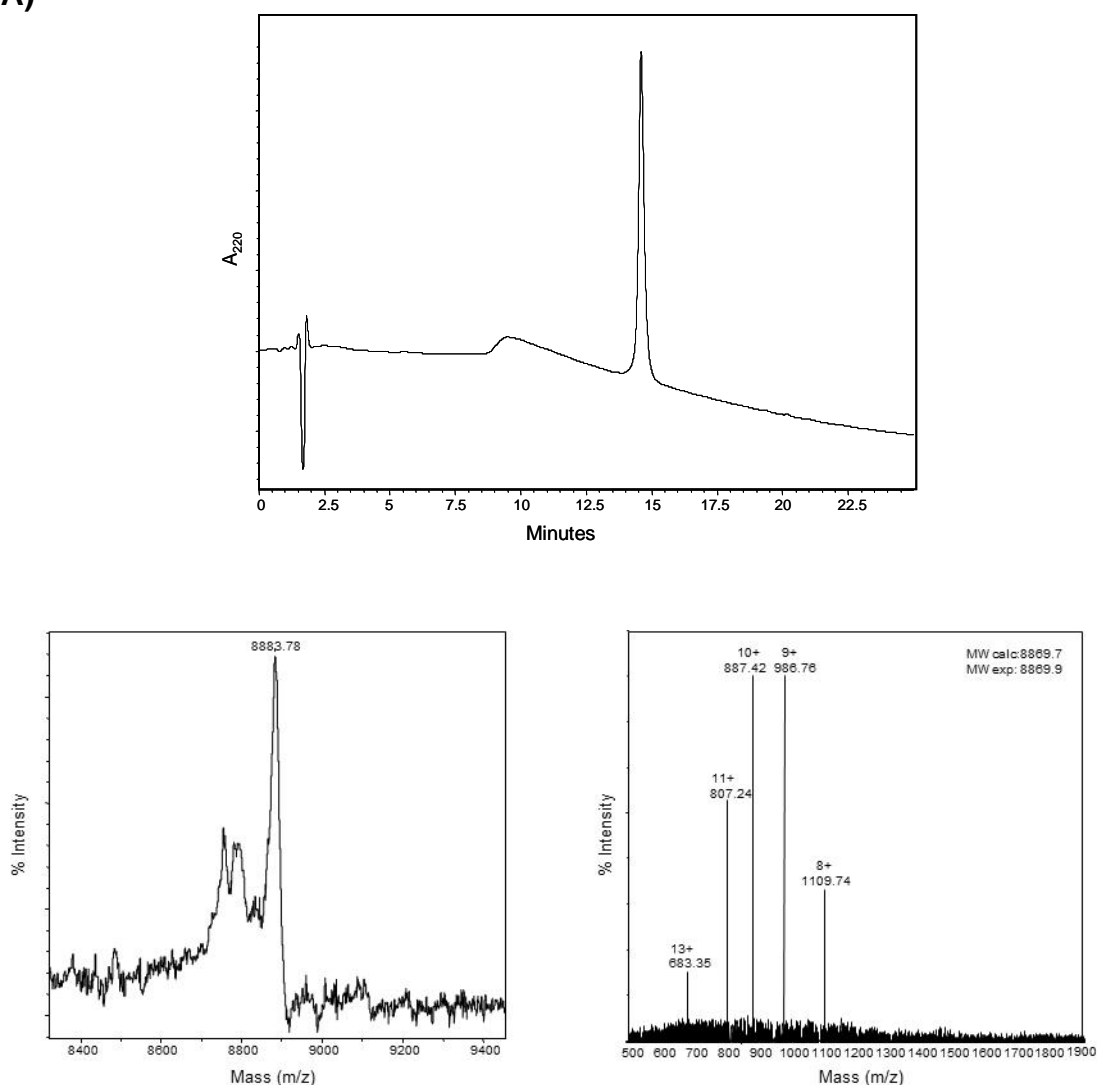
References

- 1 Sadler K, Tam JP. Peptide dendrimers: applications and synthesis. *Rev. Mol. Biotechnol.* 2002; **90**: 195–229.
- 2 de Oliveira E, Villen J, Giral E, Andreu D. Synthetic approaches to multivalent lipopeptide dendrimers containing cyclic disulfide epitopes of foot-and-mouth disease virus. *Bioconjug. Chem.* 2003; **14**: 144–152.
- 3 Thumshirn G, Hersel U, Goodman SL, Kessler H. Multimeric cyclic RGD peptides as potential tools for tumor targeting: solid-phase peptide synthesis and chemoselective oxime ligation. *Chemistry* 2003; **9**: 2717–2725.
- 4 Dijkgraaf I, Rijnders AY, Soede A, Dechesne AC, van Esse GW, Brouwer AJ, Corstens FHM, Boerman OC, Rijkers DTS, Liskamp RMJ. Synthesis of DOTA-conjugated multivalent cyclic-RGD peptide dendrimers via 1,3-dipolar cycloaddition and their biological evaluation: implications for tumor targeting and tumor imaging purposes. *Org. Biomol. Chem.* 2007; **5**: 935–944.
- 5 Wangler C, Maschauer S, Prante O, Schafer M, Schirmacher R, Bartenstein P, Eisenhut M, Wangler B. Multimerization of cRGD peptides by click chemistry: synthetic strategies, chemical limitations, and influence on biological properties. *ChemBiochem* 2010; **11**: 2168–2181.
- 6 Spetzler JC, Tam JP. Self-assembly of cyclic peptides on a dendrimer: Multiple cyclic antigen peptides. *Pept. Res.* 1996; **9**: 290–296.
- 7 Dawson PE, Muir TW, Clarklewis I, Kent SBH. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* 1994; **266**: 776–779.
- 8 Zhang LS, Tam JP. Synthesis and application of unprotected cyclic peptides as building blocks for peptide dendrimers. *J. Am. Chem. Soc.* 1997; **119**: 2363–2370.
- 9 Niederhafner P, Sebestik J, Jezek J. Peptide dendrimers. *J. Pept. Sci.* 2005; **11**: 757–788.
- 10 Pau CP, Luo W, McDougal JS. Chimeric multiple antigenic peptides for simultaneous detection of specific antibodies to HIV-1 groups M, N, O, and HIV-2. *J. Immunol. Methods* 2007; **318**: 59–64.
- 11 Zaccaro L, del Gatto A, Pedone C, Saviano M. Peptides for tumour therapy and diagnosis: current status and future directions. *Curr. Med. Chem.* 2009; **16**: 780–795.
- 12 Heegaard PMH, Boas U, Sorensen NS. Dendrimers for Vaccine and Immunostimulatory Uses. A Review. *Bioconjug. Chem.* 2010; **21**: 405–418.
- 13 Luginani A, Giuliani A, Pirri G, Pizzuto L, Landolfo S, Gribaudo G. Peptide-derivatized dendrimers inhibit human cytomegalovirus infection by blocking virus binding to cell surface heparan sulfate. *Antiviral Res.* 2010; **85**: 532–540.
- 14 Donalizio M, Rusnati M, Civra A, Bugatti A, Allemand D, Pirri G, Giuliani A, Landolfo S, Lembo D. Identification of a dendrimeric heparan sulfate-binding peptide that inhibits infectivity of genital types of human Papillomaviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; **54**: 4290–4299.
- 15 Gomara MJ, Fernandez L, Perez T, Ercilla G, Haro I. Assessment of synthetic chimeric multiple antigenic peptides for diagnosis of GB virus C infection. *Anal. Biochem.* 2010; **396**: 51–58.
- 16 Gomara MJ, Fernandez L, Perez T, Tenckhoff S, Casanovas A, Tillmann HL, Haro I. Diagnostic value of anti-GBV-C antibodies in HIV-infected patients. *Chem. Biol. Drug Des.* 2011; **78**: 277–282.
- 17 Welch BD, VanDemark AP, Heroux A, Hill CP, Kay MS. Potent D-peptide inhibitors of HIV-1 entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; **104**: 16828–16833.
- 18 Larios C, Busquets MA, Carilla J, Alsina MA, Haro, I. Effects of overlapping GB virus C/hepatitis G virus synthetic peptides on biomembrane models. *Langmuir* 2004; **20**: 11149–11160.
- 19 Larios C, Christiaens B, Gomara MJ, Alsina MA, Haro I. Interaction of synthetic peptides corresponding to hepatitis G virus (HGV/GBV-C) E2 structural protein with phospholipid vesicles. *FEBS J.* 2005; **272**: 2456–2466.
- 20 Herrera E, Tenckhoff S, Gomara MJ, Galatola R, Bleda MJ, Gil C, Ercilla G, Gatell JM, Tillmann HL, Haro I. Effect of synthetic peptides belonging to E2 envelope protein of GB virus C on human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Med. Chem.* 2010; **53**: 6054–6063.
- 21 Haro JP. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988; **85**: 5409–5413.
- 22 Futaki S, Sogawa K, Maruyama J, Asahara T, Niwa M, Hojo H. Preparation of peptide thioesters using fmoc-solid-phase peptide synthesis and its application to the construction of a template-Assembled Synthetic Protein (TASP). *Tetrahedron Lett.* 1997; **38**: 6237–6240.
- 23 Haro I, Perez S, Garcia M, Chan WC, Ercilla G. Liposome entrapment and immunogenic studies of a synthetic lipophilic multiple antigenic peptide bearing VP1 and VP3 domains of the hepatitis A virus: a robust method for vaccine design. *FEBS Lett.* 2003; **540**: 133–140.
- 24 Futaki S, Tatsuto K, Shiraishi Y, Sugiura Y. Total synthesis of artificial zinc-finger proteins: Problems and perspectives. *Biopolymers* 2004; **76**: 98–109.
- 25 Parkhouse SM, Garnett MC, Chan WC. Targeting of polyamidoamine-DNA nanoparticles using the Staudinger ligation: Attachment of an RGD motif either before or after complexation. *Bioorg. Med. Chem.* 2008; **16**: 6641–6650.
- 26 Kowalczyk W, de la Torre BG, Andreu D. Strategies and limitations in dendrimeric immunogen synthesis. the influenza virus M2e epitope as a case study. *Bioconjug. Chem.* 2010; **21**: 102–110.
- 27 Monso M, Tarradas J, de la Torre BG, Sobrino F, Ganges L, Andreu D. Peptide vaccine candidates against classical swine fever virus: T cell and neutralizing antibody responses of dendrimers displaying E2 and NS2-3 epitopes. *J. Pept. Sci.* 2011; **17**: 24–31.
- 28 George SL, Varmaz D, Stapleton JT. GB virus C replicates in primary T and B lymphocytes. *J. Infect. Dis.* 2006; **193**: 451–454.
- 29 Naider F, Anglister J. Peptides in the treatment of AIDS. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2009; **19**: 473–482.

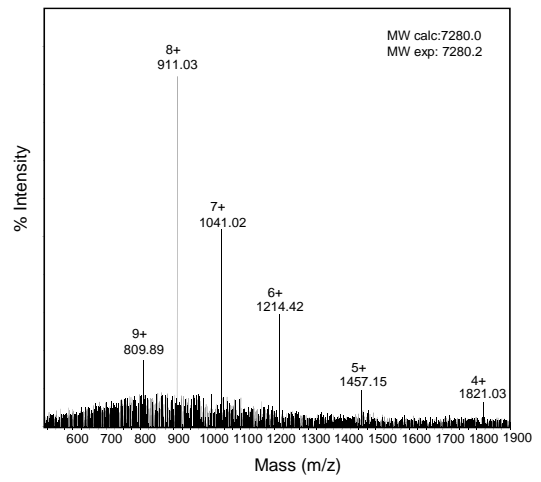
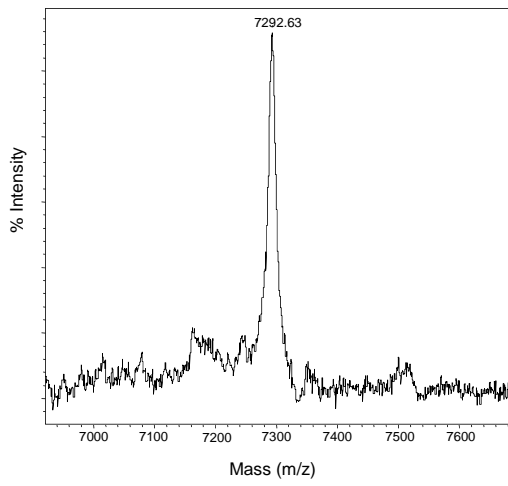
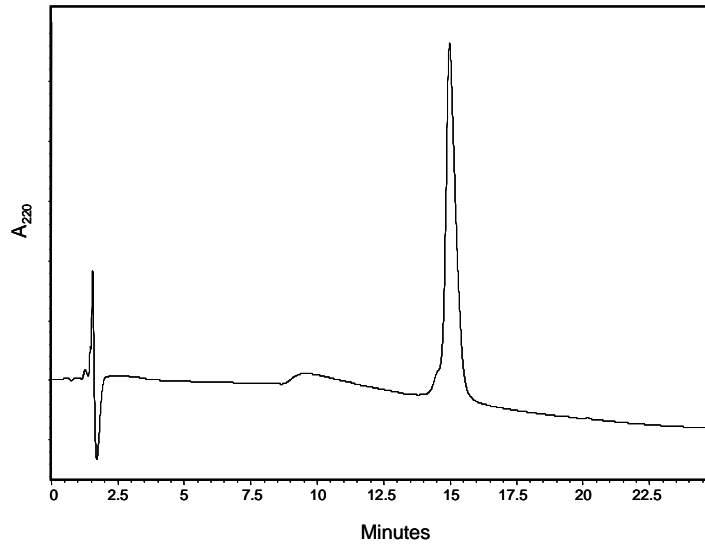
Supplementary Material

Figure 1. Characterization of purified linear tetrameric MAPs. HPLC chromatograms, MALDI-TOF and ES-MS spectra of: A) MAP_{LP1}; B) MAP_{LP2}; C) MAP_{LP3}. HPLC conditions: 5-95% linear gradient of eluent B into A over 25 min. Solvent A was 0.05% TFA in water and solvent B was 0.05% TFA in acetonitrile. Analytical C₁₈ column. MAP_{LP1} calculated mass: 8869.7, experimental mass (ES-MS): 8869.9; MAP_{LP2} calculated mass: 7280.0, experimental mass (ES-MS): 7280.2; MAP_{LP3} calculated mass: 4701.1, experimental mass (ES-MS): 4701.1

A)



B)



c)

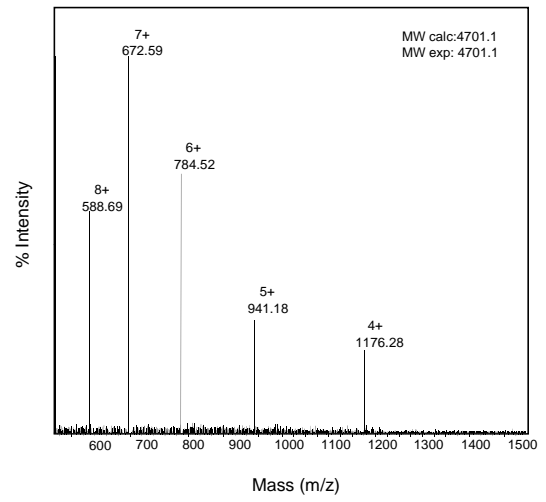
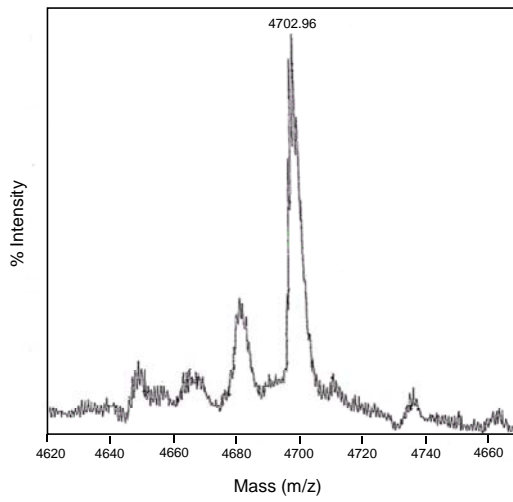
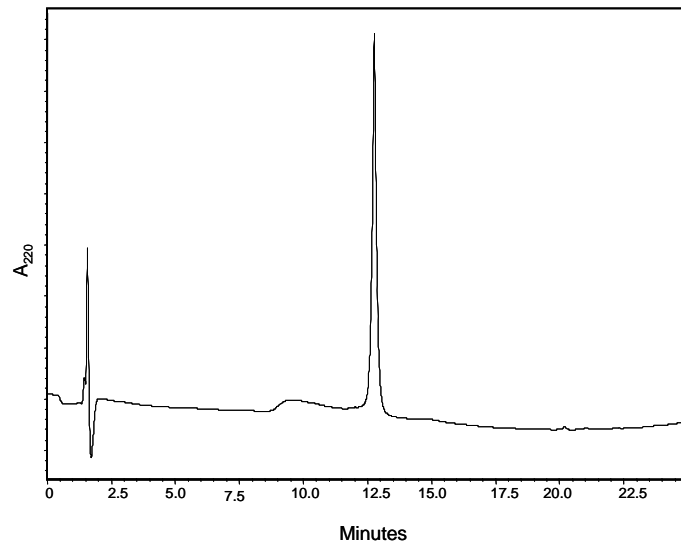


Figure 2. HPLC and ES-MS characterization of purified tetrachloroacetylated oligolysine core. HPLC conditions: 5-95% linear gradient of eluent B into A over 20 min. Solvent A was 0.05% TFA in water and solvent B was 0.05% TFA in acetonitrile. Analytical C₁₈ column. Calculated mass: 778.5; experimental mass: 778.3

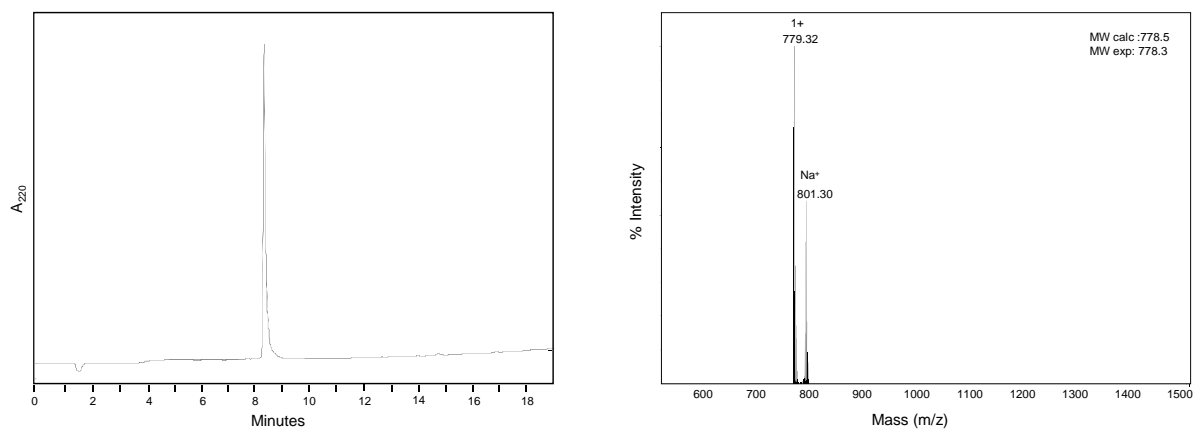
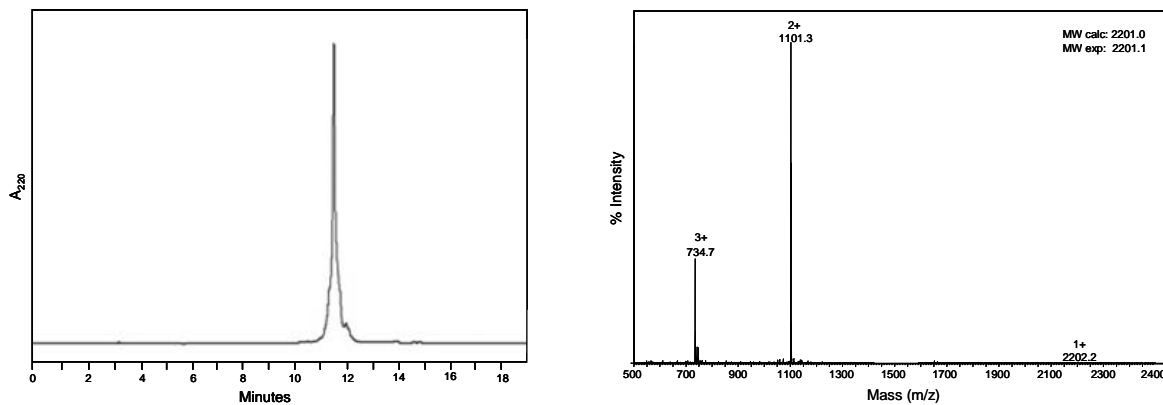
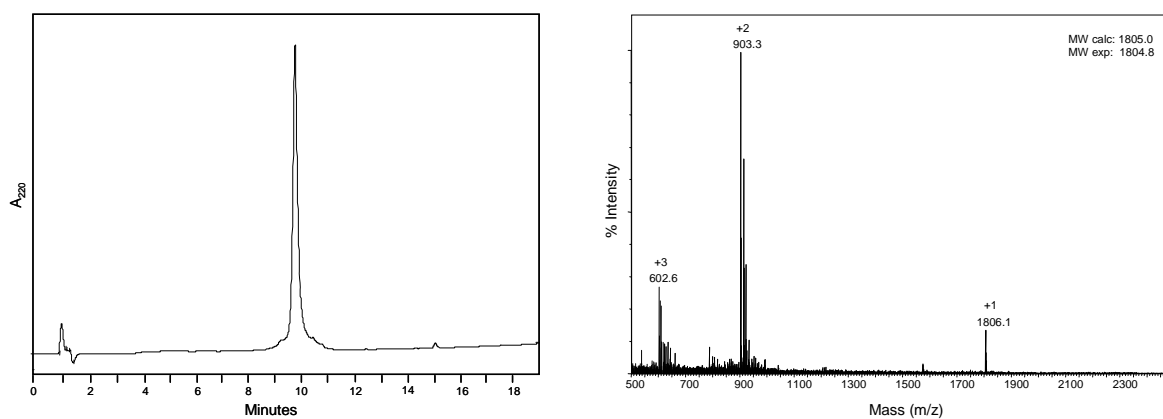


Figure 3. HPLC and ES-MS characterization of A) CP1, B) CP2 and C) CP3. HPLC conditions: 5-95% linear gradient of eluent B into A over 20 min. Solvent A was 0.05% TFA in water and solvent B was 0.05% TFA in acetonitrile. Analytical C₁₈ column. CP1 calculated mass: 2201.0, experimental mass: 2201.1; CP2 calculated mass: 1805.0, experimental mass: 1804.8; CP3 calculated mass: 1159.5, experimental mass: 1159.6.

A)



B)



C)

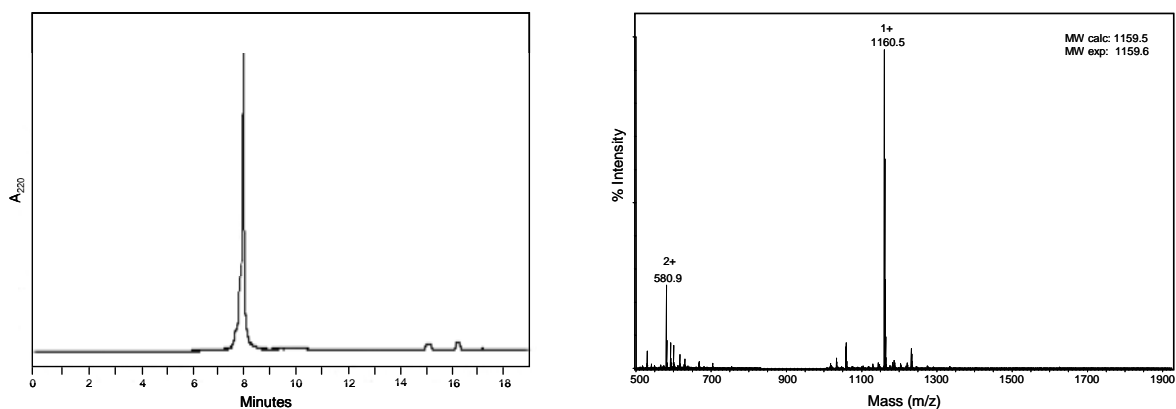
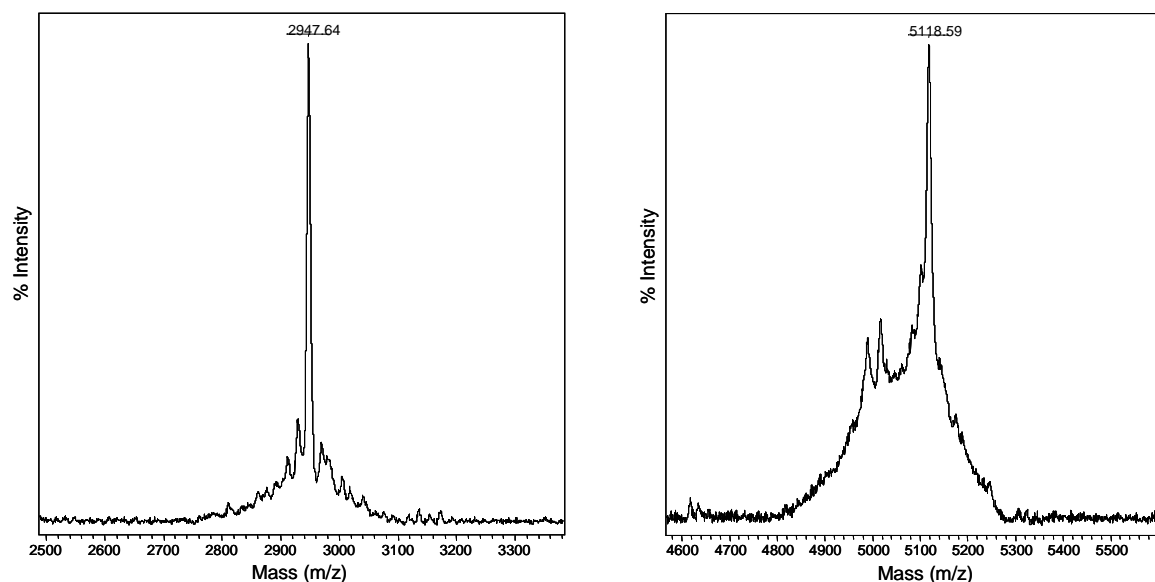


Figure 4. MALDI-TOF of A) MAP_{CP1-1} and MAP_{CP1-2}; B) MAP_{CP2-1} and MAP_{CP2-2}
MAP_{CP1-1} calculated mass: 2944.50, experimental mass: 2947.64; MAP_{CP1-2} calculated mass: 5110.45, experimental mass: 5118.59; MAP_{CP2-1} calculated mass: 2547.07, experimental mass: 2547.94; MAP_{CP2-2} calculated mass: 4315.58, experimental mass: 4307.07.

A)



B)

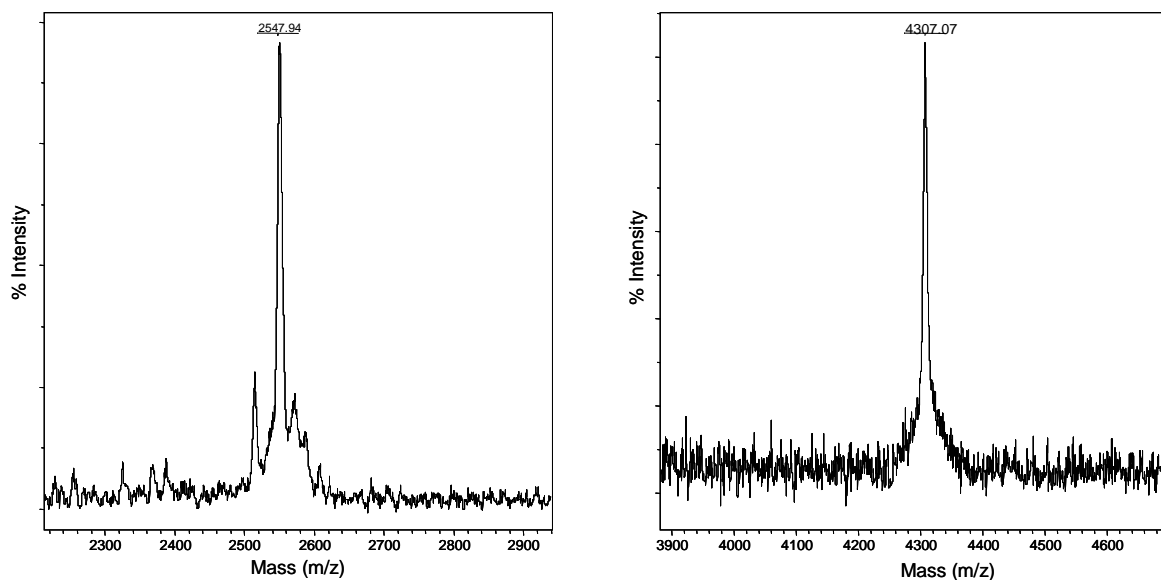


Figure 5. Comparison of cyclic peptides reactivity

