

Antigenicidad de dos péptidos sintéticos de la región de transmembrana (gp41) del VIH-1 y su utilidad en el inmunodiagnóstico

Milnen Hernández Marín, Lilliam Pozo Peña,* Ivonne Gómez Cordero y Antonio Melchor Rodríguez.**

Departamento de Síntesis de Péptidos,* Departamento de Retrovirus,** Departamento de Purificación de Proteínas, División de Inmunología, Centro de Inmunoensayo, Calle 134 y Avenida 25, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 25 de marzo del 2000. Aceptado: 7 de noviembre del 2000.

Palabras clave: VIH, péptidos sintéticos, antigenicidad, UMELISA.
Key words: HIV, synthetic peptides, antigenicity, UMELISA.

RESUMEN. El virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), es el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Los genes virales codifican la síntesis de las proteínas del núcleo (gag), enzimas (pol), proteínas de envoltura (env) y un determinado complejo de proteínas reguladoras. El gen env codifica la síntesis de la proteína precursora, gp160, que es degradada por una proteasa del virus en dos proteínas: gp41 y gp120. La presencia de anticuerpos contra los antígenos de la envoltura es sumamente importante para el diagnóstico de la infección por VIH. El uso de la proteína gp41, obtenida por la tecnología del ADN recombinante y por síntesis química, se utiliza ampliamente en el diagnóstico del VIH-1. En este sentido, resultan muy utilizados los péptidos sintéticos por la elevada sensibilidad y especificidad de los ensayos. En el presente trabajo, se evaluó la antigenicidad de dos péptidos sintéticos de la región de transmembrana (gp41) del VIH-1, el péptido A (585-608) y el H-18 (587-617) frente a 15 muestras positivas procedentes de Paneles de Seroconversión (Boston Biomedica Inc.) y 19 muestras de seropositivos cubanos al VIH-1. La especificidad de los péptidos se evaluó con 30 muestras de sueros de donantes de un banco de sangre. Se utilizó como ensayo de referencia el UMELISA HIV 1+2 Recombinant (Tecnosuma Internacional, S.A., Cuba), para la detección de anticuerpos contra el VIH-1, todas las muestras utilizadas en el estudio fueron confirmadas por el ensayo de Western Blot. Se obtuvo un 53 % de sensibilidad para el péptido A y un 100 % de sensibilidad para el péptido H-18. La especificidad de ambos péptidos fue del 100 %. Este estudio demostró la utilidad del péptido H-18 como antígeno para la detección de anticuerpos al VIH-1 y su posible aplicación diagnóstica.

ABSTRACT. The Human Immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is the cause of the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). The viral genes encode the synthesis of core structural proteins (gag), enzymes (pol), envelope proteins (env) and complex set of regulatory proteins. The env gene encode the synthesis of protein precursor, gp160, that is cleaved by the virus protease into two proteins: gp41 and gp120. The presence of antibodies against the envelope antigens is very important for diagnostics of HIV infection. The use of gp41 protein, obtained by DNA recombinant technology and chemical synthesis is very used in the VIH-1 diagnosis. In this sense, the synthetic peptides are very used by high sensitivity and specificity of the assays. In the present work the antigenicity of two synthetic peptides peptide A (585-608) and peptide H-18 (587-617) from gp41 transmembrane region of HIV-1 were tested with 15 positive samples from the Boston Biomedica Seroconversion Panels and 19 sera from seropositive Cuban people to HIV-1. In order to assess specificity of those peptides, 30 serum samples from healthy blood donors were tested. UMELISA HIV 1+2 Recombinant assay (Tecnosuma Internacional, S.A., Cuba) was used as reference for detection of antibodies to HIV-1, all samples used in the study were confirmed by Western Blot assay. There was a sensitivity of 53 % for peptide A and 100 % of sensitivity for peptide H-18. Specificity for both peptides was 100 %. This study showed the usefulness of the H-18 peptide as an antigen to detect antibodies to HIV-1 and its possible diagnostic application.

INTRODUCCION

El virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH),¹ el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA),² es un lentivirus de la familia de los retrovirus,³ cuya estructura genética está formada, al igual que el resto de los retrovirus, por genes estructurales (gag, pol, env) y genes reguladores (nef, tat, rev, vpr, vpu, vif).

El gen gag codifica la síntesis de las proteínas del núcleo, que constituyen la estructura central del virus y el gen env codifica la síntesis de las proteínas de la envoltura del virus a través de un precursor, la glicoproteína gp160, que no es un componente estructural, sino que se produce durante la infección, pero luego se degrada para formar las glicoproteínas estructurales de la envoltura gp41⁴ y gp120.⁵ El antígeno gp41 se encuentra entre la membrana externa e interna y se le denomina glicoproteína de transmembrana. Este antígeno particular contiene zonas variables y puede ser muy específico para cada tipo o cepa del virus.

La presencia de anticuerpos contra los antígenos de la envoltura⁶ es sumamente importante para el diagnóstico de la infección por VIH y por lo menos un componente de esta región debe ser detectado para confirmar la infección.

Se conoce del uso de la gp41, obtenida por la tecnología del ADN recombinante⁷ o por síntesis química,⁸

en el diagnóstico del VIH-1. En este sentido, resultan ampliamente utilizados los péptidos sintéticos por la elevada sensibilidad y especificidad de los ensayos en los que son empleados.^{9,10}

En 1995, S Rolf-Dietrich *et al.*¹¹ reportaron la unión molecular del fragmento Fab del anticuerpo monoclonal 3D6 con el epítipo CSGKLICTTAVPW, de la proteína de membrana gp41 del VIH-1, correspondiente a los aminoácidos 605-617 e identificado como el de mejor unión al anticuerpo monoclonal, con una $K_D = 1 \cdot 10^{-8}$ mol/L.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se decidió evaluar la antigenicidad y especificidad de dos péptidos sintéticos de la región de transmembrana del virus, que contenían en su secuencia este epítipo, para evaluar su utilidad en el inmunodiagnóstico del VIH-1.

MATERIALES Y METODOS

Todos los disolventes (diclorometano: DCM, 2-propanol, *N,N*-dimetilformamida: DMF) (Merck) y los reactivos (ácido trifluoroacético: TFA, *N*-etil-diisopropilamina: DIEA, *N,N'*-diisopropilcarbodiimida: DIPCDI, dimetilsulfuro, 1,2-etanoditiol, *p*-cresol, anisol) (Merck) y el ácido fluorhídrico (Fluka) utilizados fueron puros para síntesis. El acetonitrilo y ácido trifluoroacético empleados en la purificación de los péptidos fueron puros para análisis (BDH).

Los derivados de L-aminoácidos (Boc-aminoácidos) utilizados en la síntesis de los péptidos fueron de elevada pureza (Bachem). En la síntesis de péptidos se empleó el grupo protector *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) para la protección del grupo amino terminal. En los aminoácidos trifuncionales los grupos protectores de las cadenas laterales fueron: el grupo benzilo (Bzl) para el ácido aspártico, ácido glutámico, serina y treonina; el grupo 4-metoxibencilo (Mob) para cisteína; el grupo dinitrofenilo (DNP) para histidina; el grupo *o*-cloro-benzilcarbonilo para lisina; el grupo tosilo (Tos) para arginina; el grupo 2,6-dicloro-benzilo para tirosina y el grupo formilo (For) para triptófano. No tenían protección los aminoácidos alanina, fenilalanina, glicina, isoleucina, leucina, asparagina, glutamina, prolina y valina.

Se disolvieron los Boc-aminoácidos en la cantidad de disolvente calculada (0,2 mol/L). Como soporte sólido se empleó la resina 4-metilben-

zilhidrilamina (MBHA 1,1 mmol/g, 100-200 mallas, Bachem).

Síntesis de péptidos

Todos los péptidos fueron obtenidos mediante síntesis química en fase sólida,¹² empleando la estrategia Boc en bolsas de polipropileno. Las reacciones de acoplamiento se realizaron a temperatura ambiente, por activación del grupo carboxilo de cada aminoácido con *N,N'*-diisopropilcarbodiimida¹³ a 0,2 mol/L en DCM y fueron verificados por el ensayo cualitativo de la ninhidrina.¹⁴ El grupo Boc fue eliminado con ácido trifluoroacético 37,5 % en diclorometano. La desprotección final se realizó mediante el procedimiento "Low-High HF", utilizando ácido fluorhídrico,^{15,16} para eliminar los grupos protectores de las cadenas laterales y la ruptura del péptido de la resina. Posteriormente, las bolsas se lavaron con éter dietílico y se secaron al vacío. Se extrajeron los péptidos de la resina con ácido acético 30 % en agua destilada. El extracto final se diluyó con agua y se liofilizó.

Purificación de los péptidos

Los péptidos se purificaron por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en fase reversa (RP-HPLC, Pharmacia, LKB).¹⁷ En una columna RP18 (Pharmacia) se aplicaron 200 μ L de la muestra (0,2 mg/mL). Se eluyó con el empleo de un sistema de gradiente A/B de 0 a 60 % B (A TFA 0,1% (V/V) y acetonitrilo 2 % (V/V) en H₂O; B TFA 0,05 % (V/V) en acetonitrilo), un flujo de 0,5 mL/min; una velocidad del papel de 2 mm/min; una sensibilidad de 1 unidad de absorbancia, a 22 °C.

Caracterización de los péptidos

La caracterización de los péptidos, se realizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption of Ions Time-of-Flight).^{18,19} En un espectrómetro de masas Bruker Protein TOF-TM (USA) se bombardeó la muestra con luz láser, se aplicó un campo eléctrico de 3 ns, a una longitud de onda de 337 nm. La matriz empleada fue el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (Sigma).

Recubrimiento de las placas UltramicroElisa (UMELISA)

Cada péptido se diluyó en disolución reguladora carbonato-bicarbonato, 0,05 mol/L; pH 9,6, a una concentración de 2 mg/mL. Con esta disolución, se recubrieron placas de poliestireno con capacidad para

30 mL (placas UMELISA, Greiner labortechnik, Alemania), se añadieron 15 mL/pocillo de ella y se incubó durante 3 h a 37 °C. La fase sólida se lavó con una disolución amortiguadora de SSAFTween 20 (disolución salina amortiguadora de fosfato) (8 g de NaCl; 1,215 g de Na₂HPO₄ · 2H₂O; 0,2 g de KH₂PO₄; 0,2 g de NaN₃; 0,5 mL de Tween-20; para 1 000 mL de agua destilada y pH de 7,3 a 7,5). A continuación, se bloqueó con una disolución de preservio (BSA al 1 % en SSAFTween 20), durante toda la noche a temperatura ambiente. Las placas se conservaron a 4 °C, con una cubierta protectora, hasta el momento de su uso.

Muestras de sueros

Se analizaron 14 muestras del Panel de Seroconversión PRB-903 y cinco muestras del Panel de Seroconversión PRB-918, (Boston Biomedica Inc.), confirmadas por el ensayo Western Blot (WB). Para el Panel PRB903, se empleó el Western Blot Dupont (USA) y para el Panel PRB918 el Western Blot Cambridge Biotech (USA), información enviada por el suministrador (Tablas 1 y 2). Se analizaron 19 muestras de seropositivos cubanos al VIH-1 procedentes del Laboratorio de Investigaciones del SIDA (LISIDA) (La Habana, Cuba), evaluadas por el ensayo Western Blot (Davih Blot) (Habana, Cuba), para confirmar la presencia de anticuerpos específicos al VIH-1 (Tabla 3) y 30 muestras de donantes del Banco de Sangre de Marianao (La Habana, Cuba) para evaluar la especificidad de los péptidos sintéticos.

Para el ensayo UMELISA las muestras no fueron previamente tratadas, se diluyeron según aparece en el procedimiento del ensayo.

Como controles positivos y negativos se emplearon los del ensayo UMELISA HIV 1+2 Recombinant (TecnosUMA Internacional, Cuba).

Ensayo UMELISA

Las muestras a evaluar se diluyeron 1:20 en disolución amortiguadora Tris-HCl (15 mmol/L de Tris; pH 7,8 y 0,05 % Tween-20) en suero de carnero al 20 %, y se incubaron 30 min a 37 °C en las placas de reacción. Después de lavar tres veces con una disolución amortiguadora Tris-HCl, con el objetivo de eliminar los componentes no fijados, se adicionó un conjugado Anti-IgG humana en carnero marcada con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania). Se incubó nuevamente du-

Tabla 1. Muestras del Panel de Seroconversión PRB-903 (Boston Biomédica Inc.).

Muestras	Western Blot	Resultado
903-1	No bandas	Negativo
903-2	No bandas	Negativo
903-6	24,160	Positivo
903-7	24,160	Positivo
903-9	24, d41, d51, 55, 65, 120, 160	Positivo
903-10	24, 41, 51, 55, 65, 120, 160	Positivo
903-11	24, 41, 51, 55, 65, 120, 160	Positivo
903-12	18, 24, 31, 41, 51, 55, 65, 120, 160	Positivo
903-13	18, 24, 31, 41, 51, 55, 65, 120, 160	Positivo
903-14	18, 24, 31, 41, 51, 55, 65, 120, 160	Positivo
903-15	18, 24, 31, 41, 51, 55, 65, 120, 160	Positivo
903-16	18, 24, 31, 41, 51, 55, 65, 120, 160	Positivo
903-17	18, 24, 31, 41, 51, 55, 65, 120, 160	Positivo
903-18	18, 24, 31, 41, 51, 55, 65, 120, 160	Positivo

Tabla 2. Muestras del Panel de Seroconversión PRB 918 (Boston Biomédica Inc.).

Muestras	Western Blot	Resultado
918-2	No bandas	Negativo
918-3	Md p24	Indeterminado
918-4	24, 160	Positivo
918-5	24, 160	Positivo
918-6	24, md65, 160	Positivo

Tabla 3. Muestras de seropositivos cubanos al VIH-1.

Muestras	Western Blot	Resultado
C79	24, 55, 68, 120	Indeterminado (No seroconvertido)
C9	24, 34, 41, 53, 68, 120, 160	Positivo
C22	17, 24, 34, 41, 53, 55, 68, 120, 160	Positivo
C62	17, 24, 34, 41, 53, 55, 68, 120, 160	Positivo
C65	34, 41, 53, 55, 68, 120, 160	Positivo
C4	17, 24, 34, 41, 53, 55, 68, 120, 160	Positivo
C48	53, 55, 120	Seroconversión
C68	17, 24, 34, 41, 53, 55, 68, 120, 160	Positivo
C75	17, 24, 34, 41, 53, 55, 68, 120, 160	Positivo
C37	24, 34, 41, 53, 68, 120, 160	Positivo
C70	17, 24, 34, 41, 53, 55, 68, 120, 160	Positivo
C141	17, 24, 34, 41, 53, 55, 68, 120, 160	Seroconversión
C15	24, 41, 53, 68, 120	Positivo
C38	17, 24, 34, 41, 53, 55, 68, 120, 160	Positivo
C74	24, 34, 41, 53, 55, 68, 120, 160	Positivo
C64	17, 24, 34, 41, 53, 55, 68, 120, 160	Positivo
C60	17, 24, 34, 41, 53, 55, 68, 120, 160	Positivo
C67	34, 41, 53, 55, 68, 120, 160	Positivo
C86	17, 24, 34, 41, 53, 55, 68, 120, 160	Positivo

Título bajo de anticuerpos a estas proteínas del VIH-1.

rante 30 min a 37 °C y se realizó un nuevo lavado en las mismas condiciones, para eliminar el conjugado en exceso. Se añadió entonces el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferilfosfato (Koch Light Ltd. Haverhill, Suffolk, England), el que resultó hidrolizado por la enzima del conjugado, y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. La fluorescencia emitida fue medida en un fluorímetro de la serie SUMA* (PR-521, Centro de Inmunoensayo, Cuba). En todos los experimentos, se incluyeron controles positivos y negativos, y las muestras se analizaron por duplicado.

Nivel de corte

El nivel de corte (NC) fue de 0,3, determinado a partir del estudio de 1 000 muestras de sueros de donantes de banco de sangre y 200 muestras de sueros positivos al VIH-1, detectados como positivos por el ensayo comercial UMELISA HIV 1+2 Recombinant y además confirmados por Western Blot.

El valor de relación (VR) se definió como:

$$VR = \frac{(Fi - BB)}{(P - BB)}$$

donde:

Fi Fluorescencia de la muestra.

BB Valor promedio del Blanco.

P Menor valor de fluorescencia de los duplicados del Control Positivo.

Todos los valores numéricos fueron la media de los duplicados, expresados como el valor de relación para cada muestra respecto al nivel de corte (VR/NC). Las muestras fueron consideradas positivas cuando VR/NC ≥ 1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se sintetizaron dos péptidos: A (ILAVERYLKDQQLGIWGCSEKLI) y H-18 (ERYLKDQQLGIWGCSEKLICTTAVPWNA), representativos de la proteína gp41 de la región de transmembrana del VIH-1. Las secuencias de los dos péptidos fueron seleccionadas a partir del aislamiento Bru HIV-1 según Wain-Hobson y col. en 1985. El rendimiento obtenido para ambos péptidos fue mayor del 95 %.

La pureza de los péptidos fue comprobada por Cromatografía RP-HPLC y resultó del 95 %. Además, se caracterizaron por Espectrometría de Masas MALDI-TOF, proceso en el que los pesos moleculares obtenidos se correspondieron con los teóricos.

La evaluación de cada uno de los péptidos por separado, se analizó mediante el empleo de los Paneles de Seroconversión PRB-903 y PRB-918 (Boston Biomédica Inc.) (Fig. 1) y con 19 muestras de seropositivos cubanos al VIH-1 (Fig. 2). En todos los ensayos se utilizaron controles positivos y negativos, las muestras se analizaron por duplicado y todas las figuras se elaboraron con los valores medios de los dos duplicados que se realizaron.

Con los péptidos gp41(A) y gp41(H-18), se obtuvo una sensibilidad del 53 % y 100 % respectivamente, para el grupo de muestras positivas de ambos Paneles de Seroconversión y un 100 % de especificidad para las muestras negativas.

Con los péptidos gp41(A) y gp41(H-18), se obtuvo una sensibilidad del 94,12 % y 100 % respectivamente, para el grupo de muestras positivas analizadas. La muestra C-141, clasificada como de seroconversión y con bandas a las proteínas p17(débil), p24(fuerte), gp41(débil), p55(débil), gp120(débil), gp160(débil) por la prueba de confirmación (Western Blot), no fue detectada por el péptido gp41(A), esto pudo estar determinado porque no estuviera presente la secuencia completa del epítipo CSGKLICTTAVPW, aspecto importante para el reconocimiento de los anticuerpos en la muestra, o también por la exposición de sus determinantes antigénicos en las condiciones empleadas para su unión a la fase sólida (Fig. 2)

Las muestras C79 y C48 no fueron detectadas por ambos péptidos, debido a que no presentaron en la prueba de confirmación (Western Blot) bandas a la proteína gp41, por tanto, no había presencia de anticuerpos anti-gp41 en estas muestras. Como se refirió anteriormente, son muestras de pacientes que se encontraban en la etapa inicial de la infección, en la que aparecen anticuerpos contra las proteínas precursora del núcleo p55, p24 del núcleo y gp120 de la envoltura. La muestra C-79 fue clasificada como indeterminada, con bandas a las proteínas p24, p55, p68, gp120 y la muestra C48 está en el período de seroconversión, con bandas débiles a las proteínas p53, gp120 y una banda fuerte a la proteína p55.

Como se puede observar los valores de VR/NC obtenidos en la prueba de los péptidos con las muestras positivas de los Paneles de Seroconversión PRB-903 y PRB-918, fueron menores que los obtenidos con las muestras positivas de seropositivos cubanos, esto pudo estar determina-

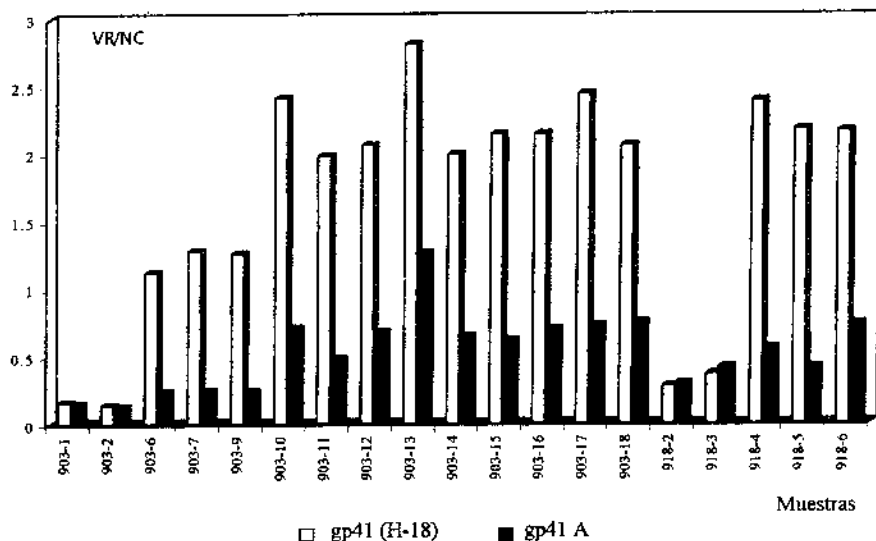


Fig. 1. Comportamiento de los péptidos gp41 (A) y gp41 (H-18) de la región de transmembrana del VIH-1 frente a los Paneles de Seroconversión PRB-903 y PRB-918 (Boston Biomédica Inc). Las muestras fueron consideradas positivas cuando VR/NC \geq 1.

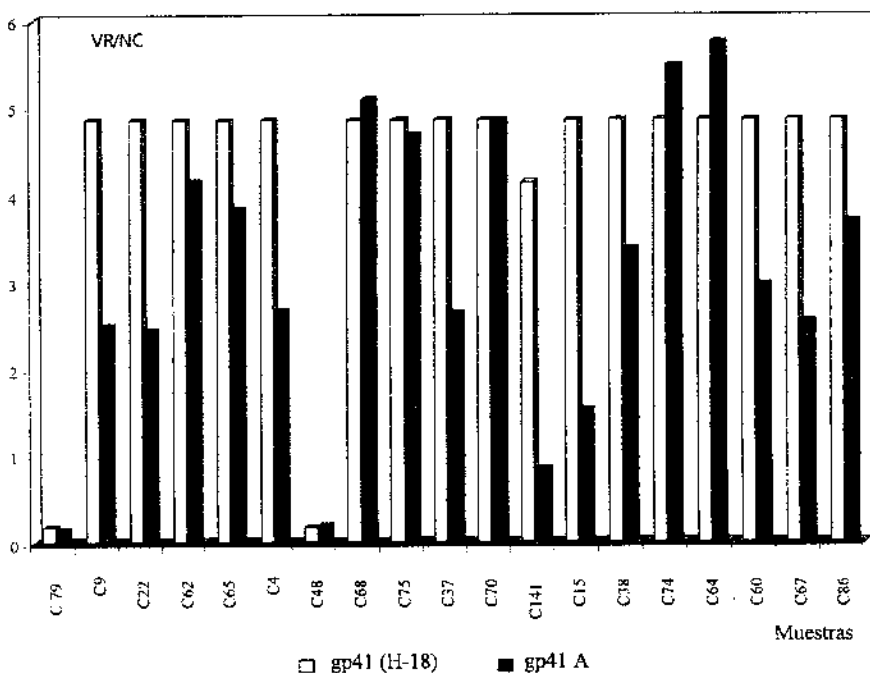


Fig. 2. Comportamiento de los péptidos gp41 (A) y gp41 (H-18) de la región de transmembrana del VIH-1 frente a muestras de seropositivos cubanos al VIH-1. Las muestras fueron consideradas positivas cuando VR/NC \geq 1.

do porque los paneles de muestras en seroconversión presentaban sueros que se encontraban en los primeros estados de la infección, en los que los títulos de anticuerpos son bajos y fundamentalmente a la proteína p24 del núcleo del virus y a la proteína precursora de la envoltura gp160, en la que puede estar presentes algunos epítomos que se conservan en la glicoproteína gp41 cuando la proteína gp160 se degrada para formar las glicoproteínas estructurales de la envoltura gp41 y gp120. Además, es

posible que estuvieran presentes los epítomos en la secuencia peptídica, pero no expuestos cuando el péptido queda adsorbido a la fase sólida. Por el contrario las muestras de seropositivos cubanos se correspondieron con una etapa más avanzada de la infección, con elevados títulos de anticuerpos a todas las proteínas, lo que permite un mejor reconocimiento de los epítomos en el péptido por los anticuerpos en las muestras.

Con el objetivo de determinar la especificidad de los dos péptidos, se

analizaron 30 muestras de sueros de donantes de un banco de sangre (Fig. 3).

Para los dos péptidos, los resultados fueron negativos, para las muestras analizadas se obtuvo un valor de relación o valor normado (R/NC < 1).

Los resultados demuestran la utilidad de estos péptidos sintéticos, siendo el de mejor comportamiento el péptido gp41 (H-18), para la detección de anticuerpos específicos a la proteína gp41, uno de los principales marcadores serológicos de la infección por VIH-1, que en unión con proteínas de otras regiones del virus pueden ser empleados en el pesqui-

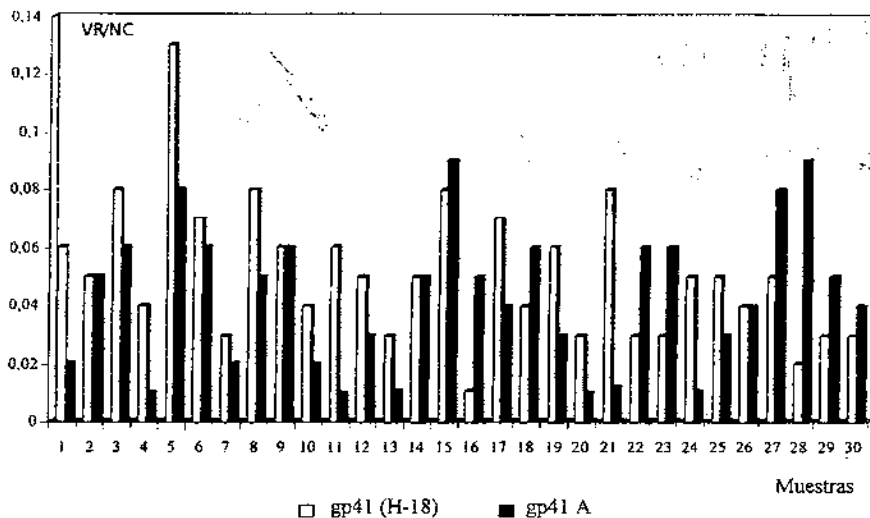


Fig. 3. Comportamiento de los péptidos gp41 (A) y gp41 (H-18) de la región de transmembrana del VIH-1 frente a muestras de sueros de donantes de banco de sangre.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron dos péptidos mediante síntesis química en fase sólida, de la región de transmembrana (gp41) del VIH-1, ambos de elevada sensibilidad frente a muestras positivas. Se demostró que es importante la presencia de la secuencia CSG-KLICCTTAVPW para el reconocimiento de anticuerpos al VIH-1, además de la exposición adecuada de los determinantes antigénicos en el péptido, en las condiciones empleadas para su unión a la fase sólida. Las muestras C-79 y C48 no fueron detectadas por ambos péptidos, debido a que no presentaron en la prueba de confirmación (Western Blot) bandas a la proteína gp41, que son las secuencias representadas por los péptidos. Ambos péptidos fueron muy específicos frente a muestras negativas. Los resultados demostraron la antigenicidad de los péptidos sintetizados, siendo mayor en el péptido gp41 (H-18), el que resulta de gran utilidad para el inmunodiagnóstico del VIH-1.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Investigaciones del SIDA por facilitar las muestras de seropositivos cubanos al VIH-1, para el desarrollo de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. Albert J., Gaines H., Sonnerborg A. Isolation of human immunodeficiency virus (HIV) from plasma during primary HIV infection. *J. Med. Virol.*, **23**, 67, 1987.
2. Barre Sinoussi F., Chermann J.C., Rey F., Nugeyre M.T., Chamaret S., Gruest J., et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220**, 868, 1983.

3. Wain-Hobson S. *Retroviruses. Science*, **282**, 55, 1998.
4. Calarota S., Jansson M., Levi M., Brodiden K., Libonatti O., Wigzell H., et al. Immunodominant glycoprotein 41 epitope identified by seroreactivity in HIV type-1 infected individuals. *AIDS-Res-Hum-Retroviruses*, **8**, 705, 1996.
5. Wyatt R., Kwong P.D., Desjardins E., Sweet R.W., Robinson J., Hendrickson W.A. and Sodroski J.G. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature*, **393**, 705, 1998.
6. Barin F., McLane M.F., Allan J.S., Lee T.H., Groopman J.E. and Essex M. Virus envelope protein of HTLV-III represents major target antigen for antibodies in AIDS patients. *Science*, **228**, 1094, 1985.
7. Han B.G., Meng L., Song X.G., Chen Q., Won H.Y., Ling S.G. The use of a chimera HIV-1/HIV-2 envelope protein for immunodiagnosis of HIV infection: Its expression and purification in *E. Coli* by use of a translation initiation site within HIV-1 env gene. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **46**, 607, 1998.
8. Hashida S., Ishikawa S., Hashinaka K., Nishikata I., Oka S., Ishikawa E. Immune complex transfer enzyme immunoassay for antibody IgG to HIV-1 gp41 antigen using synthetic peptides as antigens. *J. Clin. Lab. Anal.*, **12**, 197, 1998.
9. Fenouillet E., Sorensen A.M., Lacroix M., Coutellier A., Herson S., Fretz F.C., et al. Early and specific diagnosis of seropositivity to HIVs by an enzyme-linked immunosorbent assay using env-derived synthetic peptides. *AIDS*, **4**, 1137, 1990.
10. Ondoa P., Willems B., Fransen K., Nkengasong J., Janssens W., Heyndrick K.X.L. Evaluation of different V3 peptides in an enzyme immunoassay for specific HIV type 1 group O anti-

- body detection. *AIDS. Res. Hum. Retrovir*, **14**, 963, 1998.
11. Rolf-Dietrich Stigler, Florian Ruker, Dietmar Katinger, Graham Elliott, Wolfgang Hohne., Henklein Peter, et al. Interaction between a Fab fragment against gp41 of human immunodeficiency virus 1 and its peptide epitope: characterization using a peptide epitope library and molecular modeling. *Protein Eng.*, **8**, 471, 1995.
12. Merrifield R.D. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149, 1963.
13. Hudson D. Methodological implications of simultaneous solid-phase peptide synthesis. I. Comparison of different coupling procedures. *J. Org. Chem.*, **53**, 617, 1988.
14. Sarin V.K., Kent S.V.H., Tam J.P. and Merrifield R. B. Quantitative Monitoring of Solid-Phase Peptide Synthesis by the Ninhydrin Reaction. *Anal. Biochem.*, **117**, 147, 1981.
15. Tam J.P., Heath W.F. and Merrifield R. B. SN₂ deprotection of synthetic peptides with a low concentration of HF in dimethyl sulfide: evidence and application in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 6442, 1983.
16. Tam J.P., Heath W.F., Merrifield R. B. SN1 and SN2 mechanism for the deprotection of synthetic peptides by hydrogen fluoride. Studies to minimize the tyrosine alkylation side reaction. *Int. J. Pept. Protein. Res.*, **21**, 57, 1983.
17. Hearn M.T.W. High resolution reversed phase chromatography. in *Protein purification. Principles high resolution methods, and applications.* (Ed. Janson, J.C., Rydén, L.) VCH, New York, 175-206, 1989.
18. Burlingame A.L., Boyd R.K. and Gaskell S.J. Mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **68**, 599R, 1996.
19. Biemann K. Mass spectrometry of peptides and proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, **61**, 977, 1992.