Comparación de la antigenicidad de un péptido sintético y una proteína recombinante de la región de transmembrana (gp41) del VIH-1.

Milenen Hernández Marin[1], Lilliam Pozo Peña[2], Ivonne Gómez Cordero[1], Chryslaine Rodríguez Tanty [3], David Higginson Clarke[3]

[1] Laboratorio de Síntesis de Péptidos, Centro de Inmunoensayo
[2] Laboratorio de Retrovirus, Centro de Inmunoensayo.
[3] Laboratorio de Biología Molecular, Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

Correspondencia a:
Milenen Hernández Marin
Centro de Inmunoensayo. Calle 134 y Ave 25. Reparto Cubanacán. Apartado 6945. Playa. Ciudad Habana. Cuba.
Teléfono: (537) 2082928 al 30 ext. 319
Email: iqpeptidos@cie.sld.cu

Recibido: 6 de junio de 2003 Aceptado: 8 de junio de 2003.

Palabras clave: péptido sintético, proteína recombinante, gp4l, antigenicidad
Key words: synthetic peptide, recombinant protein, gp41, antigenicity.

RESUMEN: El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), es el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). El gen env codifica la síntesis de la proteína precursora, gp160, que es degradada por una proteasa del virus en dos proteínas: gp4l y gp120. La presencia de anticuerpos contra la proteína gp4l es importante para la detecci6n de temprana de la infección por VIH. Los péptidos sintéticos y proteínas recombinantes de la proteína gp4l, son ampliamente utilizadas en el inmunodiagnóstico del VIH-1. En el presente trabajo, se evaluó la antigenicidad de un péptido sintético H-18 (587-617) y una proteína recombinante de la región de transmembrana (gp4 1) del VIH-1, frente a 15 muestras positivas procedentes de Paneles de Seroconversión (Boston Biomedica Inc). La especificidad de estos antigenos se evaluó con 20 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 y 2, todas las muestras utilizadas en el estudio fueron confirmadas por el ensayo de Western Blot. Se obtuvo un 100% de sensibilidad para el péptido sintético y un 93,3 % para la proteína recombinante. La especificidad de ambos antígenos fue del 100 %. Este estudio demostró la alta antigenicidad del péptido sintético comparado con la proteína recombinante.

ABSTRACT: The human immunodeficiency virus (HIV) is the cause of the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). The env gene encodes the synthesis of the precursor protein gp160, that is cleaved by the virus protease into two proteins: gp41 and gp120. the presence of antibodies against the gp41 protein is very important for early diagnostic of HIV-1 infection. Synthetic peptides and recombinant proteins of gp41 subunit are very usefull in HIV-1 immuno-diagnostic. In the present work the antigenicity of a synthetic peptide H-18 (587-617) and a recombinant protein from gp41 transmembrane region of HIV-1 were tested with 15 positive samples from the Boston Biomedica Seroconversion Panels. In order to assess specificity of those antigens, 20 serum samples from healthy blood donors were tested. UMELISA HIV 1+2 Recombinant assay (TecnoSUMA International S.A., Cuba) was use as a reference for the detection of antibodies to HIV 1 and 2, all the samples used in the study were confirmed by Western Blot assay. There was a sensitivity of 100 % for the synthetic peptide and of 93,3 % for the recombinant protein. Specificity for both antigens was 100 %. This study showed the high antigenicity of the synthetic peptide as compared with the recombinant protein, and the usefulness of these antigens to detect antibodies to HIV-1.

INTRODUCCIÓN

El rápido progreso de la infección por el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) [1] ha permitido el desarrollo de pruebas diagnósticas [2] más simples, de bajo costo y de alta sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos anti-VIH en muestras de sangre.

El gen env codifica la síntesis de las proteínas de la envoltura del virus a través de un precursor, la glicoproteína gp160, que se degrada para formar las glicoproteínas estructurales de la envoltura gp4l [3] y gp120 [4]. Estas dos proteínas van a ubicarse en la cubierta lipídica de la proteína viral, constituyendo trímeros de heterodímeros, es decir. tres conjuntos formados por una subunidad gp4l y una gp120 cada uno.

La presencia de anticuerpos dirigidos contra la proteína gp4l, denominada de transmembrana, es importante para la detección temprana de la infección por VIH.
Se reporta el uso de la proteína gp4l, obtenida por la tecnología del ADN recombinante [5] o por síntesis química, [6] en el diagnóstico del VIH-1, por la elevada sensibilidad y especificidad de los ensayos en los que son empleados.

En un trabajo anterior [7] nosotros reportamos la obtención mediante síntesis química en fase sólida del péptido sintético H-18 (587-617) correspondiente a una región inmunodominante de la proteína gp4l, y su gran utilidad en el inmunodiagnóstico del VIH-1.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se decidió evaluar la antigenicidad y especificidad de este péptido sintético, comparado con una proteína recombinante, que contiene en su secuencia esta región.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Síntesis química en fase sólida, purificación y caracterización del péptido gp41

El péptido se obtuvo mediante síntesis química en fase sólida [8], empleando la estrategia Boc en bolsas de polipropileno. Posteriormente se purificó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa (RP-HPLC, Pharmacia, LKB) [9] en una columna RP18 (Pharmacia) (Sistema de gradiente A/B de 0 a 60% B (**A** TFA 0,1% (V/V) y acetonitrilo 2% (V/V) en H_2O ; **B** TFA 0,05% (V/V) en acetonitrilo).

La caracterización del péptido fue mediante espectrometría de masas *MALDI-TOF* (*Matrix-Assisted Laser Desorption of Ions Time-of-Flight*) [10,11]. Los procedimientos anteriores fueron descritos por Hernández M y col [7].

Proteína recombinante gp41

La proteína recombinante que se utilizó en este estudio fue suministrada por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (La Habana. Cuba), obtenida en *E coli*, con más del 95 % de pureza estimada por estándar SDS-PAGE y HPLC-RP analítico.

Recubrimiento de las placas UltramicroElisa (UMELISA)

El péptido se diluyó en disolución reguladora carbonato-bicarbonato, 0,05 mol/L; pH 9,6, a una concentración de 2 µg/mL Con esta disolución se recubrió la fase sólida empleada, placas de poliestireno con capacidad para 30 µL (placas UMELISA, Greiner labortechnik, Alemania), se añadió un volumen 15 µL/pocillo y se incubó durante 3 h a 3 7 ºC . La fase sólida se lavó con una disolución amortiguadora de PBS-T (8 g de NaCl, 1,215 g de $Na_2HP0_4 \bullet 2H_20$; 0,2 g de KH_2P0_4; 0,2 g de NaN_3, 0,5 ml de Tween-20: para un volumen de 1 000 mL de agua destilada y pH de 7,3-7,5). A continuación se bloqueó con una disolución de preservo (BSA al 1 % en PBS-Tween), durante toda la noche a temperatura ambiente. Las placas se conservaron a 4 ºC, con una cubierta protectora, hasta el momento de su uso.

Ensayo UltramicroELISA (UMELISA)

Las muestras a evaluar se diluyeron 1:20 en suero de carnero al 5 % en disolución amortiguadora Tris-HCI (15 mmol/L de Tris: pH 7,8 y 0.05 % Tween-20), y se incubaron 30 min a 37 ºC en las placas de reacción. Después de lavar tres veces con una disolución amortiguadora Tris-HCI, con el objetivo de eliminar los componentes no fijados, se adicionó un conjugado anti-IgG humana en camero marcada con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania). Se incubó nuevamente durante 30 min a 37 ºC se realizó un nuevo lavado en las mismas condiciones, para eliminar el conjugado en exceso. Se añadió entonces el sustrato fluorigénico *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). En todos los experimentos, se incluyeron controles positivos y negativos, y las muestras se analizaron por duplicado.

Muestras de suero

Se estudiaron 14 muestras del Panel de Seroconversión PRB-903 y cinco muestras del Panel de Seroconversión PRB-918, (Boston Biomedica Inc.), confirmadas por el ensayo de Western Blot (WB). Para el Panel PRB-903, se empleó el Western Blot Dupont (USA) y para el Panel PRB-918 el Western Blot Cambridge Biotech (USA), información enviada por el suministrador (Tablas 1 y 2). Para evaluar la especificidad del péptido sintético y la proteína recombinante se estudiaron 20 muestras de donantes del Banco de Sangre de Marianao (La Habana, Cuba).

Nivel de corte

El nivel de corte (NC) en el ensayo fue de 0,3.
El valor de relación (VR) se definió como:
VR= (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, expre-

Tabla 1. Muestras del Panel de Seroconversión PRB-903 (*Boston Biomedica 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

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

Tabla 2. Muestras del Panel de Seroconversión PRB-918 (*Boston Biomedica Inc*).

Muestras	Western Blot	Resultado
918-2	No bandas	Negativo
918-3	md24	Indeterminado
918-4	24,160	Positivo
918-5	24,160	Positivo
918-6	24,md65,160	Positivo

md Título muy bajo de anticuerpos a estas proteínas del VIH-1

sados 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 comparó la antigenicidad del péptido sintético H-18 (587-617) con una proteína recombinante, representativos de la proteína gp4l de la región de transmembrana del VIH-1. La pureza del péptido fue comprobada por Cromatografía RP-HPLC y resultó del 95%. Además se caracterizó por Espectrometría de Masas MALDI-TOF, proceso en el que el peso molecular obtenido se correspondió con el teórico. La evaluación del péptido sintético y la proteína recombinante por separado, se analizó mediante el empleo, de los Paneles PRB-903 y PRB-918 (Boston Biomedica Inc.) (Figura 1). En todos los ensayos se utilizaron controles positivos y negativos, las muestras se analizaron por duplicado.

Con el péptido sintético, y la proteína recombinante, se obtuvo una sensibilidad del 100 % y del 93,3 % respectivamente, para el grupo de muestras positivas analizadas y un 100 % de especificidad para las muestras negativas.

La muestra 903-6, clasificada como positiva y con bandas a las proteínas p24 y gp160 por la prueba de confirmación (Western Blot), no fue detectada por la proteína recombinante, esto puedo estar determinado porque la exposición de los determinantes antigénicos,

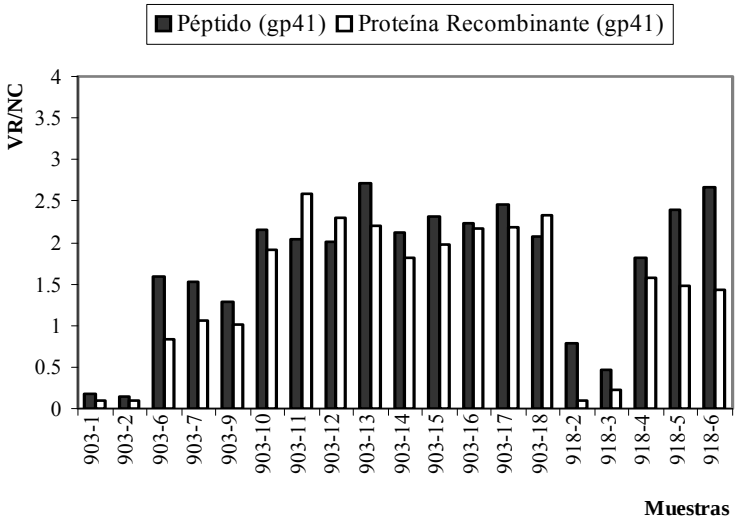

Figura 1. Comportamiento del péptido sintético H-18 (587-617) y de una proteína recombinante de la región de transmembrana (gp41) del VIH-1 frente a los Paneles de Seroconversión PRB-903 y PRB-918 (*Boston Biomedica Inc*.).

contra los que están dirigidos los anticuerpos presentes en esta muestra, no están expuestos en las condiciones empleadas para su unión a la fase sólida.

Con el objetivo de determinar la especificidad de los dos antígenos, se analizaron 20 muestras de sueros de donantes de un banco de sangre (Figura 2).

Las muestras fueron consideradas positivas cuando VR/NC ≥ 1.

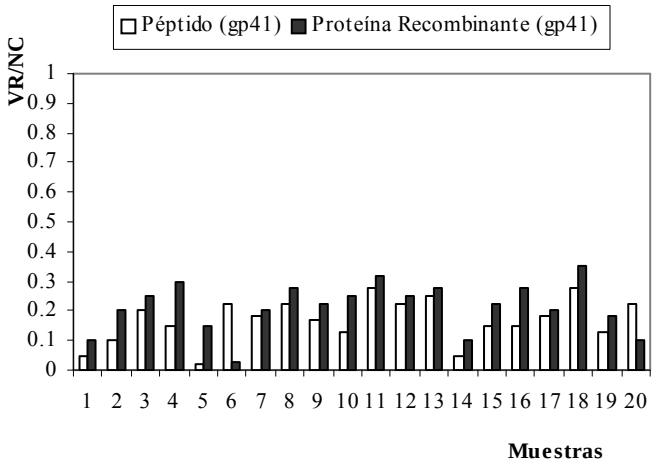

Figura 2. Comportamiento del péptido sintético H-18 (587-617) y de una proteína recombinante de la región de transmembrana (gp41) del VIH-1 frente a muestras de suero de donantes de un banco de sangre.

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

Los resultados demuestran que la antigenicidad del péptido sintético es similar comparada con la proteína recombinante, y además, detecta la muestra (903-6) que no es reconocida por la proteína recombinante, no obstante esta ú1tima ser una proteína, de mayor número de aminoácidos, por tanto, presenta un mayor número de epítopos y su estructura debe ser la más cercana a la natural.

CONCLUSIONES.

Se comparó la antigenicidad de un péptido sintético y una proteína recombinante, de la región de transmembrana (gp4 1) del VIH-1, ambos de elevada sensibilidad frente a muestras positivas al VIH-1. Se demostró que el péptido sintético tiene una antigenicidad similar a la proteína recombinante y detecta la muestra positiva 903-6 la que no es reconocida por esta última, lo que pudiera estar determinado porque el epítopo o los epítopos contra los que están dirigidos los anticuerpos de la muestra no se encuentran expuestos, en las condiciones empleadas para su unión a la fase sólida. Ambos antígenos presentaron una especificidad del 100 %, y resultan de gran utilidad para el inmunodiagnóstico, del VIH-1.

REFERENCIAS

1. Albert J., Gaines H. and Sonnerborg A. Isolation of human immunodeficiency virus (HIV) from plasma during priman HIV infection. **J Med Virol, 23**, 67, 1987.
2. 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.
3. Calarota S., Jansson M., Levi M., Broliden K., Libonatti O., Wigzell H., et al. Immunodominant glycoprotein 41 epitope identified by, seroreactivity in HIV type-1 infected individuals. **AIDS Res Hum Retroviruses, 8**, 705, 1996.
4. Wvatt R., Kwong P.D., Dejardins E., Sweet R.W., Robinson J., Hendrickson W.A. and Sodroski J.G. The antigenic structure of the HIV gpl20 envelope glycoprotein. **Nature, 393,** 705, 1998.
5. Han B.G., Meng L., Song X G., Chen Q., Won H.Y., and 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.
6. Hashida S., Ishikawa S., Hashinaka K., Nishikata I., Oka S., and Ishikawa E. Immune complex transfer enzyme inummoassav for antibody IgG to HIV-1 gp4I antigen using synthetic peptides as antigens. **J Clin Lab Anal, 12**,197, 1998.
7. Hernández M., Pozo L., Gómez I. y Melchor A. Antigenicidad de dos péptidos sintéticos de la región de transmembrana (gp4l) del VIH-1 y su utilidad en el inmunodiagnóstico. **Revista CENIC Cienc Biol, 32**,113, 2001.
8. Merrifield R B. The synthesis of a tetrapeptide. **J Am Chem Soc, 85**, 2149, 1963.
9. Mont C.T., Kandejewski L.H., Cachia P.J., Monera C.I.D. and Hodges R.S. Analysis of synthetic peptides by high performance liquid chromatography. **Methods Enzymol, 289,** 426, 1997.
10. Moore W.T. Laser desorption mass spectrometry. **Methods Enzymol, 289,** 499, 1997.
11. Biemann K. Mass spectrometry of peptides and proteins. **Annv. Rev Biochem, 61**, 977,