

03072  
13  
Leje.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
UACPyP/CCH



**Incremento de la Respuesta Inmunológica de  
Linfocitos T Dirigida contra *Mycobacterium leprae*,  
Utilizando Polímeros de Péptidos Sintéticos**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA

ALEXEI FEDOROVISH LICEA NAVARRO

CUERNAVACA, MORELOS

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1994



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Este trabajo fué realizado en el laboratorio del Dr. Lourival D. Possani Postay, en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Biotecnología/UNAM, Cuernavaca Morelos.**

**TUTORES:**

**Tutor:**

**Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte**

**Co-Tutores:**

**Dr. Lourival D. Possani Postay**

**Dra. Iris Estrada García**

**Esta tesis fué financiada en parte por los donativos Howard Hughes Medical Institute No 75191-527104, DGAPA-UNAM No IN205893, CONACyT No. 0018-N9105 y principalmente por la UNDP/ World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Disease No. T16/181/174. Estos donativos fueron concedidos al laboratorio del Dr. L.D. Possani.**

**A mis padres (Gela y Mema), por ser mi modelo de superación (que tal vez nunca logre alcanzar).**

**A mis hermanos (Nady y Meño), por ser dos de las personas que más quiero.**

**A mi esposa, por haberle dado esa nueva tonalidad a mi vida.**

## **Agradecimientos**

**Deseo agradecer al Instituto de Biotecnología, por el apoyo brindado al inicio de la maestría, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca que me otorgaron para la realización de este trabajo de investigación.**

**A la Dra. María del Carmen por orientarme en este camino incierto de la ciencia y enseñarme que no debo confiar en mi memoria.**

**Al Dr. Possani por enseñarme a ser minucioso en mis experimentos y por el apoyo incondicional que me ha brindado.**

**A la Dra. Iris Estrada por su apoyo y por orientar mi carrera hacia el mundo fascinante de la Inmunología.**

**A mis compañeros del laboratorio por su asistencia técnica: Sandra Contreras (HPLC), Timoteo Olamendi (HPLC y análisis de aminoácidos), Fernando Zamudio (Secuenciación de aminoácidos), Emma (por orientarme en el cultivo celular y por sacarme de todas mis dudas sobre Inmunología) y a Pedro Saucedo, por la realización de los dibujos de los cromatogramas que aparecen en el texto**

**A Alejandra y Marina, por haberme soportado durante nuestra convivencia.**

**Al Rafa, que desde Mexicali me estuvo brindando su apoyo incondicional para que lograra salir adelante.**

**A ustedes, GRACIAS.**

## Lista de Abreviaturas Empleadas en el Texto

Boc	Butiloxicarbonil
°C	Grados centígrados
Ci	Curies
cpm	Cuentas por minuto
DCM	Diclorometano
DTH	Hipersensibilidad tardía tipo IV
Fmoc	9-Fluoronilmetoxicarbonil
h	Horas
<sup>3</sup> H	Tritio
kDa	Kilodaltons
M	Molar
MAP	Péptido con antígenos múltiples
μCi	Microcuries
MHC II	Molécula del complejo principal de histocompatibilidad tipo II
μg	Microgramos
mcg	Microgramos
mg	Miligramos
min	Minutos
μL	Microlitros
mL	Millilitros
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
MLSE	Extracto soluble de <i>Mycobacterium leprae</i>
μm	Micras
mm	Milímetros
μmoles	Micromoles
mM	Millimolar
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTSE	Extracto soluble de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
N	Normal
N <sub>2</sub>	Nitrógeno
nmol	Nanomol
Rt	Tiempo de retención
U/mL	Unidades por mililitro

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1** Síntesis química de péptidos en fase sólida
- Fig. 2** Comparación de la síntesis automática y de la síntesis manual
- Fig. 3** Purificación de péptidos en gradiente y en isocrático
- Fig. 4** Comparación entre el tiempo de retención de un péptido reducido y uno oxidado
- Fig. 5** Estructura del MAP sintetizado
- Fig. 6** MAP antes y después de la adición del segundo péptido
- Fig. 7** Estimulación celular de nódulos linfoides con distintos sueros e inmunizados con MTSE
- Fig. 8** Estimulación celular de nódulos linfoides con distintas concentraciones de suero e inmunizados con MTSE
- Fig. 9** Estimulación de células linfoides de ratones Balb/c inmunizados con MTSE, MLSE o no inmunes

## **LISTA DE TABLAS**

- Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de los péptidos sintetizados y proteínas de las cuales provienen.**
- Tabla 2. Porcentaje de péptido con la secuencia correcta dentro de la mezcla cruda.**
- Tabla 3. Análisis de aminoácidos de dos de los péptidos sintetizados.**
- Tabla 4. Tiempo de máxima estimulación con diferentes antígenos.**



## INDICE

	PAGINA
I.- PRESENTACION	1
II.- INTRODUCCION	2
III.- ANTECEDENTES	9
IV.- OBJETIVOS	10
V.- MATERIALES Y METODOS	11
1. Síntesis de Péptidos	11
2. Purificación de los Péptidos y su Caracterización	14
3. Formación de Dímeros	14
4. Formación de MAPs	15
5. Micobacterias	16
6. Protocolo de Inmunización	16
7. Ensayos de Proliferación Celular <i>in vitro</i>	16
VI.- RESULTADOS Y DISCUSIONES	18
1. Síntesis y Purificación de Péptidos	18
2. Análisis de Aminoácidos	20
3. Formación de Dímeros	20
4. Formación de MAPs	25
5. Ensayos de Linfoproliferación	25
VII.- CONCLUSIONES	36
VIII.- PERSPECTIVAS	37
IX.- REFERENCIAS	38
X.- ANEXOS	43

## **PRESENTACION**

**Esta tesis consta de dos partes: una de ellas, una tesis propiamente dicha, con introducción, antecedentes, material y métodos, resultados y discusión de datos no publicados; y, una segunda parte constituida por un artículo científico (como co-autor) aceptado para su publicación en la revista "Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology". Este último se adjunta como un anexo de la tesis.**

## INTRODUCCION

La lepra es una enfermedad que afecta a más de 10 millones de humanos. Solamente la India contaba recientemente con 5 millones de leproso, en Brasil hay más de 200 mil leproso y en México existen más de 16 mil casos registrados, siendo los estados de mayor incidencia: Sinaloa, Colima, Nayarit y Guanajuato, entre otros(17). A pesar de los intentos realizados para su erradicación, la enfermedad sigue en aumento.

La lepra es una enfermedad que ataca principalmente a la piel y al sistema nervioso en humanos, y fué reconocida desde la más remota antigüedad; existen descripciones de ella desde el año 600 A.C. en la India. A causa de sus manifestaciones, esta enfermedad se atribuyó a un castigo divino o a una terrible herencia; incluso en algunos lugares, a los pacientes leproso se les consideraba oficialmente muertos.

No fué sino hasta 1873, que Gerhard Henrik Armauer Hansen descubrió que la enfermedad era causada por un microorganismo, al cual se le llamó originalmente *Bacillus leprae*, y en 1896 se propuso llamarlo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*). Este bacilo es ácido-alcohol resistente, y cuando se tiñe por la técnica de Ziehl-Neelsen, se visualiza como un germen de forma bacilar ligeramente curvo, que mide de cuatro a siete  $\mu\text{m}$  de largo y de 0.3 a 0.4  $\mu\text{m}$  de ancho (17).

El microorganismo contiene también filamentos en forma de cuerda en la pared celular, formados por un péptido glicolípido similar a los de otras micobacterias. Es importante indicar que el bacilo tiene antígenos comunes a otras micobacterias y nocardias (13 y 16). A pesar de ser un microorganismo conocido desde el siglo pasado, su estudio ha sido muy difícil, debido principalmente a que no puede cultivarse *in vitro*.

Actualmente existen dos modelos posibles para el cultivo de la micobacteria: uno es el armadillo de nueve bandas y el otro el cojinete plantar de ratones. Sin embargo, la producción de bacilos en estos

animales presenta algunos obstáculos; por ejemplo, en los ratones la producción es muy baja, y no es posible la realización de varias cosechas del bacilo debido a que el tiempo de vida del ratón es relativamente corto. El armadillo presenta más ventajas debido a que puede vivir de 12 a 15 años, y el número de bacilos que pueden recuperarse de los tejidos de estos animales es de  $10^8$  a  $10^{10}$  bacilos por gramo de tejido. La desventaja principal que presenta el armadillo es que, (por ser un organismo de cepa abierta) introduce una serie de variables, las cuales pueden afectar la producción del bacilo o incluso su infección.

Respecto a la transmisión del bacilo, no se conoce con exactitud cuál es la vía por la que el microorganismo infecta al humano. Clásicamente, se ha considerado que la vía de entrada es la piel; sin embargo, no existen evidencias que apoyen ésto, y debido a la naturaleza del epitelio, no parece posible que los bacilos puedan penetrar la piel intacta. Considerando además que los tejidos por los que penetra el bacilo no son necesariamente los afectados, la vía respiratoria es la puerta de entrada más probable.

En relación a la ruta de salida, los datos bacteriológicos se inclinan por la vía respiratoria, debido a que las secreciones nasales de los enfermos lepromatosos constituyen la fuente bacilar con mayor concentración de bacilos, con un promedio de 107 bacilos viables por día. En cuanto a la transmisión dérmica, si el paciente presenta úlceras tróficas, puede descargar diariamente en el medio más de  $20 \times 10^8$  bacilos(17).

En un gran número de individuos, la infección pasa desapercibida y solo después de varios años algunos de los infectados desarrollan sintomatología clínica de la enfermedad, una pequeña parte de ellos presenta una lepra lepromatosa, y el resto presenta alguna de las otras variaciones de la lepra, las cuales pueden ser la tuberculoide, la indeterminada y la limítrofe ("borderline"). La lepra lepromatosa (LL) y la tuberculoide (TT) son las denominadas lepras "polares"(20).

La lepra lepromatosa es el tipo progresivo de la enfermedad, en la que

el bacilo invade extensamente la piel y las mucosas en forma de nódulos y de infiltración difusa, lesiona los nervios periféricos y todos los órganos y sistemas, excepto el nervioso central. Tanto en el raspado de la mucosa nasal como en el de las lesiones cutáneas, existen numerosos bacilos. Este tipo de lepra se presenta en individuos cuya inmunidad celular contra los antígenos del *M. leprae* está deprimida, lo que explica el mal pronóstico y la falta de respuesta a la lepromina (Prueba subcutánea similar al DTH, en la cual se utiliza una suspensión de *M. leprae* esterilizada por calentamiento y que contiene de  $4 \times 10^7$  a  $1.6 \times 10^8$  bacilos/mL); su inmunidad humoral contra antígenos del bacilo está aumentada, lo que da lugar a reacciones antígeno-anticuerpo y a la formación de complejos solubles (20).

La lepra tuberculoide es el tipo regresivo de la enfermedad, y sus manifestaciones tienden a localizarse exclusivamente en la piel y en los nervios periféricos. En este tipo de lepra prácticamente no existen bacilos, y se presenta en individuos cuya inmunidad humoral está aumentada contra los antígenos del *M. leprae*, presentando un exceso de respuesta inmune celular contra los mismos antígenos (17).

Se denominan casos indeterminados (20) a aquellos en los que no es posible evidenciar clínicamente, por lo menos durante algún tiempo, características francas de uno de los dos tipos polares. Se considera que los casos indeterminados son el principio de la lepra.

Con el nombre de "borderline" se designa a un grupo de casos, que como los indeterminados son inestables y que suelen pertenecer, en general, al tipo lepromatoso; sus manifestaciones se localizan aparentemente solamente en piel y en nervios periféricos. Inmunológicamente son casos indefinidos e inestables, que a veces se muestran como lepromatosos y otras como tuberculoides.

Por el momento, en el diagnóstico de la lepra el estudio clínico del paciente constituye el primero y el más importante de todos (17). Los hallazgos histopatológicos, bacteriológicos e inmunológicos solamente son complementarios. El diagnóstico clínico de la lepra en casos incipientes presenta ciertas dificultades, ya que los síntomas son tan

discretos y variables que pueden pasar inadvertidos durante mucho tiempo y solo podrá diagnosticarse cuando empiezan a presentarse las manifestaciones clínicas de la enfermedad. La primera prueba inmunológica, que se utilizó para diagnosticar a los pacientes con lepra, fué la de la lepromina. Esta, como se mencionó anteriormente, es una suspensión de bacilos muertos obtenida a partir de nódulos de pacientes lepromatosos, y fué utilizada como prueba cutánea en forma análoga a la tuberculina, esperando que el lepromatoso diera una prueba positiva y el tuberculoide una negativa (25). Sin embargo, el resultado fué contrario a lo que se esperaba. Posteriormente se intentaron utilizar anticuerpos específicos para el agente causal, como forma de identificación del bacilo (1). Sin embargo, éstos tipos de diagnóstico inmunológico no son de utilidad en la identificación de la enfermedad, ya que muchos sujetos de la población general, aparentemente sanos, dan valores positivos a ambos tipos de pruebas.

Esta última circunstancia ha sido muy frustrante en la investigación de la lepra, ya que una de las mejores soluciones para incrementar la calidad del diagnóstico de cualquier enfermedad infecciosa, es la búsqueda de elementos específicos de la respuesta inmunológica. Para lo cual, algunas de las preguntas a responder serían las siguientes: ¿Qué es lo que propicia el que algunos pacientes pasen desapercibidos? ¿Por qué la enfermedad solamente se declara en el 10% de los individuos infectados por el *M. leprae*? ¿Cómo se las arregla el bacilo para sobrevivir y multiplicarse con facilidad en algunos pacientes, esto es los que desarrollan la forma más grave de la enfermedad (lepra lepromatosa), provocando únicamente nódulos, ciertamente poco agradables, pero pocos síntomas desagradables; mientras que en otros pacientes el desarrollo de la enfermedad los deja muchas veces inmunológicamente agotados y físicamente mutilados y deformes?

Un equipo que trabaja en el laboratorio de investigación "Armauer Hansen" en Addis Abeba, Etiopía, bajo la dirección del inmunólogo noruego Tore Godal, empezó a esbozar algunas respuestas a esas preguntas. Demostró que la inmunidad del huésped era la clave determinante de la enfermedad; se empezó a comprender que la suerte de un individuo afectado depende sobre todo del estado inmunitario

celular del sujeto infectado (21).

En efecto, tal como podía esperarse de un microorganismo intracelular, el *M. leprae* se enfrenta a un ataque por parte de los macrófagos. Así pues, se trata más bien de una inmunidad celular que de una inmunidad humoral la encargada de la protección contra el bacilo, a pesar de que en los pacientes lepromatosos se observa una producción masiva de anticuerpos que carecen de eficacia protectora. El grupo de T. Godal observó que estos enfermos lepromatosos no llegan prácticamente a oponer ningún tipo de inmunidad celular al bacilo de la lepra, y que los linfocitos T solo reaccionan al *M. leprae* en los ensayos *in vitro*. En cambio, los individuos que permanecieron sanos a pesar de una infección por el *M. leprae*, presentan índices muy elevados de inmunidad celular, lo que hizo que se llegara a la conclusión de que la inmunidad celular puede proteger contra la infección y/o la enfermedad, siendo el factor decisivo la rapidez con que se pone en acción. Podría decirse que si en el momento de la penetración en el organismo, el bacilo es "enfrentado" a una respuesta inmunitaria celular eficiente, en los primeros días o en las primeras semanas, con seguridad el paciente permanecerá sano (así parece ser en el 90% de los casos de infección).

Como se mencionó anteriormente, el sistema de inmunidad celular es el que provee la protección contra la infección de microorganismos intracelulares como lo es el *M. leprae*. En general, el tipo de inmunidad protectora contra las infecciones por micobacterias, está fuertemente relacionada a las reacciones en piel que provocan los antígenos micobacterianos, las cuales se denominan de hipersensibilidad tardía o DTH (del inglés "Delayed-Type Hypersensitivity").

La reacción de la DTH es una prueba inmunológica que se realiza mediante la aplicación intradérmica del antígeno en el paciente que se desea analizar. La reacción se caracteriza por la formación de un eritema y una induración en pacientes previamente expuestos al bacilo. Estas características aparecen después de algunas horas de la aplicación intradérmica, llegando a niveles máximos a las 24-48 horas posteriores a la aplicación del antígeno. La formación del eritema es debida a una mayor vasodilatación acompañada por un incremento de la permeabilidad vascular; la induración se debe al infiltrado de células

mononucleares.

Histológicamente, en una reacción de DTH el infiltrado celular temprano consiste en linfocitos mononucleares alrededor de las vénulas de la dermis. En la siguiente fase se encuentran células tanto mono como polimorfonucleares. Estas últimas se mueren y en la fase tardía solo se encuentran mononucleares del tipo de linfocitos y macrófagos. Los macrófagos juegan el papel de células presentadoras de antígenos para los linfocitos T; de esta manera existe una proliferación celular específica de los linfocitos con receptor para el antígeno inyectado intradérmicamente, y esta proliferación está regulada por la producción de citocinas.

Por todo lo anterior, la prueba de DTH con antígenos especie-específicos podría ser utilizada como prueba inmunodiagnóstica para la detección de pacientes infectados con *M. leprae*, y que no presentan sintomatología aparente.

La inducción de DTH hacia *M. leprae* está bien documentada (32), y se ha realizado en cobayos (22), en ratones (27) y en humanos (7 y 32). Estos estudios muestran que la reacción de DTH puede ser producida con extracto soluble de bacilos muertos de *M. leprae*, lo cual nos indica que esta preparación de extracto soluble puede ser un buen candidato como reactivo para una prueba dérmica (32). Sin embargo, al compartir este bacilo varios epítomos con otras micobacterias, podríamos incurrir en la obtención de reacciones falsas positivas, al utilizar al bacilo como antígeno. Una manera de evitar estas reacciones falsas positivas, sería preparando una mezcla de antígenos limitados y bien definidos, específicos de preferencia. Sin embargo, la poca disponibilidad del bacilo dificulta la obtención de sus antígenos. Una opción bastante atractiva para obtenerlos, es que estos antígenos podrían ser péptidos sintéticos, obtenidos de las secuencias de aminoácidos de proteínas específicas de *M. leprae*.

Otro tipo de ensayo en el cual está involucrada la respuesta inmune celular, es el ensayo de proliferación de células T *in vitro*. Este consiste en la activación *in vitro*, y la consecuente proliferación, de



los linfocitos obtenidos de sangre periférica y de bazo (humanos infectados ó sanos), o ganglios linfáticos de un ratón previamente inmunizado, que en este caso particular sería con extracto soluble de lepra. Los macrófagos presentes en sangre periférica, en el bazo o en los ganglios linfáticos procesan al antígeno y lo presentan a los linfocitos T, para que de esta manera proliferen en forma específica los linfocitos T sensibilizados.

Una de las ventajas de trabajar con los linfocitos T es que éstos reconocen epítomos lineales, a diferencia de los anticuerpos, que en general reconocen epítomos conformacionales. De ésta manera, conociendo la secuencia de aminoácidos de un probable epítomo puede realizarse la síntesis química del mismo, y usarse en ensayos de DTH ó de proliferación de células T *in vitro* .

Actualmente existen reportadas las secuencias de aminoácidos de varias proteínas de *M. leprae*.

Algunas de éstas proteínas son las siguientes:

- DnaK (70 kDa), proteína de choque térmico (10).
- GroEL (65 kDa), proteína de choque térmico (10,11,40,41).
- SodA (28 kDa), superóxido dismutasa (10).
- GroES (14 kDa), proteína de choque térmico (2,10,24).

Proteínas con secuencia conocida y función no identificada:

- Antígeno rico en prolina (36 kDa) (11,19,37).
- Proteína de 28 kDa, posiblemente regulada por hierro (5).
- Proteína de 18 kDa de choque térmico (3,11).

Otras proteínas bajo investigación son:

- Proteína de 45 kDa (31).
- Proteína de 35 kDa (11).
- Proteína de 30-31 kDa (31).
- Proteína de 10 kDa (11).

De algunas de estas proteínas, ya se conocen cuáles secuencias de aminoácidos actúan como epítomos para células T.

## ANTECEDENTES

En un intento por desarrollar un ensayo inmunodiagnóstico para la detección de la sensibilización de un individuo, ante los antígenos del *M. leprae*, en nuestro grupo de investigación se seleccionaron tres proteínas del bacilo, las cuales estaban reportadas en la literatura como portadoras de epítopos de células T. Estas proteínas son las de 65 kDa, de 28 kDa y la proteína de 18 kDa, las cuales, se renombraron recientemente por la Organización Mundial de la Salud como los antígenos 2L, 9L, y 12L, respectivamente (Dr. D. B. Young, comunicación personal).

De estas proteínas, se sintetizaron y se caracterizaron ocho péptidos correspondientes a secuencias de aminoácidos que estaban reportadas como inductoras de proliferación celular de linfocitos T. Después de purificarlos, se procedió a estudiar su capacidad para inducir una respuesta de DTH en cobayos y así diseñar un ensayo inmunodiagnóstico del tipo de respuesta tardía.

Adicionalmente se sintetizaron otros dos péptidos, los cuales fueron diseñados con un programa computacional (MSEQ) que predice epítopos para células T; estos últimos dos péptidos, corresponden a secuencias de aminoácidos de la proteína superóxido dismutasa de 28 kDa.

En este estudio, se usó al cobayo como modelo experimental, debido a que presenta una muy buena respuesta de tipo de DTH cuando ha sido previamente inmunizado con antígenos micobacterianos (22). Todos los péptidos sintetizados químicamente fueron probados en ensayos de DTH, con cobayos inmunizados con extracto soluble de *M. leprae*. Los resultados mostraron una buena respuesta de DTH con todos los péptidos probados; sin embargo, se observó que algunos de ellos mostraban respuesta cruzada con los animales inmunizados con el *Mycobacterium bovis* (cepa BCG), es decir, no eran inmunoespecíficos (12). Por este motivo surgió la necesidad de aumentar la antigenicidad de algunos de los péptidos.

Recientemente, J. P. Tam realizó algunos estudios de inmunodetección para malaria (36), en este trabajo utilizó péptidos con antígenos

múltiples (MAP) con el fin de incrementar la respuesta obtenida en la formación de complejos antígeno-anticuerpo. Basándonos en esto, se decidió probar esta misma estrategia para estudiar si en el sistema celular se podía apreciar el mismo fenómeno y de esta manera incrementar la respuesta en los ensayos de DTH. Como otra posibilidad para aumentar la inmunogenicidad de los péptidos, se planteó la realización de dímeros de los péptidos, con la finalidad de poder comparar la respuesta obtenida por el péptido *per se*, el péptido en forma de dímero y el péptido en forma de MAP. Con esto en mente, se plantearon los siguientes objetivos.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Estudiar el aumento en la respuesta inmunológica de linfocitos T dirigida contra *Mycobacterium leprae*, mediante polímeros de péptidos sintéticos de las proteínas de 18, 28 y 65 kDa.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Sintetizar péptidos por la técnica de Merrifield en fase sólida que correspondan a fragmentos de las secuencias de aminoácidos de proteínas de *M. leprae*, reconocidos como eptopos para células T.
- 2.- Inducir la formación de dímeros entre los péptidos sintetizados.
- 3.- Realizar la formación de péptidos con antígenos múltiples (MAPs).
- 4.- Purificar y caracterizar los péptidos sintéticos desde el punto de vista químico (análisis y secuencia de aminoácidos) e inmunológico, utilizando para este último un sistema de proliferación celular de linfocitos T *in vitro*.

## MATERIALES Y METODOS

### Síntesis de Péptidos

Los péptidos se sintetizaron por el método de Merrifield en fase sólida (23). Los aminoácidos que se utilizaron tienen protegido el grupo  $\alpha$ -amino con el radical tert-butiloxycarbonil (t-Boc). La resina empleada fue la fenilacetamidometil -aminoácido -resina (Pam-aa-resina) (Laboratorios Península, Belmont, California, USA). Los aminoácidos con grupo funcional laterales contenían grupos protectores (Misma compañía: Península). Todos los reactivos empleados fueron grado analítico, los cuales se mencionan a continuación:

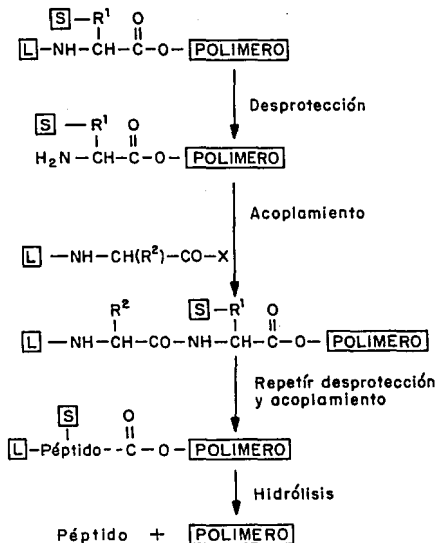
-Como solventes se utilizaron diclorometano (DCM) y dimetilformamida (DMF) (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, USA).

-Como agente acoplante de aminoácidos se utilizó dicitohexilcarbodiimida (DCC) (Aldrich).

-Para remover los grupos protectores t-Boc, se utilizó una mezcla de ácido trifluoroacético (TFA) (PIERCE, Rockford, Illinois, USA) y DCM 1:1. Para la neutralización del grupo amino recién desprotegido se utilizó trietilamonio (TEA). En la figura 1 se muestra un esquema de la síntesis química de péptidos. La síntesis de péptidos se realizó tanto manual, como automáticamente (Peptide Synthesizer modelo 9600, MilliGen/Bioscience, Millipore Div., USA)

-Después de cada síntesis, el péptido se separó de la resina por medio de una hidrólisis ácida con ácido fluorhídrico (HF) (Mateson Co. Inc.) en presencia de anisol, para continuar con una extracción de ácido acético al 5%. Si el péptido resultaba muy insoluble, se extraía con ácido acético glacial y posteriormente se diluía hasta alcanzar una concentración de 5% en agua para una posterior liofilización. En la tabla 1 se enlistan los péptidos sintetizados.

En algunos casos, fué necesario adicionar una cisteína a los péptidos, ya fuera en el amino terminal o en el carboxilo terminal, ya que estos péptidos no contaban en su secuencia con este aminoácido. La adición de la cisteína fué necesaria, debido a que para poder formar los dímeros



**Fig.1. Síntesis química de péptidos en fase sólida.** Primero se tiene un aminoácido acoplado a una resina por su extremo carboxilo, este aminoácido tiene protegido el grupo amino por un grupo protector(L) y su grupo R por otro distinto (S)(solo cuando es un grupo lateral potencialmente reactivo). Utilizando ácido trifluoroacético se elimina el grupo protector L; una vez neutralizado el grupo amino del primer aminoácido, se puede acoplar un segundo, el cual tiene protegido su grupo amino. Se repite la desprotección y el acoplamiento cuantas veces sea necesario y se procede a la hidrólisis entre el péptido y la resina de soporte por medio de ácido fluorhídrico.

**Tabla 1.- Secuencia de aminoácidos de los péptidos sintetizados y proteínas de las cuales provienen**

**P2 (65 kDa 201-219)**

a) pC2

Cis- Tir-Fen-Val-Tre-Asp-Ala-Glu-Arg-Gln-Glu-Ala-Val-Leu-Glu-Glu-Pro-Tir-Iso-Leu

b) p2C

Tir-Fen-Val-Tre-Asp-Ala-Glu-Arg-Gln-Glu-Ala-Val-Leu-Glu-Glu-Pro-Tir-Iso-Leu-Cis

**P7 (18 kDa 8-23)**

a) pC7

Cis-Fen-Arg-Glu-Leu-Asp-Arg-Fen-Ala-Glu-Gln-Val-Leu-Gli-Tre-Ser-Ala

b) p7C

Fen-Arg-Glu-Leu-Asp-Arg-Fen-Ala-Glu-Gln-Val-Leu-Gli-Tre-Ser-Ala-Cis

**P5 (28 kDa 24-48)**

Pro-Cis-Ala-Tir-Fen-Leu-Val-Tir-Glu-Pro-Tre-Ala-Ser-Ala-Lis-Pro-Ala-Ala-Lis-His-Tir-Glu-Fen-Lis-Gln

**P15 (65 kDa 418-427)**

Leu-Gln-Ala-Ala-Pro-Ala-Leu-Asp-Lis-Leu-Cis

Cis- En algunos casos fué necesario adicionar un residuo cisteínico, esta cisteína adicional se encuentra subrayada en la secuencia.

se necesita de la presencia de, una cisteína en cada uno de los péptidos a dimerizar. Los péptidos a los cuales se les adicionó una cisteína en alguno de sus extremos, fueron el p2 y el p7.

Si la cisteína se adicionó en el extremo amino terminal, el péptido se denominaba pC2, en cambio, si la cisteína se encontraba en el extremo carboxilo terminal, el péptido se denominaba p2C. Se siguió el mismo criterio para nombrar a los péptidos derivados del p7.

#### **Purificación de los Péptidos y su Caracterización**

El péptido crudo se purificó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, California, USA) utilizando una columna C18 (10 X 250 mm) bajo las siguientes condiciones:

Se utilizaron dos fases móviles: A (TFA al 0.12%), B (TFA al 0.1% en acetonitrilo); se empleó un gradiente lineal de 0-60% de la solución B en un tiempo de 60 minutos con un flujo de 2 mL/min. Posteriormente se realizaron recromatografías de los péptidos en la misma columna, en condiciones de gradiente isocrático.

La composición de aminoácidos de los péptidos se verificó por dos métodos:

- a) Análisis de aminoácidos de las muestras hidrolizadas con ácido clorhídrico 6N, a una temperatura de 110 °C, durante 20 horas (High Performance Analyzer, Sistem 6300E, Beckman, USA).
- b) Secuencia de aminoácidos automática por el método de degradación de Edman (Pro-Sequencer model 6400/6600 MilliGen/Bioscience, Millipore div. USA).

#### **Formación de Dímeros**

Los péptidos a dimerizar, se colocaron en un regulador de  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.1 M, pH=7.8, durante una noche, tiempo en el cual se estuvieron burbujando con aire; la concentración final del péptido fué de 1mg/mL.

Si el homodímero formado era entre el péptido pC2, se le nombraba dímero C2, en cambio si el dímero formado era entre el péptido p2C, el

dímero obtenido recibía el nombre de dímero 2C.

### **Formación de MAPs**

Los MAPs se formaron siguiendo el protocolo de Tam y col.(33,34,35 y 36) en el cual se sintetizó una matriz de lisinas, usando di-Boc-lisina en el primer nivel (Laboratorios Península). En el segundo nivel se adicionó Fmoc-Lis-(Boc). Una vez que se contaba con la matriz de lisinas se procedió a eliminar el grupo Boc y se inicializó la síntesis del péptido 15 en los grupos amino épsilon de las lisinas. Concluida la síntesis del péptido 15, se eliminó el grupo protector Fmoc de la matriz y en su lugar se colocó una molécula de ácido monocloroacético. Este ácido se adicionó utilizando el protocolo empleado para el acoplamiento de aminoácidos. Una vez cloroacetilada la matriz, se procedió a la hidrólisis por medio de ácido fluoroacético.

Debido a que se contaba con una matriz cloroacetilada, ahora era posible adicionar cualquier péptido que tuviese en uno de sus extremos una cisteína. Este acoplamiento se lleva a cabo por medio de una reacción de sustitución nucleofílica de tipo II (SN2).

Los pasos de purificación y de ruptura a los cuales se sometió el MAP, fueron los mismos que los empleados en la síntesis de los demás péptidos.

Para realizar el acoplamiento de la matriz de lisinas con el péptido deseado, se realizó el siguiente procedimiento:

-Se agregaron 3.5 mg del péptido más 1.46  $\mu$ moles de ditiotreitól (DTT, Aldrich) a 5 mL de una solución de guanidinio-HCl 8M, más 0.25 mL de una solución de EDTA (50 mg EDTA/mL).

- Se ajustó el pH a 6.5 con Tris.HCl 1M pH 8.5 y se burbujeó N<sub>2</sub> por 30 min. Se dejó en éstas condiciones por 16 h.

-Se agregó el MAP en una relación 1:20 molar respecto al péptido, y se ajustó el pH a 8.5-9.0, dejándose reaccionar por 1.5 h.

-Se dializó contra NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0.1M en membrana 6M (corte de 1000) y se liofilizó.



### **Micobacterias.**

El extracto soluble de *M. leprae* (MLSE) fué obtenido al sonicar bacilos de *Mycobacterium leprae*, los cuales fueron cultivados *in vivo* en armadillos de nueve bandas, en el Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, por el grupo de los Doctores Sergio Estrada y Fausto Quesada.

El extracto soluble de *M. tuberculosis* (MTSE) se obtuvo de manera similar, sonicando bacilos de *Mycobacterium tuberculosis*. Estos bacilos fueron cultivados en medio Proskauer y Beck, modificado por Youmans (PBY).

Una vez sonicadas las micobacterias, se procedió a centrifugar el sonificado a 12500 X g durante 15 minutos. El sobrenadante se recuperó como extracto soluble y se ajustó la concentración de proteínas a 2mg/mL.

### **Protocolo de Inmunización**

Dos grupos de cuatro ratones hembras (Balb/c) y con 4 semanas de edad, fueron inmunizados por separado, uno de ellos con MLSE y el otro grupo con MTSE; se aplicaron 20 µg subcutáneamente en el cojinete plantar de las extremidades posteriores. Se realizó una primera inmunización con adyuvante incompleto de Freund (día -8). En el día -1 se realizó una segunda inmunización bajo las mismas condiciones y en el día cero se sacrificó al animal para la extracción de los ganglios linfáticos drenantes infartados.

### **Ensayos de Proliferación Celular *in vitro*.**

Los animales previamente inmunizados con extracto soluble de micobacterias, fueron sacrificados por dislocación cervical y se procedió a la extracción de los ganglios linfáticos poplíteos e inguinales infartados. Esta extracción se realizó en condiciones estériles. Posteriormente, se machacaron los ganglios para obtener las células y realizarles varios lavados con medio RPMI 1640(Sigma). Una vez lavadas las células se hizo una estimación de la concentración celular, mediante una cámara de Neubauer y se aplicaron 50 mil células por pozo en una placa de microcultivo (Costar Cat. 3595, Cambridge,MA.,USA) de 96 pozos y se llevó a un volumen final de 200 µL/pozo con medio RPMI 1640. Este medio se encontraba suplementado

con L-glutamina 2mM, penicilina 100 U/mL / estreptomycin 100 U/mL, 2-mercaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$  M y 10% de suero fetal de bovino ( HyClone, Logan, Utah, USA ).

Las células se cultivaron en presencia de antígeno a distintas concentraciones (0.4, 4.0 y 10 nmol/mL), estos antígenos son los péptidos en cualquiera de sus variaciones (péptido *per se*, en forma de dímero o MAP). El control negativo fué en ausencia de antígeno y al control positivo se le adicionó concanavalina A (2.5  $\mu$ g/mL). Después de 72 h de cultivo, a 37 °C en ambiente húmedo y 5% de CO<sub>2</sub>, las células se pulsaron por 6 h con 0.5  $\mu$ Ci de (<sup>3</sup>H)timidina (2.0 Ci/mmol, Amersham Int., Buckinghamshire, England). Las células se cosecharon sobre filtros de fibra de vidrio con un cosechador ( Combi Cell Harvester Skatron Ins. Inc., Sterling, VA.). Los ensayos se realizaron por triplicado y al menos dos experimentos independientes fueron realizados. Los resultados se muestran como incremento de cuentas por minuto. Este fué calculado de la siguiente forma:  $\Delta = \text{cpm de la muestra} - \text{cpm del control}$

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### Síntesis y Purificación de Péptidos

Para la realización de este proyecto de investigación, se sintetizaron seis péptidos. Estos péptidos corresponden a secuencias de aminoácidos de tres distintas proteínas de *M. leprae* (18, 28 y 65 kDa). Como se mencionó anteriormente, en la tabla 1 se muestra la secuencia de aminoácidos de los epítopos y las proteínas de las cuales provienen los péptidos.

Como se indica en esta tabla, a algunos péptidos fué necesario adicionarles un residuo de cisteína, ya fuera en su extremo amino o en su extremo carboxilo terminal. Esta adición se debió a que se deseaban realizar tanto dímeros paralelos como antiparalelos, mediante la formación de puentes disulfuro.

Para la mayoría de las síntesis se calculó la obtención de 100 mg de péptido. Sin embargo, se obtuvieron de 70 a 90 mg de péptido crudo, si a ésto aunamos el proceso de purificación para obtener el péptido de interés en forma pura, el rendimiento disminuyó aún más, siendo éste distinto para cada péptido. El rendimiento obtenido depende de que tan eficiente fué la síntesis, la cual depende tanto de la secuencia de aminoácidos como del tamaño del péptido. En la tabla 2 se muestran los porcentajes de péptido puro obtenido respecto al material crudo.

De estos resultados, es interesante hacer notar que no se obtuvo el mismo rendimiento al realizar la síntesis automática o manual de un mismo péptido. Esto es debido probablemente a que en la síntesis automática no se puede verificar si el acoplamiento de cada aminoácido fué completo, no siendo éste el caso para la síntesis manual, en donde se monitorea cada acoplamiento por medio de una reacción química entre el reactivo de ninhidrina y el grupo amino terminal del último aminoácido acoplado. Por tal motivo, se tiene un mejor control en la síntesis manual que en la síntesis automática. En la tabla 2, se puede observar que los péptidos sintetizados manualmente contienen un porcentaje mayor de péptido con la secuencia correcta, que aquéllos que fueron sintetizados automáticamente. Así mismo, se puede también

## Resultados y Discusiones

**Tabla 2.- Porcentaje de péptido con la secuencia correcta dentro de la mezcla cruda, ésto es una vez realizada la hidrólisis con ácido fluorhídrico**

Mezcla Cruda	% de Péptido
C2	15
C2*	35
2C	12
C7*	40
7C	14
p15*	50
p5	30
p5*	45

\*.- El asterisco indica los péptidos que fueron sintetizados manualmente

observar esta diferencia en los perfiles cromatográficos de purificación. En la figura 2, por ejemplo, se muestran dos cromatogramas de un mismo péptido (PC2), uno de ellos sintetizado automáticamente y el otro sintetizado manualmente.

Como se mencionó en materiales y métodos, una vez sintetizados los péptidos, éstos fueron purificados por cromatografía líquida de alta presión. En la figura 3 se muestran algunos cromatogramas obtenidos al purificar dichos péptidos en gradiente (0-60% de sol. B), así como cuando se mantuvo una composición constante del solvente eluyente; ésto es a lo que se denomina isocrático.

Con algunos de los péptidos (PC2, P2C, PC7 y P7C) se tuvieron problemas cuando se intentó purificarlos debido a su baja solubilidad. Generalmente se solubilizaron en la solución A de corrida (TFA al 0.12%). Sin embargo, para los casos insolubles se buscaron varios solventes como: cloruro de guanidinio 8M, dimetilformamida y ácido acético al 10%.

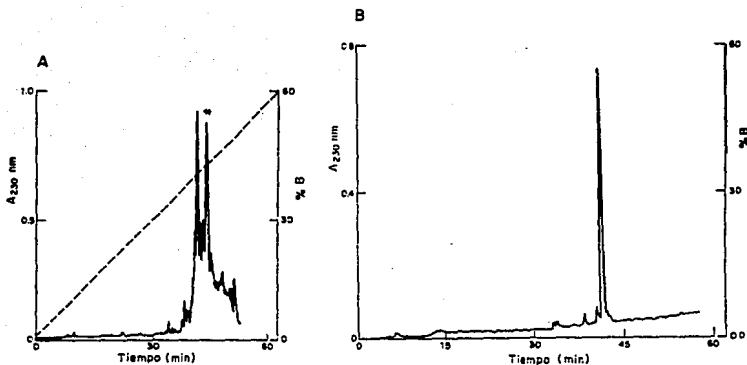
De estos tres solventes se obtuvo mayor solubilidad con el ácido acético al 10%; ésto siempre y cuando se agregara al péptido, el ácido acético glacial, se agitara con el vortex y posteriormente se agregara solución A (las estimaciones de mayor o menor solubilidad fueron realizadas visualmente una vez centrifugados).

### **Análisis de Aminoácidos**

Una vez que los péptidos se purificaron, se seleccionaron los picos mayoritarios y se les realizó un análisis de aminoácidos como se describió en materiales y métodos. En la tabla 3, se muestran los resultados de algunos análisis de aminoácidos obtenidos. En algunos casos, fué necesario realizar el análisis de aminoácidos a varios de los componentes del cromatograma, para poder identificar cuál de ellos era el péptido correcto.

### **Formación de Dímeros**

Al separar por HPLC el dímero formado del péptido solo, podía apreciarse que variaba el tiempo de retención del homodímero formado respecto al péptido *per se*. En la figura 4 se observa esta variación entre los dos tiempos de retención entre un péptido solo y el mismo



**Fig. 2. Comparación de la síntesis automática y la síntesis manual.** En la figura A puede apreciarse el cromatograma de la síntesis automática del péptido C2, la fracción con la secuencia correcta se indica con +. En la figura B se observa el cromatograma del mismo péptido C2 sintetizado en forma manual. Ambas corridas se realizaron en cromatografía líquida de alta presión, utilizando una columna C18 analítica y empleando un gradiente de 0-60% de acetonitrilo.

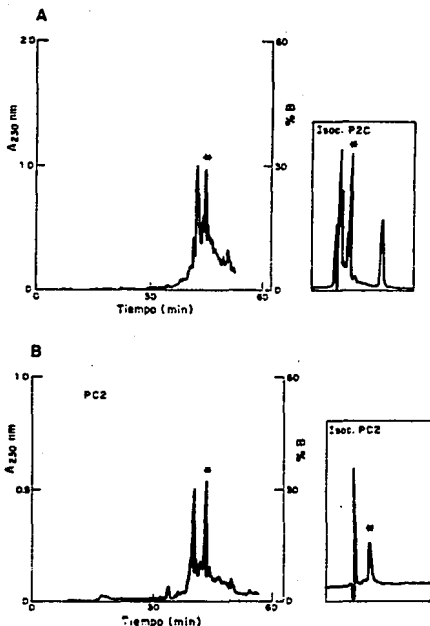


Fig. 3. Purificación en gradiente y en isocrático. En la figura A se observa el perfil cromatográfico del péptido 2C al ser purificado por cromatografía líquida de alta presión utilizando un gradiente de 0-80% de acetonitrilo y una columna C18 analítica. Enmarcado se encuentra un isocrático de la fracción de interés (+), es decir, manteniendo la misma concentración de acetonitrilo (40%). En la figura B se observan los cromatogramas del péptido C2. El gradiente y la columna son los mismos que en la figura A. El isocrático se realizó utilizando una concentración de 32% de acetonitrilo. El asterisco indica la posición del péptido puro.

**Tabla 3.- Análisis de aminoácidos de dos  
de los péptidos sintetizados**

Aminoácido	p5	p15
Asp	-	1.5 (1)
Glu	3.0 (3)	0.9 (1)
Ser	1.3 (1)	-
His	0.8 (1)	-
Trp	0.8 (1)	-
Ala	5.0 (5)	3.1 (3)
Pro	2.5 (3)	1.4 (1)
Tir	1.1 (3)	-
Val	1.2 (1)	-
Cis	0.6 (1)	0.2 (1)
Leu	1.1 (1)	2.9 (3)
Fen	1.4 (2)	-
Lis	3.0 (3)	0.8 (1)

Los números con decimal indican el valor observado, el número entre paréntesis indica el valor esperado.



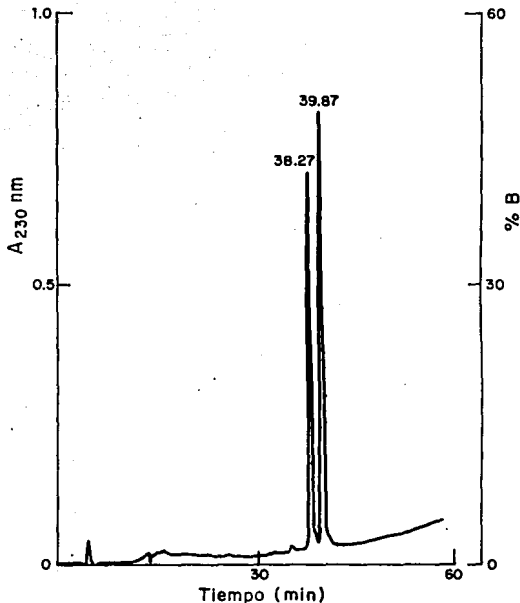


Fig. 4. Comparación entre el tiempo de retención de un péptido reducido y uno oxidado. En esta figura puede apreciarse claramente como varía un poco el tiempo de retención de un péptido cuando se encuentra en su forma reducida ( $R_t=38.27$ ) y cuando se encuentra en su forma oxidada ( $R_t=39.87$ ). El perfil cromatográfico que se muestra corresponde al péptido 15. Se empleó una columna C18 para la purificación y se utilizó un gradiente de 0-60% de acetonitrilo; la purificación fué realizada por cromatografía líquida de alta presión.

péptido en forma de dímero.

La composición del dímero y del péptido sin dimerizar era, por lo general, de aproximadamente el 50% de cada uno, tal como puede apreciarse en la figura 4.

### **Formación de MAPs**

Debido a que la lisina posee dos grupos aminos, uno en el carbono alfa y otro en el carbono épsilon, se aprovecha esta estructura para poder ramificar una síntesis química de péptidos por medio de una matriz de lisinas, y posteriormente utilizar sus grupos amino para proseguir con la síntesis de cualquier péptido. La matriz del MAP que se sintetizó está compuesta por dos niveles de lisinas, como puede apreciarse en la figura 5. Esta matriz contiene al péptido 15 (ver tabla No.1) en el amino épsilon y contiene una molécula de cloroacético en el amino alfa para la adición de un segundo péptido, y de esta manera poder formar un heteropolímero. En la figura 6 se observan los cromatogramas del MAP antes y después de la adición del segundo péptido. Se tomó la fracción 37.97, la cual correspondía a la matriz del MAP (determinado por secuenciación de aminoácidos) y se le acopló el péptido C2. En el inciso B se observa el perfil cromatográfico del MAP acoplado al péptido C2. Por análisis de aminoácidos se determinó que la fracción 38.94 correspondía al MAP sin acoplar, la 40.40 correspondía al MAP acoplado al péptido C2 y la fracción 43.04 correspondía al péptido C2 sin acoplar. De aquí se tomó la fracción 40.40 para realizar los ensayos de proliferación celular.

Debido a que el péptido 15 (ver tabla 1) contiene un epítipo específico de *M. leprae*, que es reconocido por las células T, lo seleccionamos para que formara parte del MAP, ya que en principio esto garantizaría la estimulación de células T por la secuencia intrínseca del MAP. Sin embargo, el reconocimiento de este péptido está genéticamente restringido a la molécula de histocompatibilidad DR2 humana, lo que explicaría el por qué, en un momento dado, no se obtuviesen estimulaciones celulares en un ensayo linfoproliferativo con células de ratón.

### **Ensayos de Linfoproliferación**

Para estos ensayos de proliferación celular con ganglios linfáticos,

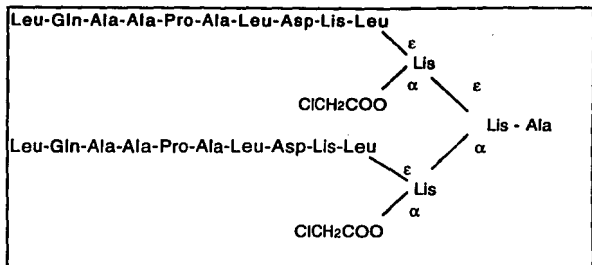


Fig. 5. Estructura del MAP sintetizado. En esta figura puede apreciarse que el MAP sintetizado consta de dos niveles de lisina. En el último nivel se encuentra una molécula del péptido 15 en el amino épsilon y una molécula de cloroacético en el amino alfa de las dos lisinas.

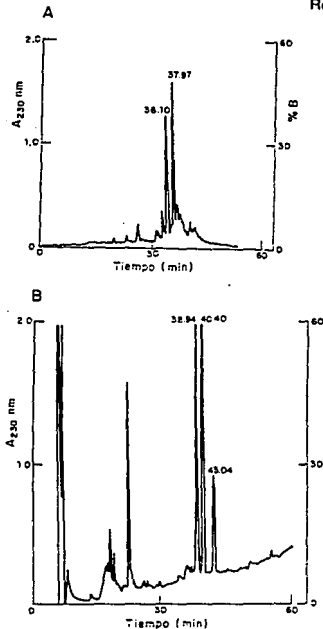


Fig. 6. MAP antes y después de la adición del segundo péptido. En la figura A puede apreciarse el cromatograma del MAP que contiene dos moléculas del péptido 15 y dos moléculas de cloroacético (ver figura 5). Mediante secuenciación de aminoácidos se determinó que la fracción 37.97 era el que contenía la secuencia correcta. Se tomó esta fracción y se realizó el acoplamiento con el péptido C2 (Ver materiales y métodos). En la figura B se observa el perfil cromatográfico del MAP acoplado al péptido C2. Por medio de análisis de aminoácidos se determinó que la fracción 38.94 correspondía al MAP sin acoplar, la fracción 40.40 al MAP acoplado al péptido C2 y la fracción 43.04 al péptido C2 sin acoplar. Ambos cromatogramas se obtuvieron por cromatografía líquida de alta presión utilizando una columna analítica C18 y empleando un gradiente de 0-60% de acetonitrilo.

primeramente era necesario estandarizar el protocolo, para lo cual se realizó una cinética utilizando uno de los péptidos, con el extracto soluble de lepra y con el mitógeno concanavalina A. Esto se hizo con el fin de determinar el tiempo de estimulación con los distintos antígenos utilizados.

Los puntos máximos de estimulación obtenidos se muestran en la tabla 4. Como se puede observar, el tiempo necesario para obtener el máximo de estimulación, depende del procesamiento del antígeno para poder ser presentado al linfocito T; ésto se discute a continuación.

Tabla 4. Tiempo de máxima estimulación con diferentes antígenos

Antígeno	Máximo de Est. (hrs.)
Con A	48
Péptido	72
MLSE	120

La concanavalina A tiene un tiempo de estimulación menor, debido a que actúa directamente sobre glicoproteínas del linfocito T y por lo tanto no necesita ser procesada ni ser presentada a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad para poder inducir proliferación celular.

Por otra parte, algunos autores (4,18 y 30) opinan que los péptidos pequeños no necesitan del procesamiento dentro de la célula presentadora profesional, sino que éstos, pueden formar complejos directamente sobre las moléculas del MHC II de superficie que se encuentran en las células presentadoras y de esta manera iniciar la estimulación de los linfocitos T. Para este ensayo se utilizó el péptido 2 en su forma monomérica, es decir, sin dimerizar.

En relación al MLSE, éste consiste en un complejo multiprotéico derivado del lisado de la micobacteria, por lo que necesita ser procesado en los endosomas de la célula presentadora de antígenos, para que de esta manera, se obtengan los epítopos que inducirán la

**proliferación de linfocitos T.** Es por ésto que se requiere de mayor tiempo para poder llegar al máximo de estimulación.

Una vez que se determinaron los puntos de máxima estimulación, fué necesario discernir entre varios sueros fetales para poder seleccionar aquél que indujera una mejor proliferación con el menor fondo. Se probaron tres sueros de distintas casas comerciales: HyClone, Sigma y Bioproducts.

En el primer ensayo se probaron los tres sueros en ratones inmunizados con extracto soluble de tuberculosis (debido a que es más inmunogénico que MLSE), los resultados se observan en la figura 7.

Como puede apreciarse en la figura 7, el suero de Sigma proporciona una mayor estimulación; sin embargo, como se observa en la figura 8, los fondos obtenidos aumentaron en proporción directa a la concentración de suero utilizado.

Debido a estos resultados, se seleccionó el suero de HyClone, que aunque no da la máxima estimulación, sí mantiene los fondos constantes, y ésto puede ser decisivo si se llegasen a realizar modificaciones en el procedimiento.

Una vez que se estandarizó el procedimiento, se procedió a probar los péptidos y los polímeros sintetizados.

Como puede apreciarse en la figura 9, solo uno de los dímeros (C2) probados aumentó considerablemente la estimulación de linfocitos T respecto al péptido no dimerizado. Uno de los puntos de más relevancia es que sólo aumentó la respuesta en los ratones que fueron inmunizados con el extracto soluble de lepra, lo que sugiere que dicho péptido posee en su secuencia un epítipo específico para *M. leprae*, ya que no dió respuesta cruzada con los ratones inmunizados con el extracto soluble de tuberculosis. En la figura 9 se indica la concentración utilizada del péptido que fué de 25 µg/mL, sin embargo, también fueron probadas 1 y 10 µg/mL. Los resultados obtenidos a estas concentraciones fueron muy similares a los obtenidos con la concentración indicada en esta figura, pero no se muestran por simplicidad gráfica.

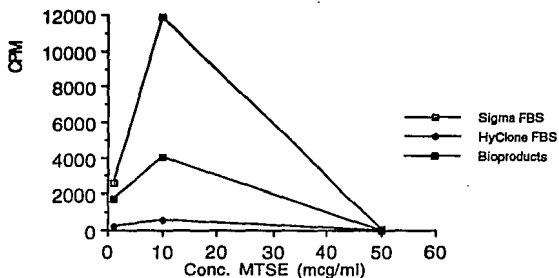
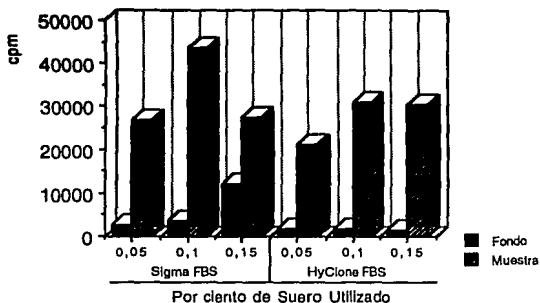


Fig. 7. Estimulación celular de nódulos linfoides con distintos sueros e inmunizados con MTSE.  $4 \times 10^4$  células fueron incubadas en presencia de uno de los tres sueros señalados, la concentración final de los sueros fue de 10 %. La incubación fue por 5 días en pozos de fondo plano y fueron pulsados con  $0.5 \mu\text{Ci}/\text{pozo}$  con  $^3\text{H}$ -Timidina, los puntos son el promedio de tres pozos



**Fig. 8. Estimulación celular de nódulos linfoides con distintas concentraciones de suero e inmunizados con MTSE.**  $4 \times 10^6$  células fueron incubadas en presencia de tres distintas concentraciones de suero Sigma y de HyClone. La incubación a  $37^\circ\text{C}$  fué de cinco días en pozos de fondo plano, los pulsos fueron dados con  $0,5 \mu\text{Ci}/\text{pozo}$  de  $^3\text{H}$ -Timidina, las barras son el promedio de tres pozos.



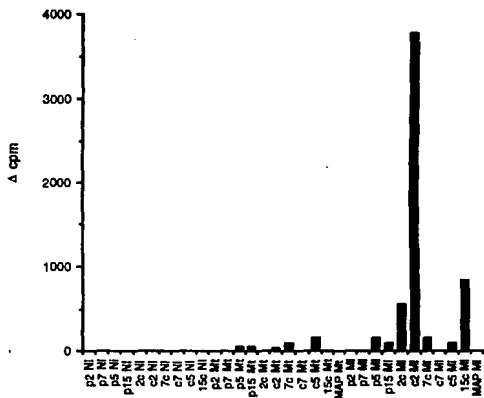


Fig. 9. Estimulación de células linfoides de ratones BALB/c Inmunizados con extractos solubles de *M. tuberculosis* (Mt) o *M. leprae* (Ml), o no inmunes (Ni).  $4 \times 10^4$  células fueron incubadas con 25  $\mu\text{g/mL}$  de cada péptido (p2, p7, p5, p15, 2C, C2, 7C, C7, C5, 15C o MAP) durante tres días (El MAP se incubó durante cinco días), se colocaron en pozos de fondo plano y se pulsaron con 0.5  $\mu\text{Ci/pozo}$  de  $^3\text{H}$ -Timidina. Las flechas muestran la actividad del dímero C2 en los tres distintos grupos: Ni, Mt y Ml.

Tomando en consideración los resultados obtenidos con los dímeros en la proliferación de células T y debido a que era necesario adicionarle un segundo péptido a la matriz de lisinas (la cual ya contenía al péptido 15), se seleccionó al péptido C2. De esta manera sería posible hacer la comparación de estimulaciones entre el péptido *per se*, el homodímero y un heteropolímero.

Como ya se ha mencionado, con el dímero C2 se observó la mayor estimulación de la proliferación. Es necesario hacer notar que el dímero 2C no estimuló de la misma manera como lo hizo el dímero C2. Este resultado puede deberse a que el epítipo se encuentre en el extremo carboxilo terminal del péptido 2, de tal forma, que al formar un homodímero donde las cisteínas que están formando el enlace disulfuro se encuentra en el extremo amino terminal, éstas no representarían ningún tipo de impedimento para el reconocimiento del epítipo que se encuentra en el otro extremo. Por otra parte, si el homodímero formado contiene a las cisteínas en el extremo carboxilo terminal, éstas podrían provocar algún arreglo tridimensional de la molécula que impediría el reconocimiento del epítipo por parte de la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad. Es necesario mencionar, que ésto solo podría ser factible siempre y cuando el dímero no estuviera siendo internalizado por la célula presentadora de antígenos, ya que uno de los primeros pasos que realiza dicha célula es el de reducir todos los enlaces disulfuro (6 y 8), para que de esta manera tengan mayor acceso las enzimas proteolíticas a sus sitios de acción, y así se puedan producir pequeños péptidos para ser presentados a los linfocitos.

En el supuesto caso de que los homodímeros (C2 y 2C) estuviesen siendo internalizados, debería de esperarse que tanto el péptido 2, como sus dos homodímeros, dieran respuestas muy similares.

Otro dato que sugiere que los homodímeros no están siendo internalizados, es el resultado negativo en la estimulación de la proliferación de los linfocitos inducidos por el MAP (ver figura 9). Al ser una molécula relativamente grande, es factible que el MAP esté siendo internalizado por la célula presentadora; por otro lado, si el dímero C2 se internalizara, presentaría los mismos sitios de corte que el péptido C2 que se encuentra en la secuencia del MAP, y aunque el péptido 15 no produzca estimulación (el otro componente del MAP), sí

se vería estimulación por parte del epítipo del péptido C2.

Un resultado que no se esperaba, es que el dímero C2 dió una buena estimulación y sin embargo, el péptido 2 no estimuló la proliferación celular. Como se mencionó anteriormente, el dímero 2C probablemente no provocó estimulación debido al impedimento estérico del enlace disulfuro en el epítipo; sin embargo, éste no es el caso para el péptido 2, ya que no posee ningún enlace disulfuro. El por qué un dímero provoca estimulación y el péptido *per se* no es capaz de hacerlo, es algo que no podemos explicar. Hasta el momento, no se cuenta con algún reporte que nos permita proponer una hipótesis al respecto.

Actualmente, no se cuenta con ningún reporte en la literatura en donde se haya probado un MAP en un sistema de proliferación celular de linfocitos T; todos los MAPs que han sido probados, han sido en un sistema de linfocitos B, es decir, se prueban con anticuerpos para incrementar de cierta forma la avidez del antígeno (33-36). Sin embargo, nos pareció interesante probarlo en este sistema, ya que al ser introducido el MAP dentro de la célula presentadora, ésta podría seleccionar mediante hidrólisis proteica un nuevo epítipo que fuera capaz de aumentar la respuesta de los linfocitos T (9,38,39).

Como se mencionó anteriormente, aún no se ha reportado por algún otro grupo, la utilización de MAPs en sistemas de linfoproliferación de células T. Los reportes que existen actualmente sobre este tipo de moléculas son orientados hacia la obtención de un incremento en el reconocimiento del anticuerpo por el antígeno, es decir, se busca aumentar la avidez del antígeno (un epítipo de malaria) hacia el anticuerpo (36).

Otros de los usos que se les ha dado a los MAPs es para implementar nuevas vacunas; es decir, se utiliza el MAP para inducir células de memoria de linfocitos B contra hepatitis y malaria (33,34,35,36). Como puede observarse, los MAPs solo han sido utilizados en sistemas de linfocitos B.

Solo un grupo, aparte del nuestro, ha intentado utilizar MAPs en un sistema de proliferación celular de linfocitos T. El Dr. J. Petersen, en Dinamarca, a identificado epítipos para células T murinas en la toxina

pertussis (28,29). Con estos epítomos de células T ha diseñado MAPs, los cuales han sido probados en un sistema de proliferación celular de linfocitos T( comunicación personal).

Desgraciadamente, aun no se han publicado los resultados de estos experimentos, y desconocemos hasta el momento, si estos MAPs lograron estimular igual o mayormente a los linfocitos que los péptidos sin polimerizar, o si al igual que nosotros, no observaron proliferación de los linfocitos T. Esto debido probablemente (como se mencionó anteriormente), a que las células presentadoras hidrolizan el epítomo.

La identificación de un epítomo inmunoespecífico, para las distintas especies de micobacterias, no es tarea fácil, ya que comparten entre sí muchos de sus antígenos (15) y esto complica su identificación. Es por ésto, que al igual que nuestro grupo de investigación, otros grupos se encuentran realizando esta búsqueda. Por ejemplo, en Colombia, el Dr. Patarroyo ha identificado una proteína de 14 kDa que aparentemente solo se encuentra en *Mycobacterium tuberculosis* (14,26). También él, al igual que nosotros, ha sintetizado péptidos sintéticos de los epítomos, para utilizarlos como un ensayo inmunodiagnóstico en la identificación de pacientes con tuberculosis.

## CONCLUSIONES

- I. Se realizó la síntesis de seis péptidos correspondientes a secuencias de aminoácidos de tres proteínas (18, 28 y 65 KDa) de *Mycobacterium leprae*, con los cuales se realizaron los estudios indicados en la tesis.
- II. En la síntesis manual de los péptidos se obtuvo un mayor rendimiento que en la síntesis automática.
- III. Con los péptidos sintetizados se formaron nueve homodímeros para ser probados en un sistema de proliferación celular de linfocitos T.
- IV. Al final de la oxidación en la formación de los dímeros, se obtuvo aproximadamente un 50 % de péptido oxidado y un 50 % de péptido reducido, es decir, la eficiencia de oxidación no fué muy buena.
- V. Se sintetizó un MAP, el cual contiene la secuencia de dos péptidos, del péptido 15 y el péptido 2; este MAP fué probado en un sistema de proliferación celular de linfocitos T.
- VI. El punto máximo de estimulación para el mitógeno concanavalina A fué a las 48 hrs, mientras que para el péptido 2 fué a las 72 hrs y para el extracto soluble de micobacterias fué de 120 hrs.
- VII. De los nueve homodímeros formados, solo uno de ellos, el dímero C2 mostró un incremento en los resultados de proliferación celular; los ocho restantes no mostraron esta capacidad.
- VIII. La construcción del MAP no mostró un aumento en la proliferación celular de los linfocitos T, probablemente debido a que la célula presentadora no generó los epítotos adecuados.

## PERSPECTIVAS

Dentro de las perspectivas de este trabajo, se encuentra la de probar los dímeros y el MAP sintetizados, en un sistema de proliferación celular *in vitro* de linfocitos T humanos, ya que el sistema montado fué usando ratones Balb/c y éstos no presentan las mismas características de restricción que las células humanas. Es decir, el hecho de que la mayoría de los dímeros y el MAP no hayan dado respuesta en una cepa singénica con un solo haplotipo de MHC de ratón, no implica que en un sistema abierto como es el caso con los humanos ocurra lo mismo.

Otra de las perspectivas dentro del trabajo, es la de realizar pruebas de hipersensibilidad tardía tipo IV en humanos con los dímeros y el MAP, con el fin de avanzar hacia un ensayo inmunológico del tipo dérmico en humanos.

## REFERENCIAS

1. Almeida J. O. (1970). Serology in leprosy. Bull. WHO 42: 673-702.
2. Baird. (1988). A major antigen from Mycobacterium tuberculosis which is homologous to the heat shock proteins groES from E. coli and the htpA gene product of Coxiella burnetii. Nucleic Acids Res. 16: 9047.
3. Booth et. al. (1988). Antigenic proteins of Mycobacterium leprae. J. Immunol. 140: 597-601.
4. Buos S. and Werdelin O. (1986). Oligopeptide antigens of the angiotensin lineage compete for presentation by paraformaldehyde treated accessory cells to T cells. The Journal of immunology 136(2).
5. Cherayil and Young. (1988). A 28 kDa protein from Mycobacterium leprae is a target of the human antibody response in lepromatous leprosy. J. Immunol. 141: 4370-4375.
6. Collins D., Unanue E. and Harding C. (1991). Production of disulfide bonds within lysosomes is a key step in antigen processing. The Journal of immunology 147(12).
7. Convit J., Aranzazu N., Pinarci M. E. and Ulrich M. (1979). Immunological changes observed in indeterminate and lepromatous patients and Mitsuda-negative contacts after inoculation of a mixture of M. leprae and BCG. Clin. Exp. Immunol 36: 214-220 .
8. Diment S. (1990). Different roles for thiol and aspartyl proteases in antigen presentation of ovalbumin. The Journal of immunology.
9. Dolovitch T., Semple J. and Phillips M. (1988). Influence of antigen processing on immune responsiveness . Immunology.

Today 9(7 and 8).

10. Engers H. D. and Workshop participants. (1985). Results of a World Health Organization-Sponsored workshop to characterize antigens recognized by Mycobacterium-Specific monoclonal antibodies. Infect. Immun. 51: 603-605.
11. Engers H. D. and Workshop Participants. (1985). Results of a World Health Organization-Sponsored workshop on monoclonal antibodies to Mycobacterium leprae. Infect. Immunol. 48: 603-605.
12. Estrada-G I., Gutiérrez M., Esparsa J., Quesada-Pascual F., Estrada-Parra S. and Possani L. (1992). Use of synthetic peptides corresponding to sequences of Mycobacterium leprae proteins to study delayed-type hypersensitivity response in sensitized Guinea pigs. International Journal of Leprosy 60(1): 18-27.
13. Estrada-Parra S., Rojas-Espinosa O., Quezada-Pascual F., Estrada-García I., Santos-A L. (1989). La lepra: Investigación en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Rev. Latinoamer. Microbiol. 31: 251-257.
14. Falla J., Parra C., Mendoza M., Franco L., Guzmán F., Forero J., Orozco O. and Patarroyo M. (1991). Identification of B and T cell epitopes within the MTP40 protein of Mycobacterium tuberculosis and their correlation with the disease course. Infection and Immunity 59(7): 2265-2273.
15. Garcia et. al. (1989). Homology of the 70 kiloDalton antigens from Mycobacterium leprae and Mycobacterium bovis with the Mycobacterium tuberculosis 71 Kilodaltons antigen and with the conserved heat shock protein 70 of eucaryotes. Infect. Immun. 57: 204-212.
16. Gaylord H. and Brennan T. (1987). Leprosy and the leprosy bacillus: Recent developments in characterization of antigens and immunology of the disease. Annu. Rev. Microbiol. 41: 645-675.



17. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas. (1992). *Lepra: Pasado, presente y perspectivas para el futuro. Publicación Técnica del INDRE 15.*
18. Jensen P. E. (1991). Enhanced binding of peptide antigen to purified class II major histocompatibility glycoproteins at acidic pH. J. Exp. Med. 174: 1111-1120.
19. Klatser P., vanRens M. and Eggelte T.A. (1984). Immunochemical characterization of Mycobacterium leprae antigens by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis immunoperoxidase techniques (SGIP) using patients' sera. Clin. Exp. Immunol. 55: 537-544.
20. Latapi F. (1972). *Lepra. Breve información para el médico general. Dermatología Clínica. Ed. J. L. Cortez: 583-620.*
21. Maurice J. La lepra. Mundo Científico 7(73): 1020-1028.
22. Mehra V. and Bloom B. R. (1979). Induction of cell mediated immunity to M. leprae in guinea pigs. Infect. Immun 23: 787-794.
23. Merrifield B. R. (1963). Solid phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide. J. Am. Chem. Soc. 85: 2144-2154.
24. Minden P., Kelleher P.J., Freed J.H., Nielsen L.D., Brennan P.J., McPheron L. and McClatchy J.K. (1984). Immunological evaluation of a component isolated from Mycobacterium bovis BCG . Infect. Immunol. 46: 519-525.
25. Mitsuda K. (1953). On the values of a skin reaction to suspensions of leprous nodules. Int. J. Lepr. 21: 347-358.
26. Patarroyo M., Parra C., Pinilla C., Del Portillo P., Torres M., Clavijo P., Salazar L. and Jimenez C. (1986). Immunogenic synthetic peptides against mycobacteria of potential immunodiagnostic and immunoprophilactic value. Symposium on the immunology og leprosy 57(2): 163-168.

27. Patel P. J. and Lefford J. M. (1978). Induction of cell mediated immunity to *M. leprae* in mice. Infect. Immun. 19: 87-93.
28. Petersen J., Holm A., Ibsen P., Haslov K., and Heron I. (1993). Identification of murine T cell epitopes of the S4 subunit of pertussis toxin. Infection and Immunity 61(1): 56-63.
29. Petersen J., Holm A., Ibsen P., Haslov K., Capiou C and Heron I. (1992). Identification of human T cell epitopes on the S4 subunit of pertussis toxin. Infection and Immunity 60(10): 3962-3970.
30. Rothbard J. and Geffer M. (1991). Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins. Annu. Rev. Immunol. 9: 527-565.
31. Sathish M., Esser R., Thole J. and Clark-Curtiss J. (1990). Identification and characterization of antigenic determinants of *Mycobacterium leprae* that react with antibodies in sera of leprosy patients. Infect. Immunol. 58: 1327-1336.
32. Smelt A. H., Rees R. J. W. and Liew F. Y. (1981). Induction of delayed-type hypersensitivity to *M. leprae* in healthy individuals. Clin. Exp. Immunol. 44: 501-506.
33. Tam J. P. (1988). Synthetic peptide vaccine design: Synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5409-5413.
34. Tam J. P. and Lu Y. (1989). Vaccine engineering: Enhancement of immunogenicity of synthetic peptide vaccines related to hepatitis in chemically defined models consisting of T- and B-cell epitopes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9084-9088.
35. Tam J. P. and Zavala F. (1989). Multiple antigen peptide: A novel approach to increase detection sensitivity of synthetic peptides in solid-phase immunoassays. J. of Immunol. Methods 124: 53-61.

36. Tam J. P., Clavijo P., Lu Y., Nussenzweig V., Nussenzweig R. and Zavala F. (1990). Incorporation of T and B epitopes of the circumsporozoite protein in a chemically defined synthetic vaccine against Malaria. J. Exp. Med. 171: 299-306.
37. Thole J., Stabel L., Suykerbuyk M., Dewit M., Klatser P., Kolk A. and Hartskeerl R. (1990). A major immunogenic 36000-molecular-weight antigen from *Mycobacterium leprae* contains an immunoreactive regions of proline-rich repeats. Infect. Immunol. 58: 80-87.
38. Van Noort J., Boom J., Van der Drift A., Wagenaar J., Boots A. and Boog C. (1991). Antigen processing by endosomal proteases determines which sites of sperm-whale myoglobin are eventually recognized by T cells. Eur. J. Immunol. 21: 1989-1996.
39. Yoshikawa M., Watanabe M. and Hozumi N. (1987). Analysis of proteolytic processing during specific antigen presentation. Cellular Immunology 110: 431-435.
40. Young D., Lathigra R., Hendrix R., Sweetser D. and Young R. (1988). Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4267-4270.
41. Young R. A., Bloom B., Grossinsky C., Ivanyi J., Thomas D. and Davis R. (1985). Dissection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 2583-2587.

## **ANEXOS**

# ASIA-PACIFIC JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

February 23, 1994

Dr. Lourival Domingos POSSANI  
Departamento de Bioquímica  
Instituto de Biotecnología  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Apdo. Postal 510-3  
Cuernavaca, Morelos 62271 México  
Fax: (52) (73) 17-2388

Dear Dr. Possani:

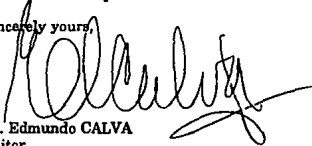
Please find enclosed my own comments and those of two reviewers (A and B), regarding the manuscript entitled "The immunogenic activity of synthetic peptides corresponding to *M. leprae* protein sequences" by M.C. Gutiérrez, I. Estrada-G., S. Estrada-P., F. Quesada P., A.F. Licea, and L.D. Possani (code ECAP 9401), which was received in my office on December 20, 1993, to be considered for publication in our Journal.

My comments are marked directly on the manuscript; aside from style considerations, I believe that you must explain more about the proteins from which the peptides were designed for testing immunogenic activity, say more about possible properties of the peptides (e.g. why could some of them be more immunogenic than others) and present more clearly the negative controls used for experiments of Figures 2 and 3.

As indicated by Reviewer A, it is important to test the reproducibility of the induration data of Figure 1 and of the stimulation indices of Figure 3; this reviewer recommends "Acceptable after minor revision". Reviewer B recommends "Acceptable after major revision" and makes several valuable comments, especially stressing the fact that data from individual cell experiments should be included.

My recommendation for your manuscript is to accept after revision, following all the included comments and queries. I look forward to receiving the revised version of your paper.

Sincerely yours,



Dr. Edmundo CALVA  
Editor  
Fax (52) (73) 17-2399  
e-mail: ecalva@pbr322.ceingebi.unam.mx

**THE IMMUNOGENIC ACTIVITY OF SYNTHETIC PEPTIDES  
CORRESPONDING TO Mycobacterium leprae PROTEIN SEQUENCES**

by

María C. Gutiérrez\*, Iris Estrada-G.#, Sergio Estrada-Parra#,  
Fausto Quesada Pascual#, Alexei F. Licea\* and Lourival D.  
Possani\*+.

from

\*Departamento de Bioquímica, Instituto de Biotecnología,  
Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3,  
Cuernavaca Mor. 62271 MEXICO.

#Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias  
Biológicas, Instituto Politécnico Nacional - Prolongación de Carpio  
y Plan de Ayala. México D.F. 11340 MEXICO.

+Author to whom correspondence should be addressed: Dr. Lourival D.  
Possani, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biotecnología,  
Universidad Nacional Autónoma de México - Av. Universidad 2001,  
Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62271 MEXICO.

\* Telephone number (52)(73)114900 to 04 Fax number (52)(73)172388

Short title: Synthetic immunogens for leprosy.

#### ABSTRACT

Seven peptides containing 15-25 amino acid residues, which correspond to segments of the amino acid sequences from two heat shock proteins, the 65 kDa and the 18 kDa, a 28 kDa superoxide dismutase (SOD) and a 28 kDa iron-regulated protein from Mycobacterium leprae, were synthesized by the solid phase method of Merrifield. Guinea pigs, immunized with single peptides, gave positive delayed-type hypersensitivity (DTH)-responses, when challenged with the homologous peptides. Similarly, the capability of these peptides to induce T-cell proliferation *in vitro* was assayed in groups of BALB/c mice, previously immunized with each synthetic peptide. Some of the peptides were able to sensitize a T-cell population, which later recognized the protein in its native form in a cell-free extract from M.leprae. In other experiments, no antibodies against any of the synthetic peptides were detected, neither in the sera of lepomatous leprosy (LL) patients, nor in the sera of guinea pigs immunized with M.leprae. Therefore, these synthetic peptides are immunogens capable of priming T-cells of guinea pigs and mice.

## INTRODUCTION

Leprosy is a human disease caused by an intracellular infectious organism, Mycobacterium leprae<sup>1</sup>, which can be cured by chemotherapy<sup>2</sup>. However, the long incubation period before the first symptoms develop, the existence of individuals who have already encountered but overcome infection, and both the lack of continuity of observation of patients under treatment, and the lack of adequate control of infected people, have prompted the need for a quick and reliable diagnostic test for possible treatment and/or control of the spread of the disease<sup>2</sup>. Lepromin<sup>3</sup> and leprosin-A<sup>4,5</sup> are two preparations widely used in skin tests for leprosy<sup>6,7</sup>. Both are relatively crude preparations made from heat-killed M. leprae or from sonicates of irradiated and heat-killed bacilli and have a number of important drawbacks. Both preparations are very complex mixtures of components, which imposes technical problems in standardizing different batches. Thus, the production of a well-defined antigen preparation for leprosy skin testing, is of great importance.

One of the most important properties of a skin test reagent is its ability to induce a high level of cell-mediated immune response. We have thus evaluated the ability of a set of synthetic peptides to induce cell-mediated immunity in guinea pigs and mice. Some of these peptides were chosen because they have previously been shown to stimulate human or murine T-cells<sup>8,9,10</sup>, and others were designed to contain potential T-cell epitopes, as identified using the MSEQ



program<sup>11</sup>.

## MATERIALS AND METHODS

### Antigens. Synthetic peptides

Seven peptides were synthesized by the manual solid-phase method of Merrifield<sup>12</sup>, using t-BOC-amino acids and chloromethyl resins. A more detailed description of the synthesis, purification by high performance liquid chromatography and chemical characterization of synthetic peptides can be found elsewhere<sup>13</sup>. Table I shows the sequences of these synthetic peptides.

### M. leprae soluble extract (MLSE)

MLSE was obtained as described previously<sup>13</sup>. Briefly, suspensions of M. leprae were first sonicated and then centrifuged at 12,500 g for 15 min, and the supernatants were recovered as soluble extracts.

### Sensitisation

Groups of three female outbred Hartley guinea pigs (300-350 g) received intramuscularly (i.m.) a synthetic peptide (500 µg), in incomplete Freund's adjuvant (IFA). Skin tests were performed (see below) in all animals after four weeks. Reactions were considered positive when the induration diameter was equal or greater than 5mm.

### Skin tests

Sensitized guinea pigs were tested at different sites, with 5  $\mu\text{g}$  of MLSE and with the peptide used for immunization (i.e. the homologous peptide) at doses of 250, 100 and 0.05 $\mu\text{g}$ . Antigens were injected intradermally (i.d.) in 0.1 ml of saline on both flanks. Diameters of induration appearing at the test sites were measured after 4, 24, and 48h. Control animals, immunized with IFA lacking a peptide, were skin-tested with MLSE (5  $\mu\text{g}$ ) and with each synthetic peptide (100  $\mu\text{g}$  and 0.05  $\mu\text{g}$ ).

#### **Lymphocyte stimulation assay (LS) in mice**

Groups of three BALB/c mice were immunized subcutaneously (s.c.) in each hind footpad, with 10  $\mu\text{g}$  of each of the seven synthetic peptides in IFA. Seven days later, all animals received a second dose, again in IFA. Draining lymph nodes were removed the next day, and cells were disaggregated. Pools of cells from all three mice immunized with a given peptide were prepared. Cell cultures were set up in triplicate in 96-well plates, using  $4 \times 10^5$  cells/well in RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., U.S.A.) supplemented with 2 mM L-glutamine,  $5 \times 10^{-5}\text{M}$  2-mercaptoethanol and 5% fetal calf serum (GIBCO BRL, Cat. No. 230-6170AG, Grand Island, NY, USA), containing either homologous peptide (1, 10 or 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or MLSE (25 or 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Plates were incubated for 4 days at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$ , after which they were pulsed with 1  $\mu\text{Ci}$  of [ $^3\text{H}$ ]thymidine per well for 16h, and harvested onto glass filter papers. [ $^3\text{H}$ ]Thymidine incorporation was quantitated by liquid scintillation counting. The mean counts per minute (cpm) for each group was

determined, and results were presented as the stimulation index (SI), given by (cpm of cells plus antigen)/(cpm of cells without antigen). Assay variation between replicates was less than 20%.

#### Detection of antibodies using ELISA assays

In order to determine the best conditions for the ELISA, all synthetic peptides were diluted at 5  $\mu\text{g/ml}$  in either of four different solutions: 0.1M sodium bicarbonate pH 9.4, 0.1M phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.2, water, and 0.1M citrate phosphate buffer (CPB) pH 5.0. Diluted peptide (100  $\mu\text{l}$ ) was added to each well of three different microtiter plates: Immulon 2 (Dynatech Lab.), Maxisorp (Nunc) and polyvinyl (COSTAR). This procedure was performed in duplicate. All six plates were incubated overnight at 4°C, followed by incubation for 2 h at 37°C with one of the following reagents: 2% skimmed milk, 1% bovine serum albumin (BSA) or 5% glycine (all dissolved in PBS containing 0.05% Tween 20 (PBST)). Half of the plates were washed twice with PBST and incubated overnight at 4°C, with various dilutions of sera from lepromatous leprosy (LL) patients (see acknowledgments). The remaining plates were washed similarly and incubated with sera from guinea pigs immunized with  $5 \times 10^9$   $^{60}\text{Co-M.leprae}$ . Both types of sera were assayed at dilutions of 1:5, 1:10, 1:20 and 1:40. Plates were washed three times with PBST, incubated for 2 h at 37°C with the appropriate peroxidase conjugate, and washed five times with PBST, after which the enzymatic reaction was developed with 2,2'-azinobis (3-ethylbenz-thiazoline sulfonic acid) chromogen (Sigma Chemical

Co, Cat. No.A-1888, St. Louis, MO., USA), and read at OD<sub>405</sub>.

#### **Statistical methods**

Statistical analyses of the results obtained were performed by one-way analysis of variance and Student's t test.

### **RESULTS**

#### **Induction of DTH with synthetic peptides and MLSE in peptide-sensitized guinea pigs**

Figure 1 shows the results obtained when 100 µg of each synthetic peptide was (Table I) used intradermally to induce DTH in guinea pigs, similar results were obtained with 250µg (not shown). Positive DTH responses were only obtained with the homologous peptides (more than 5 mm induration); challenge of non-immunized animals with all peptides failed to give DTH responses. All the peptides except P1 induced positive DTH reactions, though P7 gave only borderline responses; induration was never obtained when the same animals were challenged with the smaller dose (0.05µg (50ng)). All animals were also challenged with MLSE: only those animals previously sensitized with peptides P2, P5 and P7 produced positive DTH reactions, although the response to peptide P2 was borderline.

#### **Lymphocyte stimulation assays (LS)**

Figure 2 shows the results of LS assays in which three concentrations of peptides, 1, 10 and 50 µg/ml, were used for *in*

*in vitro* activation of T-cells from mice immunized with the synthetic peptides. In all cases, the greatest levels of stimulation were obtained with peptides at a concentration of 10  $\mu\text{g/ml}$ . Similar results were obtained in a second, independent, experiment. Figure 3 shows the SI obtained when lymph node cells from mice immunized, with each synthetic peptide, were stimulated with the homologous peptide (10  $\mu\text{g/ml}$ ) or MLSE (25  $\mu\text{g/ml}$ ). Upper and lower panels are two independent experiments in the same conditions. While low SI values were obtained when homologous peptides were used for stimulation, lymph node cells from animals immunized with P6, P7, P9 and P10 were stimulated more strongly with MLSE. Controls with Concanavalin-A gave SI values greater than 50 (data not shown).

**ELISA with sera from guinea pigs sensitized with M. leprae and from lepromatous leprosy patients**

Each synthetic peptide was used as antigen in ELISA assays to determine whether sera from immunized guinea pigs and a pool of sera from 15 LL patients contained antibodies recognizing the peptides. No antibodies were detected either in sera from guinea pigs or in the pool of sera from LL patients, even at a 1:5 serum dilution. All sera had very high antibody titers to MLSE when measured in the same system (mean titer 1:512).

**DISCUSSION**

Both lepromin and leprosin-A, two of the more widely used skin test reagents for leprosy have a number of disadvantages when used for

diagnostic purposes<sup>14</sup>. One important problem is the need for growing large quantities of the pathogen: M.leprae only grows in certain animals, such as the nine-banded armadillo Dasypus novemcinctus<sup>15</sup>. Both preparations consist of complex mixtures of components, which impose technical problems in standardizing different batches, and there is a definite risk of contamination with live infectious bacilli<sup>14</sup>. Thus, the production of a simpler, reliable, specific and very well-defined antigen preparation for leprosy skin testing is a highly desirable objective. Currently favored approaches to this aim include the use of recombinant DNA techniques<sup>16</sup> and synthetic peptides, as we describe here. Since M.leprae is an intracellular infectious agent, cell-mediated immunity (CMI) is expected to confer protection against leprosy<sup>6</sup>, rather than humoral immunity acting through circulating antibodies.

Measurements of skin induration reactions in experimental animals is considered an adequate method of assessing CMI responses. Furthermore, induction of DTH to M.leprae is well documented<sup>17</sup>, and has been demonstrated in guinea pigs<sup>17</sup>, mice<sup>18</sup> and humans<sup>6,7</sup>. The recent availability of primary structure data for several M.leprae proteins, obtained using recombinant DNA techniques<sup>19</sup>, and the use of recombinant proteins to identify some of their T-cell epitopes has allowed the design and synthesis of peptide fragments, corresponding to these epitopes. These have great potential for developing skin test diagnostic reagents for leprosy, and may be used for vaccine development. Given that one of the most important

properties of such synthetic peptides is their ability to induce immune responses, we chose seven peptides, known or suspected (by computer analysis) to contain M. leprae T-cell epitopes <sup>8,9,10,11</sup>. The immunogenicity of these peptides was assessed in two different animal species: guinea pigs and mice. Guinea pigs are classically used for measurement of DTH, while the mouse provides the standard system for determining lymphocyte stimulation: both tests measure T-cell reactivity.

Assessment of DTH responses in guinea pigs showed that, except for P1 (from the 65 kDa protein), all the other peptides, i.e. P2 (from the 65 kDa protein, P5 and P6 (both from the 28 kDa protein), P7 (from the 18 kDa protein), and P9 and P10 (both from the 28 kDa SOD) (Table I) induced positive DTH-responses in animals previously sensitized with the homologous peptide. More interesting was the fact that immunization of guinea pigs with P5 and P7 resulted in sensitization of a cell population, that subsequently presumably recognized the native proteins (i.e. the 28 kDa and 18 kDa proteins) in MLSE (Fig. 1). That these were specific DTH reactions was shown by the fact that none of the control (non-immunized) animals showed positive indurations with any of the peptides (Fig. 1, N), and we have thus far never obtained positive DTH reactions with MLSE in non-immune animals. The fact that positive DTH reactions were only seen with a high dose of peptide (250 and 100  $\mu$ g) suggests that they are less immunogenic than the "parent" proteins in the native context, in the sense that they may produce

smaller numbers of immunocompetent cells. The lower doses (50ng) may thus have been below the threshold for activating the number of immunocompetent cells required for a DTH response, although we have previously shown that challenge with this quantity is sufficient to induce DTH responses when antigens are presented in the form of MLSE<sup>13</sup>.

Three different concentrations of peptides were used to stimulate mouse lymph node cells from animals previously immunized with synthetic peptides. *In vitro* lymphocyte stimulation was dose-dependent (Fig. 2): the highest SIs were obtained using 10 µg/ml of each peptides. Although the SIs observed, in both, this and in an independent experiment, with the homologous peptides were not high, higher values were obtained with MLSE, though only with the cells from mice immunized with peptides P6, P7, P9 and P10 (Fig. 3). It thus appears, as in the case of the guinea pig DTH measurements, that immunization of mice with some of the peptides resulted in sensitization of T-cell populations, which subsequently recognized the native 28 kDa (P6), 18 kDa (P7) and 28 kDa SOD (P9 & P10) proteins in the MLSE (Fig. 3).

These results thus demonstrate that synthetic peptides are able to sensitize T-cell populations in guinea pigs and mice, in such a way that they apparently recognize the protein in its native form in the MLSE. These results also indicate that simple peptides are capable of inducing DTH, contrary to the belief that polymerization



of short amino acid segments is required. This confirms data previously reported by Patarroyo et al.<sup>20</sup>, who reached similar conclusions using even shorter synthetic peptides corresponding to M.tuberculosis proteins.

Analysis of LS responses in mice immunized with the synthetic peptides showed that peptides P6 (from the 28 kDa protein), P7 (from the 18 kDa protein), and P9 and P10 (both from the 28 kDa SOD) primed T-cell populations for a proliferative responses to the native molecules in the MLSE. The greatest proliferation was obtained with P9 (amino acids 46-60 of the SOD sequence); both P9 and P10, chosen using the MSEQ program<sup>11</sup>, contain motifs specific to T-cell epitopes. The peptides P9 and P10 were shown to be more immunogenic in both systems (DTH and LS), more likely due to intrinsic immunogenic properties of the native protein from which they were derived (28 kDa SOD). Peptide P5 was unable to prime cells to recognize the native molecule in the MLSE.

The negative results obtained in the ELISA antibody assays did not result from failure of the peptides to attach to the various plastic supports (positive picric acid tests for the presence of bound polypeptides were obtained with all supports and all peptides; results not shown). Thus, if we assume that negative results are not caused by an unknown artefact, these findings indicate that amino acid sequences corresponding to T-cell epitopes do not necessarily promote the synthesis of detectable levels of

circulating antibodies.

In conclusion, these studies show that synthetic peptides may have some potential in the development both of diagnostic test reagents, including those based on induction of DTH responses, and of vaccines against leprosy. In order for peptides to induce protection one would expect them first to be immunogenic, something we have shown in this paper. The knowledge of more M. leprae specific protein amino acid sequences and the understanding of how these proteins are processed by antigen-presenting cells are two conditions bound to play a key role in the development of a skin test for leprosy.

#### ACKNOWLEDGMENTS.

The research presented here was supported in part by a grant from the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases No. T16/181/174. The sera from LL patients, provided to us by Dr. Mario Gomez, from the Hospital General, is greatly appreciated. Encouragement and support received from Dr. H. Engers from the WHO is greatly acknowledged. We also thank WHO consultants for this project: Drs. J. Stewart, J. Tam, P.L. Fletcher, D.B. Young and M.J. Colston. The technical assistance of Sandra Contreras, Cipriano Balderas and Timoteo Olamendi is appreciated. L.D. Possani is a Howard Hughes Medical Institute International Research Scholar (Grant No.75191-527104).

#### REFERENCES

1. Hansen, G.A. (1874). Investigations concerning the etiology of leprosy. *Norsk Magasin for Laegevidenskaben*. **4**: 76-79.
2. WHO Expert Committee on Leprosy. (1988). WHO Technical Reports. **Series 768**. World Health Organization, Geneva.
3. WHO Expert Committee on Leprosy. (1970). WHO Technical Reports. **Series 459**. World Health Organization, Geneva.
4. Kirchheimer, W.F., Prabhakaran, K., Harris, E.B., Sanchez, R.M. & Shannon, E.J. (1975). Preparation of protein from M.leprae and skin test responses of vaccinated armadillos. *Lepr. India*. **47**: 142-150.
5. Stanford, J.L. Immunologically important constituents of mycobacteria: Antigens. In: *The Biology of Mycobacteria* vol. 2 (Ratledge, C. & Stanford, J.L., eds.), Academic Press, London, pp 85-127, 1985.
6. Convit, J., Aranzazu, N., Ulrich, M., Pinardi, M.E., Reyes, O. & Alvarado, J. (1982). Immunotherapy with a mixture of M.leprae and BCG in different forms of leprosy and in Mitsuda-negative contacts. *Int. J. Lepr.* **50**: 415-424.
7. Smelt, A.H.M., Rees, R.J.W. & Liew, F.Y. (1981). Induction of delayed-type hypersensitivity to M.leprae in healthy individuals. *Clin. Exp. Immunol.* **44**: 501-506.
8. Mehra, V., Sweetser, D. & Young R.A. (1986). Efficient mapping of protein antigenic determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

U.S.A. 83: 7013-7017.

9. Booth, R.J., Harris, D.P., Love, J.M. & Watson, J.D. (1988). Antigenic proteins from M.leprae. Complete sequence of the gene for the 18-kDa protein. J. Immunol. 140: 597-601.
10. Brett, S.J., Lamb, J.R., Cox, J.H., Rothbard, J.B., Mehlert, A. & Ivannyi, J. (1989). Differential pattern of T-cell recognition of the 65-kDa mycobacterial antigen following immunization with the whole protein or peptides. Eur. J. Immunol. 19: 1303-1310.
11. Black, S.D. & Glorioso, J.C. (1986). MSEQ: A Microcomputer-Based Approach to the Analysis, Display and Prediction of Protein Structure. BioTechniques. 4: 448-460.
12. Merrifield. B.R. (1963). Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. J. Am. Chem. Soc. 85: 2144-2154.
13. Estrada-G., I., Gutierrez, M.C., Esparza, J., Quesada-Pascual, F., Estrada-Parra, S. & Possani, L.D. (1992). Use of synthetic peptides corresponding to sequences of Mycobacterium leprae proteins to study delayed-type hypersensitivity responses in sensitized guinea pigs. Int. J. Lepr. 60: 18-27.
14. Shinnick, T.M. (1986). Peptides as potential immunodiagnostic reagents to detect mycobacterial infections. Lepr. Rev. 57 (Suppl.2): 151-155.
15. Kirchheimer, W.F. & Storrs, E.E. (1972). Attempts to establish

- the armadillo (Dasypus novemcinctus Linn.) as a model for the study of leprosy. *Int. J. Lepr.* **39**: 693-702.
16. Jacobs, W.R., Tuckman, M. & Bloom, B.R. (1987). Introduction of foreign DNA into mycobacteria using a shuttle plasmid. *Nature*. **327**: 532-534.
  17. Mehra, V. & Bloom, B.R. (1979). Induction of Cell-Mediated Immunity to M.leprae in guinea pigs. *Infect. Immun.* **23**: 787-794.
  18. Lovick, M. & Closs, O. (1983). Induction of delayed type hypersensitivity against ultrasonicated Mycobacterium lepraemurium bacilli without simultaneous local reactivity against live bacilli or protective immunity. *Clin. Exp. Immunol.* **53**: 319-327.
  19. Young, R.A., Mehra, V., Sweetser, D., Buchanan, T.M., Clark-Curtiss, J.E., Davies, R.W. & Bloom, B.R. (1985). Genes for the major protein antigens of the leprosy parasite M.leprae. *Nature*. **316**: 450-452.
  20. Patarroyo, M.E., Parra, C.A., Pinilla, C., Del Portillo, P., Torres, M.L., Clavijo, P., Salazar, M.L. & Jiménez, C. (1986). Immunogenic synthetic peptides against mycobacteria of potential immunodiagnostic and immunoprophylactic value. *Lepr. Rev.* **57 (suppl. 2)**: 163-168.
  21. Cherayil, B.J. & Young, R.A. (1988). A 28-kDa protein from M.leprae is a target of the human antibody response in lepromatous leprosy. *J. Immunol.* **141**: 4370-4375.

22. Thangaraj, H.S., Lamb, F.I., Davies, E.O., Jenner, P.J., Jeyakumar, L.H. & Colston, M.J. (1990). Identification, sequencing and expression of M. leprae superoxide dismutase, a major antigen. *Infect. Immun.* 58: 1937-1942.

#### LEGENDS TO FIGURES

##### Fig.1: DTH-Responses in Guinea Pigs Sensitized with Synthetic Peptides

Groups of three guinea pigs were immunized i.m. with each synthetic peptide (500  $\mu$ g). After 4 weeks, DTH-responses were induced by i.d. injection of 100  $\mu$ g of homologous peptides (shaded bars) and 5  $\mu$ g of MLSE (white bars). Diameter of induration (in mm) was measured at 48 h. Reactions were considered positive when the induration diameter was equal or greater than 5 mm. Each bar represents the mean of reactions obtained with 3 guinea pigs. N indicates the mean induration obtained with all peptides in three non-immunized guinea pigs. Values for P5, P6, P9 were statistically significant at a level of  $p < 0.001$ , while for peptide P10 at a level of  $p < 0.005$  (using the Student's t test).

##### Fig.2: Titration of Peptide Concentrations for Lymphocyte Stimulation Assays in Mice

Cells from individual groups of BALB/c mice, immunized with 20  $\mu$ g of each of the peptides P1, P2, P5, P6, P7, P9 and P10, were cultured in the presence of peptides (1, 10 and 50  $\mu$ g/ml). Cultures were pulsed with 1  $\mu$ Ci  $^3$ H thymidine on day 4. Stimulation index (SI) is given by (cpm of cells plus antigen)/(cpm of cells alone).

##### Fig.3: Lymphocyte Stimulation Responses to Homologous Peptides and MLSE in Mice

Panels a and b are two independent experiments under the same



conditions. Cells from individual groups of BALB/c mice, immunized with 20  $\mu$ g of each of the peptides P1, P2, P5, P6, P7, P9 and P10, were cultured in the presence of 10  $\mu$ g/ml of homologous peptide (shaded bars), or M. leprae soluble extract (MLSE) (white bars). All cultures were pulsed with 1 $\mu$ Ci of [<sup>3</sup>H]-thymidine on day 4. Stimulation index (SI) is given by (cpm of cells plus antigen)/(cpm of cells alone).

**TABLE I: Proteins from M. leprae and corresponding amino acid (aa) sequences of fragments chosen for the synthesis of antigenic peptides.**

---

1. From the 65KDa protein <sup>a</sup> :	
P1 (from aa 195-219)	KGYSISGYFVTDARQEAVLEEPYIL
P2 (from aa 201-219)	YFVTDARQEAVLEEPYIL
2. From the 28KDa protein <sup>b</sup> :	
P5 (from aa 24-48)	PCAYFLVYEPTASAKPAAKHYEFKQ
P6 (from aa 181-205)	VNDLLKVANQLGASQVMDLIKGVVM
3. From the 18KDa protein <sup>c</sup> :	
P7 (from aa 8-23)	FRELDRAEQVLGTSA
4. From the 28SOD protein <sup>d</sup> :	
*P9 (from aa 46-60)	KLDEARAKDDHSAIF
*P10 (from aa 100-117)	DETFGSFDKFRAQFSAAA

---

\*These peptides were chosen with the MSEQ program<sup>11</sup>.

<sup>a</sup> and <sup>c</sup> Members of the heat shock protein family<sup>8,9</sup>.

<sup>b</sup> Possible iron-regulated protein<sup>21</sup>.

<sup>d</sup> Superoxide dismutase<sup>22</sup>.

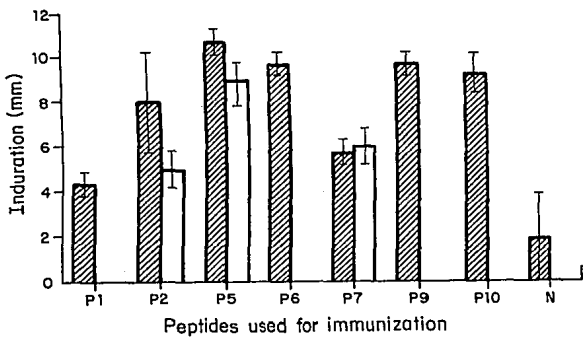


FIG. 1

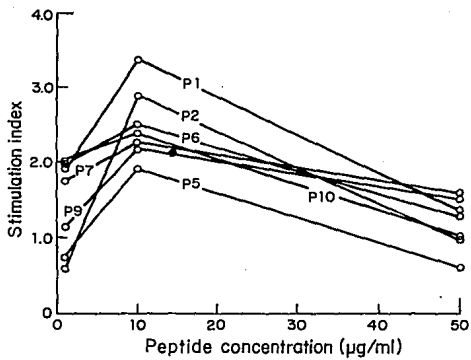


FIG. 2

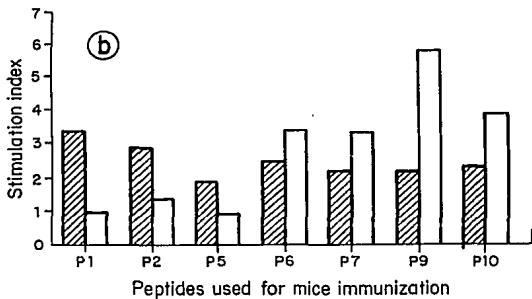
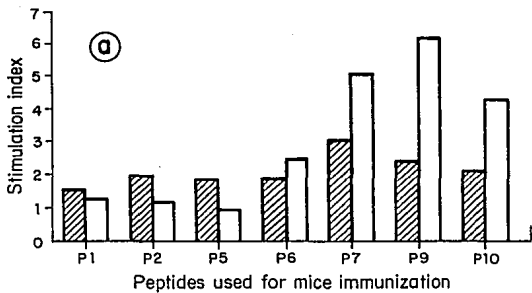


FIG. 3