

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

"EVALUACION ANTIGENICA E INMUNOGENICA DE LA  
REGION INMUNODOMINANTE DE gp41 DEL VIH-1  
MEDIANTE EL USO DE FAGOS FILAMENTOS  
(PHAGE DISPLAY)"

T E S I S

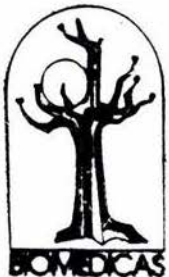
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A :

MVZ. JOSE ALBERTO CANO BUENDIA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN



CIUDAD UNIVERSITARIA,

MARZO DEL 2005

341735



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta 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.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, bajo la dirección del Dr. Karen Manoutcharian Airapetian.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: José Alberto  
Cano Bueña

FECHA: 7 de marzo de 2005

FIRMA: 

**A MIS PADRES SARA Y ALBERTO,**

**Por su apoyo y cariño.**

**A FANNY,**

**Por su paciencia, amor y entusiasmo.**

**A FANNY (Nena) Y JOSÉ ALONSO,**

**Por hacerme sentir la máxima alegría.**

**A MI HERMANO CARLOS,**

**Por su apoyo y ayuda.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco todas las observaciones , confianza y apoyo incondicional de mi comité tutorial, Dres. Karen Manoutcharian, Gohar Gevorkian y Abraham Landa.

Al jurado por todas las sugerencias y consejos brindados, Dres. Edda Sciutto, Luis Padilla, Ruy Pérez, Adela Rodríguez, Ricardo Rosales y Baltasar Becerril.

A Gonzalo Acero Galindo y Natasha Ivanovna Copitin por su excelente asesoría técnica en el desarrollo de este trabajo así como al Bioterio del IIB por las facilidades brindadas.

A mis compañeros de laboratorio por brindarme una amistad sincera, Erik, Angel, Yetzi y Doña Chuy.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas y a la UNAM por haberme aceptado y brindado todas las facilidades para poder realizar mis estudios de licenciatura y posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología así como a la DGEP por haberme brindado una beca para poder realizar mis estudios de doctorado.

**A TODOS ELLOS MIL GRACIAS.**

## RESUMEN

En el presente trabajo se analizaron las características antigénicas e inmunogénicas de la región inmunodominante de la glicoproteína 41 (gp41) del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) mediante su despliegue en la superficie del fago filamentoso M13. La región inmunodominante de gp41 está flanqueada por 2 regiones  $\alpha$ -hélice, las cuales interactúan entre sí y el virus adquiere una conformación fusogénica y el péptido fusión del virus penetra la membrana celular. Esta región inmunodominante podría funcionar como una “bisagra” para permitir la interacción entre las 2 regiones  $\alpha$ -hélices.

La mayoría de las personas infectadas por el VIH-1 generan anticuerpos dirigidos contra la región inmunodominante de gp41, pero estos anticuerpos no tienen una capacidad neutralizante en contra del virus.

En este estudio se utilizó la técnica de despliegue en fagos mediante el uso de dos bibliotecas comerciales que expresan péptidos (de 7 y 12 aminoácidos) en una forma lineal y se utilizó una biblioteca que despliega a los péptidos en una forma cíclica (9 aminoácidos con cisteínas en los extremos) para identificar epítopos reactivos con sueros VIH+. Se obtuvieron clones que mostraban homologías parciales con la región inmunodominante las cuales fueron utilizadas para inmunizar de ratones BALBc/AnN. Los sueros de los animales inmunizados mostraron un 70% de inhibición en la formación de sincicios. Se expresó la región inmunodominante de gp41 en la superficie del fago filamentoso M13 y se realizaron ELISAs para evaluar su capacidad antigénica. Se encontró reconocimiento de la región inmunodominante de gp41 en forma cíclica por el 97% de los sueros positivos (VIH+). Así mismo, se estableció una correlación entre el tiempo de infección y la presencia de anticuerpos anti-región inmunodominante de gp41 en conformación lineal.

La comprensión del papel que desempeña la región inmunodominante de gp41 durante el proceso de fusión podría contribuir en la identificación de biomoléculas a contemplarse en el diseño de una vacuna multi-componente contra el VIH-1. El uso del despliegue en fagos permite el desarrollo de reactivos con un bajo costo y una producción rápida, los cuales pueden ser usados en técnicas de inmunodiagnóstico.

## ABSTRACT

In the present study the antigenic and immunogenic properties of the immunodominant region of HIV-1 gp41 displayed on the surface of filamentous phages were analyzed. GP41 immunodominant region is flanked by 2  $\alpha$ -helix regions, which interact each other to obtain a fusogenic form so the viral fusion peptide can penetrate the cellular membrane. This region can work like a “hinge” that permits the interaction between the  $\alpha$ -helix regions.

Most of the infected individuals by HIV-1, elicit an antibody response against this immunodominant region, but this antibodies do not have any neutralizing capability against HIV-1.

In this work, biopannings using two commercial libraries that displayed peptides in linear conformation (7 and 12 aminoacids) and 1 that displayed cyclic peptides (9 aminoacids flanked by cysteines) were performed. Clones that shown partial homologies with the immunodominant region of gp41 were selected. These clones were used to immunize BALBc/AnN mice. Sera of these animals generated 70% of syncitium inhibition. The gp41 immunodominant region was displayed on the M13 filamentous phage surface and ELISA assays were performed to evaluate its antigenic properties. The cyclic immunodominant region of gp41 displayed on phages was recognized by 97% of HIV+ sera. Moreover, a correlation was established between the presence of anti-linear peptide antibodies and the endurance of infection.

The knowledge of the role of the immunodominant region gp41 in the fusion process will help in the development of biomolecules that can be used in a multicomponent vaccine against HIV-1. The use of phage display permits the development of reagents with low-cost and fast production that can be used in immunodiagnostic techniques.

## ABREVIATURAS

2ME	2 β-mercapto etanol
aa	aminoácidos
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
ADN	Acido desoxiribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
CL3	Clona 3
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
LTNP	Long term non progresors, no progresores, progresores lentos
LTR	Long Terminal Repeat
MAP	Múltiple Antigenic Peptides
MoAb	Anticuerpo monoclonal
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
NSI	No formador de sincicios
PhD	Phage Display, despliegue en fagos
RB	Región bisagra
RID	Región Inmuno Dominante
RT	Transcriptasa reversa
SI	Formador de sincicios
SIDA	Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida
SNH	Suero normal humano, Suero VIH negativo
TA	Temperatura ambiente
TCID <sub>50</sub>	50% de la Dosis Infecciosa de Cultivos Celulares
VIH +	VIH positivo
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VIS	Virus de Inmuno deficiencia del Simio



## INDICE

RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
ABREVIATURAS.....	7
INDICE.....	8
1. ANTECEDENTES	
1.1 Introducción.....	9
1.2 Origen y clasificación.....	11
1.3 Organización genética.....	13
1.4 Eventos involucrados en la interacción	
VIH-célula previos a la infección.....	17
1.5 GP41 y su región inmunodominante.....	19
1.6 Historia natural de la infección y respuesta inmune	
Humoral en contra la infección por VIH.....	24
1.7 Progresores lentos o no progresores.....	27
1.8 Despliegue en fagos filamentoso (Phage Display).....	29
2. JUSTIFICACIÓN.....	32
3. OBJETIVOS.....	34
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
5. RESULTADOS.....	53
6. DISCUSIÓN.....	67
7. CONCLUSIONES.....	72
8. PERSPECTIVAS.....	73
9. REFERENCIAS.....	74
APÉNDICE I.....	84
APÉNDICE II.....	87

# 1. ANTECEDENTES

## 1.1 Introducción

La pandemia de la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), que es la causa del Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida (SIDA), es un problema de salud pública muy importante en todo el mundo. El primer caso reportado en el mundo de SIDA fue en 1981 [1,2]. En la actualidad el virus está distribuido mundialmente. Datos de la Organización de las Naciones Unidas mencionan que existen aproximadamente 40 millones de personas infectadas en el mundo [3]. El número de personas infectadas que reportó la Secretaría de Salud en la República Mexicana en el año 2003 fue de 72,000 aproximadamente [4]. Estos números aumentan año con año en el mundo siendo este aumento proporcionalmente mayor en países en vías de desarrollo.

La infección por el VIH está caracterizada por una disminución en las cuentas celulares de linfocitos T CD4+, causando una inmunosupresión severa, manifestaciones neurológicas, infecciones oportunistas y neoplasias. El VIH se transmite por vía sexual, exposiciones parenterales a sangre o productos sanguíneos, durante la gestación y por amamantamiento [5]. Las lesiones rectales y la presencia de úlceras genitales incrementan el riesgo de transmisión [6-11].

La mayor parte de las personas infectadas por VIH (más del 95%) presentan anticuerpos dirigidos contra la región inmunodominante (RID) de gp41, que es una de las glicoproteínas de envoltura del virus. Esta región está comprendida entre 2 cisteínas, las cuales forman un asa o “loop”. La mayoría de los anticuerpos dirigidos contra esta región no son neutralizantes, aunque existe el reporte de un anticuerpo monoclonal humano con capacidad neutralizante que reconoce a esta región en una forma lineal.

En este estudio se utilizó la técnica de despliegue en fagos. Esta técnica se seleccionó considerando sus características de rapidez, facilidad de producción y la capacidad de

evaluar diversos péptidos simultáneamente ( $10^{11}$  péptidos), representando ventajas respecto a otros procedimientos utilizados para este fin.

El estudio de las propiedades antigénicas e inmunogénicas de la RID así como la comprensión del porqué se producen anticuerpos con la misma especificidad y diferentes capacidades neutralizantes resulta interesante además del potencial implícito de la posible aplicación en el desarrollo de métodos de diagnóstico, vacunas o tratamientos contra el VIH u otras enfermedades.

## 1.2 Origen y clasificación

Existen varias hipótesis acerca del origen del VIH, una de las cuales proponen la existencia de un ancestro común entre el VIH y el Virus de la Inmunodeficiencia del Simio (VIS), que existió hace 600 a 1200 años [12]. Otros proponen que el VIH-1 proviene de una especie de chimpancés, *Pan troglodytes troglodytes*, de donde evolucionaron por años y se transmitieron al hombre, ya que estos animales eran usados como alimentos [13].

El VIH se clasifica dentro de la familia *Retroviridae* debido al uso de la Transcriptasa Reversa (RT), la cual usa el virus para obtener ADNc de una de las 2 cadenas de ARN que posee en su interior. Se considera dentro del género de los *lentivirus* ya que la enfermedad se asocia a periodos largos de incubación. El centro del virus tiene una morfología cónica [14,15].

El SIDA es causado por 2 virus, el VIH-1 y VIH-2. Aunque estos virus son los agentes etiológicos del SIDA se distinguen entre ellos por tener diferentes características biológicas, serológicas y moleculares. Dentro de las diferencias biológicas se describe el potencial de transmisión y de patogenicidad ya que son menores en el VIH-2 en comparación con el VIH-1 [16,17]. En cuanto a la serología, la principal diferencia entre éstos 2 tipos de virus reside en las glicoproteínas de envoltura. Los anticuerpos dirigidos contra el VIH-2 presentan generalmente reacción cruzada con las proteínas de Gag y Pol del VIH-1, pero no pueden detectar las proteínas de envoltura del VIH-1 y viceversa [18,19]. Debido a estas características en los ensayos de Western Blot actualmente se pueden detectar tanto proteínas del VIH-1 como del VIH-2. Dentro de las características moleculares podemos mencionar que existe una diferencia entre la secuencia de los 2 tipos virales mayor al 55% [20-22]. El presente trabajo se realizó en base al VIH-1.

En todo el mundo se han identificado diferentes subtipos y se han agrupado en 2 grupos genéticos: M (Major) y O (Outlier). En el grupo M se clasifican a los virus en subtipos, los

cuales van de la “A” a la “J” dependiendo de su similitud genética [23]. Entre cada subtipo existe una diferencia del 14% aproximadamente en la secuencia de gag y de un 30% en env. Esta diversidad que tiene el virus resulta consecuencia de errores en la transcripción que tiene la RT se estiman de  $10^{-4}$ . Esto significa que una mutación ocurrirá en promedio una vez en cada ciclo de replicación [24]. Los virus pertenecientes al subtipo B han sido aislados en los Estados Unidos, Europa, Australia, Sudamérica y en México.

### 1.3 Organización genética

El VIH contiene 2 cadenas idénticas de ARN (+) del genoma viral. Posterior a la infección de una célula susceptible, el genoma viral es procesado por la RT, obteniéndose ADN proviral. Este ADN proviral está flanqueado por 2 LTR (Long Terminal Repeat). El LTR tiene una longitud de 634 nucleótidos; el 5'-LTR regula el inicio de la transcripción del ARN, mientras que el 3'-LTR regula la terminación y la poliadenilación [25]. Su genoma tiene una longitud de 9.8 kb. Tiene 3 genes estructurales (gag, pol y env) y 6 reguladores (nef, rev, tat, vif, vpr y vpu).

Las proteínas estructurales son codificadas por los genes gag y env (Fig. 1). Las proteínas de gag son proteínas del interior del virus. Las proteínas de envoltura, distribuidas en la capa lipídica del virus, forman aproximadamente 72 picos en forma de picaporte (perilla) que están formados por un complejo de trímeros (SU-TM)<sub>3</sub> [26-30]. Son sintetizadas a partir de un precursor de 845 a 870 aminoácidos (aa) en el retículo endoplásmico rugoso, es glicosilado y se forma gp160, el cual se organiza en trímeros, y son transportados a Golgi, en donde son modificados por proteasas celulares para generar las glicoproteínas de envoltura maduras: gp120 y gp41. Estos están unidos mediante enlaces no covalentes [31]. Estas proteínas median la unión al receptor y la fusión de las membranas (viral y celular). Por otro lado pol codifica a las 3 enzimas virales, las cuales son Proteasa, Transcriptasa Reversa y la Integrasa.

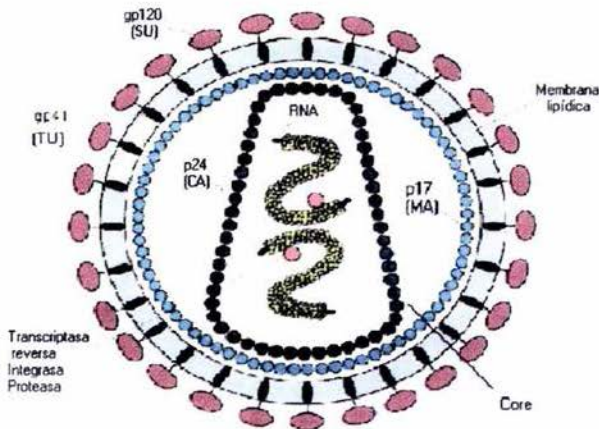


Figura 1 Esquema de las proteínas estructurales del VIH-1.

Las proteínas reguladoras son codificadas por *tat* y *rev*. *Tat*, es una proteína transactivadora que media su efecto mediante el elemento de respuesta a *Tat* (TAR) en el ARNm y estimula la producción de transcritos virales tardíos que son más largos (*gag*, *pol*, *env*) y que dan lugar a las proteínas estructurales y a las enzimas del virus [32]. *Rev*, un transactivador post-transcripcional, aumenta la expresión de genes estructurales ya que favorece el transporte de transcritos virales primarios, que no están editados por *splicing*, del núcleo al citoplasma mediante la ayuda de la secuencia de RRE (elemento de respuesta a *Rev*). El resto de las proteínas accesorias, son codificadas por *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*. *Vif* (Virion Infectivity Factor) promueve o aumenta la infectividad de partículas virales dependiendo de la línea celular en la que se produzcan los virus [33]. *Vpr* (Viral Protein R) es homóloga a *Vpx* (Viral Protein X) del VIH-2 y SIVs. Su función viral no está descrita completamente pero se conoce que afectan eventos como el ensamblaje y la gemación, así como la infectividad durante la producción de virus infecciosos [34,35]. *Vpu* (Viral Protein U) es requerida para una regulación negativa en la expresión de las moléculas CD4 de la célula infectada. Esto es para evitar que los CD4s se unan a los trómeros gp120-gp41, antes de que se dirijan hacia el Golgi para su glicosilación y los acarrea hacia proteosomas de ubiquitina, asegurando su degradación. *Nef* (Negative Factor) tiene muchos efectos en la

replicación viral, en la activación de células T así como en el desarrollo de la enfermedad [36]. También actúa en la degradación de los CD4 que están en la superficie celular uniéndose a esta molécula y posteriormente al factor celular AP-2, el cual estimula la formación de endosomas recubiertos de clatrina para su posterior degradación [37,38]. Las funciones conocidas de las proteínas del VIH-1 se enlistan en la Tabla 1.



**Tabla 1**  
**Proteínas del VIH y sus funciones**

<b>Proteína</b>	<b>Tamaño (kDa)</b>	<b>Función</b>
Gag	p24 (p25)	Cápside (CA) proteína estructural
	p17	Matriz (MA) proteína miristilada
	p6	Participa en gemación
	p7	Proteína de la nucleocápside (NC); ayuda en la transcripción reversa.
Polimerasa (Pol)	p66, p51	Transcriptasa reversa (RT); Rnase H dentro del core.
Proteasa (PR)	p10	Procesamiento post-traducciona de proteínas virales
Integrasa (IN)	p32	Integra el ADNc viral en el ADN celular
Envoltura (Env)	gp120	Proteína de superficie (SU)
	gp41 (gp36)	Proteína transmembranal (TM)
Tat	p14	Transactivación
Rev	p19	Regula la expresión viral del mRNA
Nef	p27	Pleiotropica, puede incrementar o decrecer la replicación viral
Vif	p23	Incrementa la infectividad del virus y la transmisión célula-célula; ayuda a la síntesis de DNA proviral y/o al ensamblaje.
Vpr	p15	Ayuda a la replicación viral y en la transactivación
Vpu	p16	Ayuda a la liberación viral; rompe los complejos gp160-CD4
Vpx	p15	Ayuda a la infectividad

## 1.4 Eventos involucrados en la interacción VIH-célula previos a la infección

Existen diferentes formas en que una célula susceptible pueda ser infectada por el VIH. En el presente trabajo se describe la forma más común que usa el VIH-1 para infectar a una célula. El virus entra a la célula blanco mediante un proceso que consta de 2 etapas: el reconocimiento de la célula huésped y la unión a los receptores de superficie de la célula seguido de una fusión de las membranas viral y celular. El tropismo del VIH-1 está gobernado por la distribución de proteínas celulares que el virus requiere para poder infectar a una célula. El virus utiliza el receptor linfocitario CD4, infectando en una primer etapa preferentemente a células CD4 + [39,40]. Posteriormente gp120 interacciona con la molécula CD4 a través de un dominio conformacional llamado dominio de unión a CD4 [41,42]. La relevancia de los aminoácidos que participan en esta interacción se ha demostrado a través de mutaciones de las secuencias de gp120 y su efecto en el tropismo hacia las células CD4 + [43,44]. Posterior a esta serie de eventos, existe una serie de cambios conformacionales, en donde gp120 es desplazado, dando como resultado la exposición de dominios de gp41 necesarios para la fusión virus-célula [45] en donde están involucrados la región carboxi-terminal de gp120 y la región intermedia de gp41 [46].

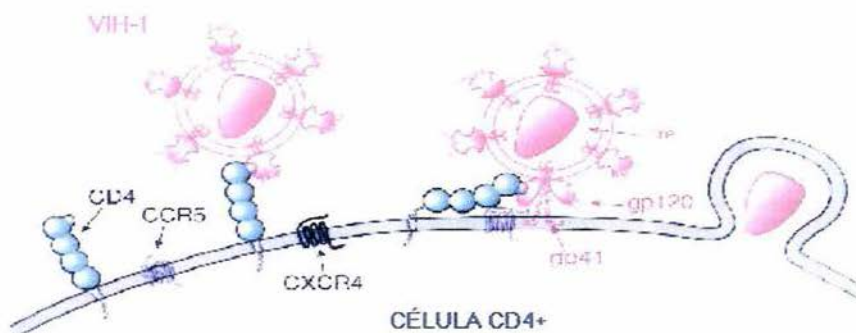


Figura 2. Esquema de los eventos involucrados en la infección de una célula permisiva por el VIH-1.

Posterior a la unión del VIH con el CD4, el virus necesita de un segundo receptor, también llamado co-receptor [47,48]. Este reconocimiento se ha establecido en base a estudios en donde se demostró que células con alta expresión de CD4 así como células murinas transfectadas para la expresión de CD4 humano no se infectaban con el VIH [49,50]. Estos coreceptores fueron reportados por Berger, llamados originalmente fusina [51] y reciben actualmente el nombre de CXCR-4. Esta interacción entre el virus y el coreceptor permite una asociación más fuerte y evita la separación del virus en células que tengan una menor expresión de CD4 o en casos en que el virus se asocie débilmente al CD4 [52]. Las cepas de VIH que utilizan estas moléculas tienen como características adicionales el tropismo hacia linfocitos T y a la vez muestran un fenotipo de formadores de sincicios (SI) [53,54], mientras que aquellos virus que utilizan al coreceptor CCR5 tienen tropismo por monocitos y a la vez tienen un fenotipo de no formadores de sincicios (NSI) [55,56], aunque existen virus bi-valentes, es decir que pueden utilizar cualquiera de los coreceptores antes mencionados [54,57]. El coreceptor (CXCR-4 o CCR-5) interactúa con la región amino terminal de gp120, la cual incluye al asa V3 [58]. Aunque CXCR-4 y CCR-5 son los principales coreceptores que usa el VIH, no implica que sean los únicos. En la Tabla 2 se mencionan algunos otros coreceptores utilizados por el virus.

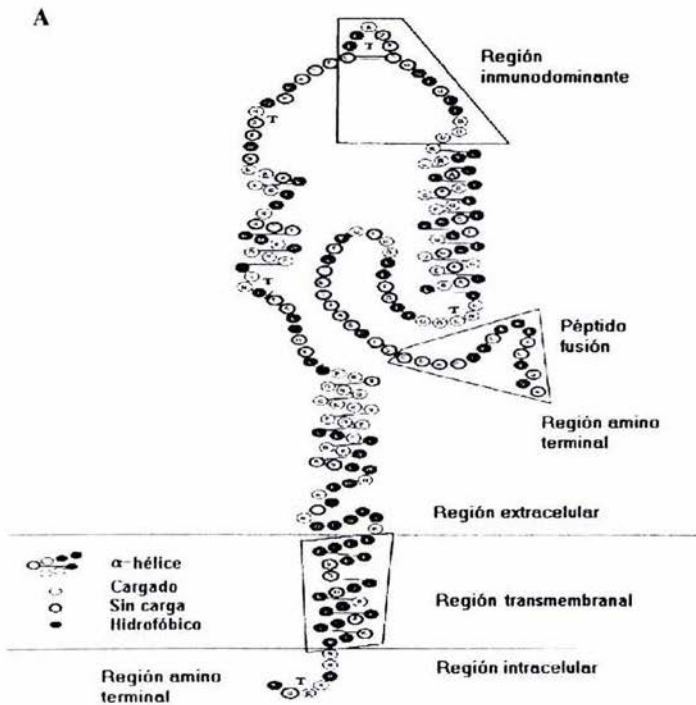
**Tabla 2. Coreceptores para el VIH-1 usados para la infección de células CD4+.**

Receptor	Fenotipo	Tropismo
CCR-5	NSI	Macrófago
CXCR-4	SI	Linfocitos T
CCR-3	NSI	Macrófago
CCR-2b	SI	Dual (Bi-tropismo)
Bonzo/STRL33	NSI	Macrófago
BOB/GPR15	NSI	Macrófago

## 1.5 Gp41 y su región inmunodominante.

Gp41 es una proteína transmembranal con características importantes en su ectodominio.

- 1.- La región amino-terminal (hidrofóbica) contiene un péptido rico en glicinas, esencial para la fusión de las membranas.
- 2.- Existen 2 regiones de  $\alpha$ -hélice (una amino y la otra carboxilo) y entre estas dos regiones se encuentra la región immuno-dominante de gp41, la cual contiene un asa generada por el enlace disulfuro de 2 cisteinas. Estas regiones  $\alpha$ -hélices están organizadas en estructuras de 4, 3 aminoácidos hidrofóbicos (Fig. 3).



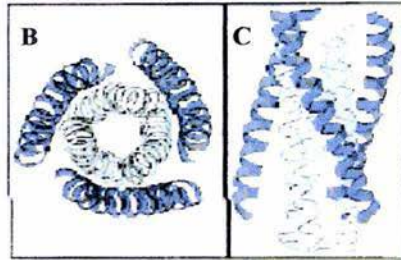


Figura 3 Estructura de gp41 del VIH-1. A) Vista esquemática de gp41, muestra la localización del péptido fusión, las dos regiones hidrofóbicas en alfa hélices, la región transmembranal y citoplásmica. En B y C está un diagrama en bandas del complejo formado por las regiones  $\alpha$  – hélices amino y carboxilo, mostrando la estructura adquirida.

Después de la interacción de gp120 con su receptor y co-receptor, gp41 sufre una transición conformacional pasando de la forma nativa (conformación no fusogénica) hacia la conformación fusogénica (Fig. 4). La conformación no fusogénica existe en la superficie de los viriones libres que se liberan por gemación de las células infectadas. Posterior a la unión de gp120 con el receptor celular y el co-receptor, existen cambios conformacionales hacia un estado de fusión activa lo cual incluye una exposición del “péptido fusión” hacia la membrana celular, el cual se piensa es insertado en la membrana celular como un paso previo o para facilitar al proceso de fusión [59].

Estas regiones de hélice-hélice (heptapéptidos hidrofóbicos 4, 3) son secuencias de aminoácidos que forman hélices en donde se van alternando 4 y 3 aminoácidos por cada giro. Además forman un trímero de hélices antiparalelas. Se ha demostrado que el centro o núcleo de gp41 está compuesto por un haz de 6 hélices en donde las hélices amino y carboxilo están ordenadas en 3 pares. Los péptidos amino forman 3 hélices centrales, mientras que los carboxilo se ordenan en 3 hélices externas que cubren a las anteriores de una manera antiparalela. Esta es la forma activa de fusión de gp41, muy similar a los modelos propuestos de las proteínas transmembranales de envoltura de los virus de influenza [60], virus de leucemia murina [61], virus de leucemia de células T humanas tipo

1 y 2 [62], virus del Ebola GP2 [63], virus de la parainfluenza del simio 5 F [64], y el virus sincicial respiratorio [65]. Está reportado que el centro hidrofóbico de gp41 tiene una secuencia conservada de aminoácidos, la cual se piensa que es la responsable de la trimerización de gp41 [66,67]. Sin embargo en este proceso dinámico existe un momento en donde los péptidos amino y carboxilo no están asociados y se le nombra estado prefusogénico [68]. Esta conformación es relativamente estable con un tiempo de vida de varios minutos. Está reportado que todo el proceso de entrada del virus a una célula, interacción gp120-CD4 hasta la fusión de las membranas, se realiza en aproximadamente 20 minutos. Los cambios conformacionales inician de 1 a 4 minutos después de la unión al receptor [69].

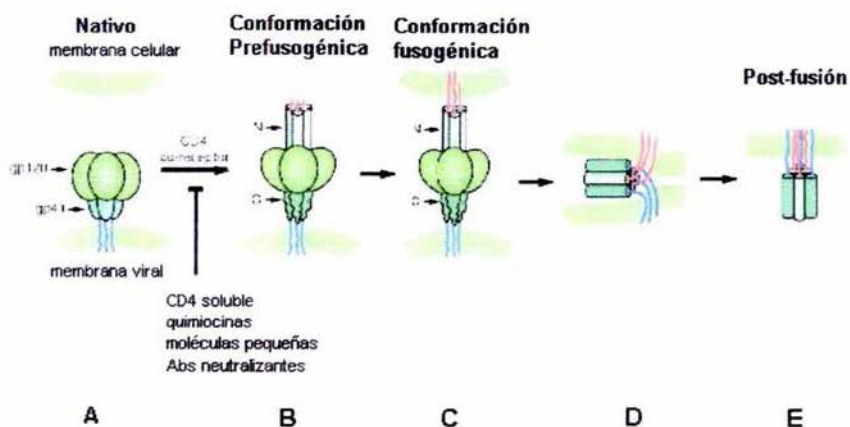


Figura 4 Modelo de los cambios en el ectodominio de gp41. A) El péptido fusión no es accesible debido a la unión de gp120 con gp41. B) El trímero de gp120 se pierde y se disocia de gp41 permitiendo una exposición del péptido fusión (en rojo). C) El péptido fusión se inserta en la membrana de la célula blanco. D) Se reorienta la espiral enrollada en una forma paralela a las membranas. E) Se fusionan las membranas.

Como se mencionó anteriormente, entre las 2  $\alpha$ -hélices está la región immuno-dominante, la cual está comprendida entre los residuos 588 al 615 del gp41 [70,71] y está reportado

que el epítipo inmunodominante está flanqueado por 2 cisteínas (607-613) que están en la región central del ectodominio de gp41. La mayoría de las personas infectadas (más del 95%) presentan anticuerpos en contra de este epítipo [72,73] aún aquellas infectadas con nuevas variantes (subtipo O) [74, 75].

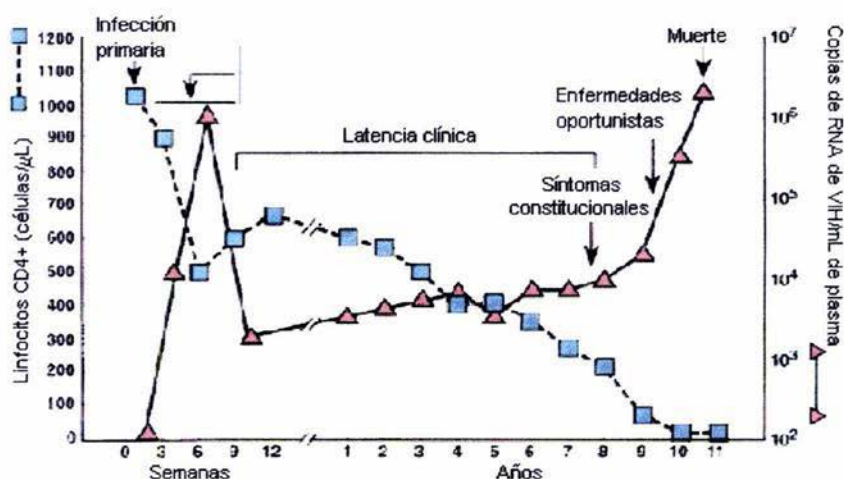
Está reportado que la mayoría de los anticuerpos dirigidos contra este epítipo no son neutralizantes y no bloquean la infección por VIH. También existen reportes de que algunos anticuerpos monoclonales (MoAbs) dirigidos contra esta región, aumentan la infección usando los receptores para el complemento [76,77]. La forma activa del péptido de 7 aa, CSGKLIIC, contiene un puente disulfuro intramolecular y mediante estudios de resonancia magnética nuclear (NMR) se ha demostrado que este dominio presenta una conformación “doblada”, incluyendo un giro reverso en los residuos SGKL. La presencia del puente disulfuro es importante para la formación del asa en solución. Se han hecho algunas mutaciones (Cys a Ser) para eliminar la posibilidad de la formación del asa, perdiéndose el reconocimiento de los anticuerpos hacia este péptido [78]. La funcionalidad de estas mutaciones dependen del contexto estructural de env, es decir de las características de la interacción entre gp120 y gp41 así como la estabilidad del complejo trimérico [79]. También se ha demostrado que la eliminación de esta asa afecta el procesamiento de env, tanto en el VIH-1 como en el virus de la inmunodeficiencia felina [80-82]. Se ha reportado un solo anticuerpo monoclonal (MoAb) humano (Clona 3, CL3) que reconoce esta región inmunodominante es neutralizante en contra de diferentes cepas de laboratorio y en algunos aislados primarios y tiene como característica que no se une a péptidos sintéticos de esta región en una conformación cíclica pero si en forma lineal. El epítipo de este monoclonal tiene una pobre capacidad inmunogénica [83, 84]. También se han intentado algunas estrategias en donde se usa esta región inmunodominante expresada en “Partículas similares al VIH-1” y realizando algunas mutaciones puntuales en la región inmunodominante mayor. Estas “partículas” se usaron para inmunizar cobayos y evaluar el suero en ensayos de inhibición de formación de sincicios sin obtener los resultados esperados [85].

Todos estos cambios conformacionales que sufre gp41 en donde las hélices carboxilo interaccionan con las amino generan que el péptido fusión [86], que está en la región amino terminal y que además es hidrofóbico, obtenga una conformación que le permita interactuar con la membrana de la célula blanco e iniciar el proceso de fusión [86-88]. Posterior a este evento el contenido del virus entra y empieza todo el proceso de retrotranscripción, integración, ensamblaje, proteólisis y gemación de los nuevos viriones.



## 1.6 Historia natural de la infección y respuesta inmune humoral en contra la infección por VIH.

La enfermedad por VIH comprende una etapa que va del estado asintomático hacia una inmunodeficiencia avanzada y una enfermedad clínica. El tiempo promedio que existe entre la infección primaria y el desarrollo de SIDA es de aproximadamente 10 años. Durante este periodo, la cuenta de células CD4+ decrece gradualmente hasta que se llega a un nivel en donde el riesgo de que se desarrollen enfermedades oportunistas es muy alto. La incidencia de enfermedades oportunistas ha disminuido debido a diagnósticos tempranos, uso de antivirales y medidas profilácticas en contra de enfermedades oportunistas. La historia natural de la infección se describe en la gráfica 1.



Gráfica 1. La historia natural de la enfermedad de un paciente infectado con VIH. Después de la infección primaria, se aumenta la viremia y los CD4 bajan. Posteriormente existe un control inmune parcial de la replicación viral dando como resultado periodos variables de latencia clínica. Conforme bajan los conteos de CD4 la presencia de enfermedades oportunistas aumenta.

La relevancia de la respuesta inmune humoral y la inmunidad celular en el control de la replicación viral es un tema aún debatido tanto en el control como en la prevención de la infección primaria [89]. La infección primaria por el VIH está caracterizada por una rápida diseminación del virus a través del cuerpo y la estimulación de una respuesta inmune que parcialmente controla la replicación viral [90]. En los eventos que ocurren durante la infección primaria participan factores del huésped y del virus en la determinación del curso hacia la enfermedad. Algunas semanas después de la infección primaria, la viremia generalmente es baja. Este fenómeno posiblemente se debe a una respuesta celular antiviral temprana. Esta observación se sustenta ante el hallazgo de detectar células T cooperadoras específicas para péptidos de VIH, antes de que se lleve a cabo una seroconversión durante la fase aguda de la infección [91].

En las primeras 2 a 4 semanas posteriores a la infección, se pueden detectar anticuerpos anti-VIH y esta producción va en aumento. Sin embargo, la seroconversión puede presentarse desde algunos días después de la infección [92]. Aunque la ausencia de anticuerpos neutralizantes no es indicador de que no participen en la disminución de la replicación viral. Los anticuerpos producidos inicialmente pueden disminuir la replicación del virus mediante la lisis mediada por complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) [93 - 95]. La actividad neutralizante de los anticuerpos se muestra aproximadamente 20 días después de que se detecta su producción [96]. La mayoría de los anticuerpos están dirigidos contra las glicoproteínas de envoltura [97] y aparecen durante la transición de la fase aguda a la crónica [98]. Una característica importante de los anticuerpos neutralizantes detectados en individuos infectados es su alta reactividad en contra de cepas de laboratorio o con tropismo a linfocitos y una menor eficiencia en contra de virus autólogos o aislados primarios con tropismo a macrófagos. Los anticuerpos neutralizantes aumentan la presión de selección del virus, lo cual genera que las nuevas generaciones del virus no sean susceptibles de neutralizarse por los anticuerpos presentes [99]. También se reporta que la presencia de anticuerpos neutralizantes disminuye conforme avanza la enfermedad y estos son sustituidos por anticuerpos facilitadores [100]. Además animales inmunizados con proteínas de envoltura del VIH-1 producen anticuerpos

que neutralizan específicamente a la cepa con la que se inmunizaron y su espectro de neutralización se puede aumentar mediante la aplicación de refuerzos [101,102].

Los anticuerpos cuya actividad neutralizante se detecta *in vitro* parecen ser una herramienta importante del huésped para controlar la replicación viral [103,104]. Los anticuerpos neutralizantes pueden ser tipo específicos (específicos para una cepa de virus) o grupo específicos (específicos para un amplio rango de aislados virales). El tipo de anticuerpo neutralizante más relevante en el curso de la infección es aquel que neutraliza aislados autólogos [105,106]. Sin embargo surgen con alta frecuencia variantes virales resistentes a la neutralización [107], generando una etapa de neutralización seguida por una de resistencia hacia los anticuerpos, repitiéndose este ciclo a lo largo de la enfermedad. [108].

Si bien se discute sobre la correlación entre la presencia de anticuerpos neutralizantes y el curso de la enfermedad, parece que la presencia de anticuerpos neutralizantes con una amplia especificidad está correlacionada con un pronóstico más favorable [104,109].

El proceso de fusión de las membranas celular y viral (página 11) es dinámico y existen momentos en los cuales son expuestos epítomos importantes, los cuales pueden ser útiles para la generación de anticuerpos neutralizantes; Numberg y colaboradores [110] mostraron que el uso de células fijadas en diferentes estadios de fusión, como antígenos, generaban en ratones la producción de anticuerpos neutralizantes contra diferentes aislados primarios (23 de 24) y que algunos de esos epítomos solo aparecían en ciertos momentos de la fusión. Por lo que la identificación y estudio de esos epítomos “momentáneos” es de gran importancia.

## 1.7 Progresores lentos o no progresores

Entre los individuos de la población infectada existen ciertas características que permiten agruparlos para su estudio de la siguiente manera:

- Progresores rápidos. Estos son los pacientes que muestran una rápida disminución de sus CD4 y generalmente desarrollan la enfermedad en 2 a 5 años. Se caracterizan por un bajo título de anticuerpos en contra de proteínas del VIH y una baja capacidad neutralizante. Tienen anticuerpos ayudadores. Tienen una alta carga viral que no decrece además de que las cepas virales que tienen no presentan gran diversidad.
- Progresores típicos. Abarca a la mayoría de las personas infectadas. Tienen como característica que desarrollan el SIDA entre los 8 y 10 años después de la infección.
- Progresores lentos. También conocidos “de larga sobrevivencia, no progresores (long term nonprogressors)”. Constituyen del 8 al 10% de las personas infectadas. Estos pacientes presentan infecciones latentes por más de 10 años, su cuenta de linfocitos T CD4+ es mayor a 600 células/ml, no hay evidencias durante este período de bajas en la cuenta ni síntomas de enfermedad sin recibir tratamiento antiviral. Presentan anticuerpos neutralizantes en contra de virus autólogos, no presentan anticuerpos ayudadores ni una amplia diversidad de las cepas de VIH [111,112].

La no progresión a SIDA ha sido asociada a la ausencia de la respuesta humoral hacia el epítipo comprendido entre los aminoácidos 503 a 528 en la región carboxilo terminal de gp120 [113] así como a la presencia de altos títulos de anticuerpos anti p24 [114]. La presencia de anticuerpos neutralizantes parece ser uno de los factores asociados a un mejor control para la progresión a SIDA [115,116]. La presencia de anticuerpos neutralizantes en contra del VIH III<sub>B</sub> se ha correlacionado con un pronóstico más favorable de la enfermedad [117], se ha demostrado que los anticuerpos neutralizantes en contra de aislados primarios así como en contra de virus autólogos se asocia a la no progresión [98,107]. La nueva generación de virus resistentes a los anticuerpos neutralizantes dentro de un individuo está

asociado con el surgimiento o selección de virus con fenotipo SI así como el progreso a SIDA [107,118].

En el desarrollo natural hacia la progresión a SIDA participan varios factores cuyas interacciones no son aún completamente dilucidadas. En un panorama de tal complejidad, la identificación de cada una de las partes que contribuyen en la patogenia se espera permita una mejor comprensión de las interacciones existentes para un mejor conocimiento del desarrollo de la enfermedad.

## 1.8 Despliegue en fagos filamentosos (Phage Display)

La búsqueda e identificación de epítomos de moléculas de interés biomédico ha tenido gran avance desde la aparición de “Phage display” (PhD). Esta tecnología se basa en la expresión de péptidos o proteínas en la superficie de fagos filamentosos. Esta es una herramienta muy poderosa para la selección, diseño de péptidos y proteínas expresadas en la superficie de fagos filamentosos [119]. Esta metodología permite a través de la manipulación *in vitro* e *in vivo* identificar y producir en alta escala los péptidos y proteínas de interés en la superficie de los fagos.

El fago filamentosos más usado es el M13. Las proteínas del fago que se usan más para expresar péptidos recombinantes son las proteínas pIII y pVIII. En la superficie del fago se expresan de 3-5 copias de la pIII y 2700 copias de la pVIII. También está reportado el uso de la pVI, pVII y pIX (Fig. 5) [120,121]. El fago M13 consta de una cadena sencilla de DNA de 6407 bases que codifica 10 proteínas diferentes. El fago M13 silvestre tiene una dimensión de 900 X 7 nm.

La pIII (43 kDa; 424 aa) tiene 3 dominios estabilizados por enlaces disulfuro. El dominio amino terminal es el responsable de la penetración a la *Escherichia coli* (*E.coli*). El segundo dominio reconoce el pili bacteriano y el dominio carboxilo actúa en la morfogénesis y anclaje a la membrana además de participar en el ensamblaje del fago [122].

La principal ventaja de PhD sobre otras tecnologías de mapeo de epítomos es la capacidad de trabajar con un gran número de péptidos diferentes a la vez, para seleccionar aquellos específicos mediante la interacción con moléculas de interés como receptores, anticuerpos etc. Esto permite obtener información valiosa de agentes etiológicos peligrosos sin necesidad de trabajar con este mismo. Además las propiedades de los fagos filamentosos permiten evitar el uso de adyuvantes cuando se utilizan en inmunizaciones [123].

Al respecto de su utilidad las bibliotecas de péptidos expresados en fagos filamentosos han resultado ser una herramienta de interés que se utiliza en el mapeo de epítomos lineales o conformacionales [124-126], obtención de mimótopos peptídicos y no peptídicos [127-129] la generación de anticuerpos neutralizantes [130,131] y en el desarrollo de métodos de diagnóstico así como de vacunas [132] con la capacidad de dirigir a los fagos hacia órganos o tejidos específicos [133,134].

En el estudio del VIH, el despliegue en fagos ha sido utilizado para el mapeo de anticuerpos monoclonales anti VIH [135], evaluaciones inmunogénicas de gp120 [136] así como en la búsqueda de mimótopos reconocidos por sueros policlonales humanos [137].

## CICLO DE VIDA

Los bacteriófagos M13 son virus que infectan cepas de *Escherichia coli* utilizando el pili como receptor. A diferencia de otros fagos, el M13 no provoca la lisis de la *E. coli* sino que induce un estado en la bacteria que promueve la producción y secreción de partículas de fago sin que ocurra lisis celular.

La infección se inicia cuando la proteína 3 (pIII) del fago se une al pili de la *E. coli*. Esto permite la entrada del fago a la bacteria y las proteínas de la cápside son removidas y depositadas en la membrana interna. Al mismo tiempo la maquinaria de replicación de la bacteria convierte la cadena sencilla de ADN del fago en doble cadena. Después de ser replicada, la doble cadena de ADN vuelve a convertirse en cadena sencilla, la cual se empaca en una nueva partícula de fago. El péptido señal de las proteínas pIII y pVIII dirige a las mismas hacia la membrana interna de la bacteria. La partícula de fago madura sale a través de la membrana interna sin que se afecte el crecimiento de la célula. La producción de fagos continúa hasta que eventualmente la célula muere por la acumulación de componentes tóxicos del fago o productos de desecho de la célula.

Las proteínas pIII y pVIII son las más usadas en la clonación como se mencionó anteriormente. Muchos péptidos cortos y una gran variedad de proteínas han sido desplegadas en la región amino terminal de la proteína pIII. En cambio la proteína pVIII parece tolerar solamente insertos más cortos de 5 a 6 aa.

En ocasiones se utilizan fagémidos, los cuales tienen 2 orígenes de replicación, uno para fago M13 y otro para *E. coli*. Esto permite que los fagémidos puedan ser crecidos como plásmidos o empacados como fagos recombinantes con la ayuda de un fago ayudador como el M13 KO7. En estos casos cuando las células contienen el fagémidos y son infectadas con el fago ayudador, tanto la pIII ó pVIII con inserto y la pIII ó pVIII sin inserto del fago ayudador son expresados. Generalmente el número de proteínas recombinantes expresadas en el fago son menores que el número de proteínas silvestres. Se calcula que el 30% de las 2700 copias de la pVIII expresan el inserto mientras que en la pIII hay aproximadamente 1 copia con inserto expresada cuando se usa este tipo de expresión [123,138].

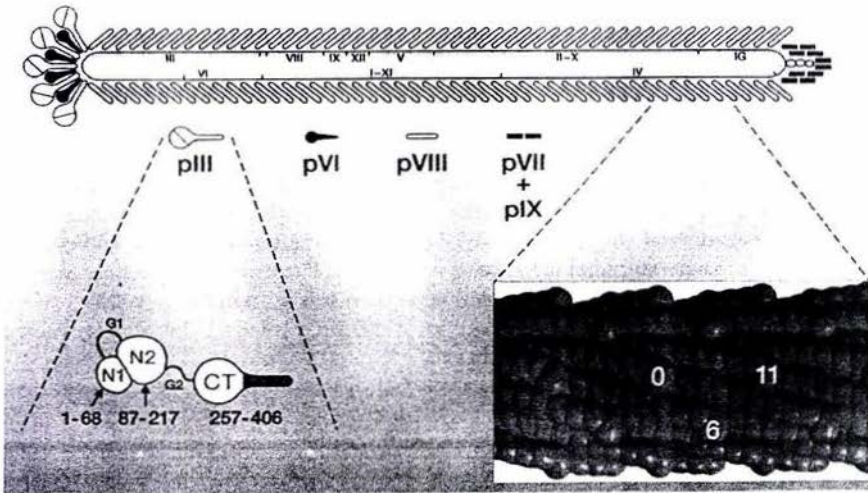


Fig. 5. Diagrama de la estructura del fago filamentoso M13.



## 2. JUSTIFICACIÓN

Se ha reportado que existen alrededor de 40 millones de personas en el mundo y 14 000 personas se infectan cada día [3]. El número de infectados va en aumento en especial en los países en vías de desarrollo. Existen más de 22 fármacos aprobados por la FDA para el uso terapéutico en humanos [139]; sin embargo el uso de estos productos es limitado como consecuencia de diferentes factores como los efectos secundarios que se generan en un 25% de los pacientes tratados [140], el desarrollo y la transmisión de cepas resistentes, la dificultad en los regímenes del tratamiento y el más importante su alto costo. Hoy día es necesario buscar la manera de desarrollar biomoléculas que ayuden a prevenir y/o controlar la infección por el VIH-1. Entre las diferentes estrategias se consideró la construcción de moléculas que interaccionen en el proceso de infección de la célula. Entre las partículas que participan en los fenómenos de fusión de virus - célula está gp41 [141], de la cual se han hecho estudios acerca de sus 2  $\alpha$ -hélices, tanto la carboxilo como en la amino, [69,142] de estas investigaciones han surgido un gran número de estrategias para interrumpir la interacción célula-virus como el uso de péptidos en isoforma D, simulando una imagen en espejo para evitar tanto la interacción entre las 2 hélices así como su degradación por proteasas [143]. El péptido en isoforma L (T-20 o Enfuvirtide) está aprobado por la FDA para usarse en humanos [144]. Distintos anticuerpos monoclonales (como 2F5, 4E10, etc.) dirigidos contra gp41 se han utilizado extensamente en la caracterización de esta molécula [145].

Las regiones  $\alpha$ -hélices participan en establecer las conformaciones necesarias para que gp41 pueda adoptar la forma fusogénica. Estas regiones  $\alpha$ -hélices están unidas por la región inmunodominante [146] en donde tiene su epítipo el MoAb Clona 3 (CL3) [83]. Este monoclonal es muy importante ya que es capaz de neutralizar cepas de laboratorio y AZT resistentes. En contraste, no se obtuvieron anticuerpos neutralizantes mediante la inmunización de conejos con péptidos sintéticos que contienen el epítipo de CL3. Este monoclonal reconoce a su epítipo expresado en péptidos sintéticos en presencia de 2  $\beta$ -mercaptoetanol (2ME); y cuando se realiza un análisis por sustitución de alaninas. El

monoclonal no reconoce al epítipo cuando la cisteína carboxilo del péptido es sustituida. Esto sugiere que el epítipo de CL3 se expone en un proceso dinámico (tal vez en el paso de la forma nativa a la forma fusogénica) y está expuesto solo cuando gp41 tiene una conformación similar a la del péptido en su forma lineal [84]. De esta forma es posible que cuando gp41 presente una serie de cambios conformacionales, se expongan una serie de epítipos los cuales pueden ser blanco para la obtención de anticuerpos neutralizantes. Están reportados 5 regiones inmunoreactivas de la región inmunodominante de gp41 (DQQLGIWGCSSGKLICTTAVPWN) las cuales son: LLGIWG, WGCSSGK, GKLICT, ICTTAV y TAVPWN. Cabe mencionar que un suero no muestra reactividad hacia todos los epítipos y que de los 4 MoAbs reportados que tienen una amplia capacidad neutralizante (que son b12, 2G12, 2F5 y Clona 3) solo 2F5 y CL3 reconocen su epítipo en gp41 y de estos sólo CL3 lo tiene en la región inmunodominante (RID) [147].

El realizar una evaluación de la antigenicidad e inmunogenicidad de ésta región ermitirá una mejor comprensión del papel que juega la RID de gp41 dentro del proceso de fusión así como la importancia del asa de cisteínas en la exposición de estos epítipos. Así como el poder identificar moléculas candidatas para utilizarse en métodos de diagnóstico económicos en países en vías de desarrollo.

Se puede usar PhD para poder mapear sueros policlonales de una manera rápida. También el estudio de la región inmunodominante de gp41 mediante el uso de péptidos desplegados en fagos filamentosos ofrece la posibilidad de identificar en forma rápida, biomoléculas capaces de producirse en alta escala a bajo costo.

### 3. OBJETIVOS

Para poder caracterizar antigénica e inmunogénica de la región inmunodominante de gp41 del VIH-1 expresada en la superficie de fagos filamentosos se cumplieron los siguientes objetivos:

- Identificar anticuerpos de sueros policlonales humanos VIH +.
- Caracterizar las clonas seleccionadas mediante la secuenciación de su ADN.
- Evaluar la capacidad inmunogénica de las clonas obtenidas en ratones así como la capacidad neutralizante de los anticuerpos inducidos.
- Evaluar la capacidad antigénica de la región inmunodominante de gp41 del VIH-1 en un panel de sueros VIH+ mediante ELISA

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Los sueros humanos VIH + utilizados en este estudio fueron obtenidos de pacientes infectados con el VIH-1. Los sueros normales se obtuvieron de personas VIH negativos (sanas o controles negativos), los 2 tipos de sueros se obtuvieron del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, en la Ciudad de México, perteneciente a la Secretaría de Salud. Las muestras fueron mantenidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. La información clínica proporcionada de las muestras fue carga viral, cuenta de CD4 y CD8. Aquellas muestras de las que no se obtuvo datos como cantidad de CD4 ni carga viral fueron eliminadas. Solo se contó con 63 muestras de sueros (Apéndice 1). De éstas muestras, sólo 22 estaban sin tratamiento antiviral. El rango de las cargas virales va desde 50 hasta  $1.68 \times 10^5$  copias de ARN/ml.

Los sueros obtenidos se clasificaron en base a la cantidad de células CD4+ presentes en los sueros y se agruparon de la siguiente manera:

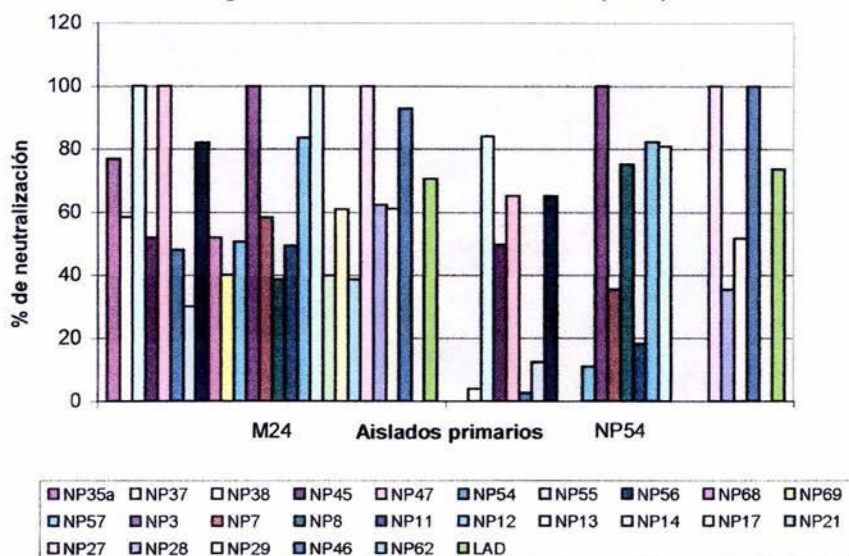
Grupo 0	5 sueros VIH negativos
Grupo 1	16 sueros con cuentas menores de 200 CD4
Grupo 2	16 sueros con cuentas de CD4 de 200 a 400
Grupo 3	31 sueros con cuentas mayores de 400 CD4

**Mapeo e identificación de epítomos/mimótopos de sueros policlonales de pacientes con infección por VIH-1 mediante el uso de bibliotecas de péptidos expresadas en fagos filamentosos.**

Para llevar a cabo el mapeo y/o la identificación de mimótopos-epítomos se usaron 3 bibliotecas comerciales (7, 12 y 7aa. flanqueados por cisteínas) y expresados en la porción amino terminal de la pIII del fago M13 (New England Biolabs Inc., Beverly, USA).

Del banco de sueros humanos VIH + se tiene información clínica como carga viral, conteo de CD4 y los colaboradores del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” nos brindaron información acerca de la capacidad neutralizante de ciertos sueros en contra de aislados primarios. Esta información está basada en la medición de producción de antígeno p24 en PBMC en presencia de 2 aislados primarios por separado (M24 y NP54) Gráfica 2.

**Gráfica 2. Ensayo de neutralización in vitro de aislados primarios con sueros humanos (1:100)**



Posterior al análisis de estos resultados, se realizó un ensayo de ELISA para evaluar la reactividad de estos sueros con el péptido sintético que contiene a la región inmunodominante de gp41 llamado GM15 (IWGCSGKLICTTAVP, sintetizado mediante el procedimiento de Merrifield descrito en 148) ya sea en su forma lineal o cíclica y usando como controles péptidos no relacionados llamados “E2” y “T1C” (Gráfica 3, pág. 45).

### **Bioselección**

La bioselección se realizó mediante el uso de placas de microtitulación (Boehringer Mannheim, GMBH-Germany), las cuales estaban cubiertas con anticuerpos anti Fc de IgG humano. Esto permite capturar a los IgG de los sueros por su porción Fc y tener una mejor exposición de la región Fab [149]. Generalmente se utilizan 4 pozos por suero/bioselección. Posteriormente se bloquean los pozos con PBS (0.01 M de PBS (pH 7) 0.01 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.37 M de NaCl, 0.027 M KCl) -BSA al 2%. Posterior al periodo de incubación de 1.5 Hrs. y de lavar los pozos con PBS se agregan los sueros. Se utilizaron los sueros de los pacientes marcados con la clave NP8 y NP13, debido a sus características en carga viral, conteo de CD4, capacidad neutralizante y en su capacidad de reconocer al péptido sintético GM15 en su forma lineal o cíclica. Los sueros se agregan cada uno por experimento a las placas usando una dilución 1:50 en PBS agregando 200  $\mu\text{l}$ /pozo dejando incubar durante 1.5 Hrs a 37<sup>0</sup> C. Posteriormente se lavan los pozos con PBS y se incuba a 4<sup>0</sup> C toda la noche, se agregan las bibliotecas de péptidos en fagos ( $10^{11}$  fagos/pozo) en PBS-BSA 0.1% en un volumen de 100  $\mu\text{l}$ /pozo, se deja incubar a 4<sup>0</sup> C por 4.5 horas. Después se lavan 5 veces los pozos con PBS frío y se deja incubar con 100  $\mu\text{l}$ /pozo de PBS frío durante 30 minutos. Se quita el sobrenadante y se agregan 100  $\mu\text{l}$ /pozo de solución amortiguadora de elusión, HCl-glicina (0.2 M glicinia/HCl pH 2.2) incubando 10 minutos a temperatura ambiente (TA) y posteriormente 10 minutos a 37<sup>0</sup> C. Se colecta el eluido de los 4 pozos utilizados (400  $\mu\text{l}$  aproximadamente) y se neutraliza el pH ácido de la solución de elusión mediante el uso de 25  $\mu\text{l}$  de Tris (2M, pH 11.07).

### **Titulación de fagos y fagémidos**

Posterior a cada ronda de bioselección se calcula el número de fagos eluidos. De cada elusión se toma una muestra para realizar diluciones seriadas. De cada dilución se toma una muestra (1 a 5  $\mu$ l) y se agregan a 200  $\mu$ l de *E. coli* TG-1 proveniente de un cultivo con  $DO_{600} \sim 0.5$ . A esto se le puede agregar 10  $\mu$ l de Xgal/IPTG (1 g X-gal, 1.25 g IPTG, disolver en 25 ml de dimetil formamida y mantener a  $-20^{\circ}$  C) como marcador, debido a la presencia del gene lac-Z en el ADN del fago. Se deja incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregan 5 ml. de Top Agar fundido (en 1000 ml. de H<sub>2</sub>O: 10 gr. de bacto-tryptone, 5 gr de extracto de levadura, 5 gr. de NaCl, 1 gr de MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O y 7 gr de agarosa), se mezcla y se pone en una caja de petri con LB agar (en 1000 ml. de H<sub>2</sub>O: 10 gr. Bacto-triptone, 5 gr. de extracto de levadura, 5 gr. de NaCl y 15 gr. de agar). Se incuba a  $37^{\circ}$  C toda la noche. Al día siguiente se cuentan el número de unidades formadoras de placa (pfu) y se multiplica por el factor de dilución para obtener el número de fagos eluidos / ml.

En el caso de los fagémidos, se hace el mismo procedimiento hasta ponerlos a interactuar con las bacterias *E. coli* TG1. Ya que posteriormente de los 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se plaquea con el uso de un asa. Esto se realiza en una caja de petri con LB + ampicilina (50  $\mu$ g/ml) y se deja incubando toda la noche a  $37^{\circ}$  C. Posteriormente se cuenta el número de colonias de bacterias que crecieron y se multiplica por el factor de dilución.

### **Amplificación de fagos**

Para amplificar los fagos eluidos provenientes de la bioselección previa, se ponen en 50 ml de medio 2xYT (en 1 Lt. de H<sub>2</sub>O: 16 gr. de bacto-tryptone, 10 gr. de extracto de levadura y 5 gr. de NaCl) mas 1/100 de *E. coli*  $DO_{600} \sim 0.5$ . Se dejan en agitación por 4.5 horas a  $37^{\circ}$  C. Posteriormente se tiene que purificar los fagos mediante una doble precipitación con

PEG/NaCl de la siguiente manera: se centrifugan a 12 000g por 10 minutos a 4<sup>0</sup> C. Se toma el sobrenadante y se le agrega 1/6 parte del volumen de Peg/NaCl (NaCl 5M, Polietilenglicol-8000 400 gr/Lt). Se mezcla y se mantiene a 4<sup>0</sup> C toda la noche.

Después del periodo de incubación se centrifuga nuevamente (12 000g a 4<sup>0</sup> C). Se desecha el sobrenadante y el botón de fagos que se forma se resuspende en 1 ml de TBS (50 mM tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl). Se transfiere a un tubo de microcentrifuga y se centrifuga 5 minutos a 16 000g a 4<sup>0</sup> C. Se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo y se le agrega nuevamente 1/6 parte de PEG/NaCl, dejándose incubar 1 hora en hielo. Posteriormente se centrifuga 10 minutos a 16 000g a 4<sup>0</sup> C, se tira el sobrenadante y el pellet se resuspende en 200 µl de TBS. Se centrifuga nuevamente por 5 minutos a 4<sup>0</sup> C, se toma el sobrenadante y se pasa a un tubo nuevo. Se titula el fago obtenido. Normalmente con este procedimiento se obtienen títulos de 10<sup>13</sup> fagos/ml. Estos fagos se pueden utilizar en nuevas rondas de bioselección, ELISA, secuenciación, inmunización, etc.

En el caso de fagémidos se utilizan 2 ml de TG1 provenientes de un cultivo con DO<sub>600</sub> ~0.5, y se agrega el eluido, esto se deja en incubación 1 hr. A 37<sup>0</sup> C sin agitación.

Posteriormente se agregan 8 ml. de 2xYT con 10 µl de ampicilina (100 µg/µl) y se deja 2 hrs. en agitación a 37<sup>0</sup> C. Posteriormente se toman 5 ml. del cultivo anterior y se le agregan 88 µl de fago ayudador KO7, 10<sup>11</sup> pfu/ml, Fago ayudador M13KO7 (Invitrogen, CA,USA) y se deja 1 hr. a 37<sup>0</sup> C sin agitación. Posteriormente se lleva este cultivo a un volumen de 100 ml de 2xYT y se le agrega ampicilina (100 µg/µl) y kanamicina (50 µg/µl) y se deja toda la noche en agitación a 30<sup>0</sup> C. Posteriormente se realiza la precipitación como si fuera fago.

Se realizaron 3 rondas de bioselección, en cada una de las rondas se seleccionaron clonas al azar, 3-4 en la 1<sup>a</sup> ronda, 3-4 en la 2<sup>a</sup> y 4-6 en la 3<sup>a</sup> ronda. Estas fueron amplificadas en volúmenes de 10 ml siguiendo los procedimientos antes mencionados.



### **Purificación de ADN de cadena sencilla de los fagos**

Para la purificación de la cadena sencilla de ADN de los fagos se tomó 1 ml del sobrenadante de la primera centrifugación del proceso de amplificación de cada clona seleccionada, se agregaron 400  $\mu$ l de PEG/NaCl y se mantuvo a temperatura ambiente por 10 minutos, después se centrifugó 10 minutos a 16 000 g y se desechó el sobrenadante. Se recentrifuga por 30 segundos para eliminar el sobrenadante nuevamente. Se agregan 200  $\mu$ l de solución amortiguadora de yodo (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA y 4M NaCl) y se resuspende el botón obtenido, posteriormente se agregan 500  $\mu$ l de etanol absoluto, se mezcla y se incuba por 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 10 minutos a 16 000 g, se elimina el sobrenadante y se lava con 200  $\mu$ l de etanol al 70%. Se elimina el sobrenadante y se agrega 15.5  $\mu$ l de agua bidestilada. La cantidad y calidad del ADN se verifica en un gel de agarosa al 1%.

En el caso de los fagémidos, se obtuvo el ADN de doble cadena mediante el uso del kit Quantum Prep MiniPrep, siguiendo las instrucciones del proveedor y la cantidad y calidad del ADN se verificó en un gel de agarosa al 1%.

### **Secuenciación del ADN de cadena sencilla de los fagos.**

La secuenciación del ADN de los fagos seleccionados se realizó mediante el uso del kit "T7 Sequenase versión 2.0 Quik-Denature plasmid sequencing" (Amersham Life Science, OH) y dATP  $\alpha$ -S<sup>35</sup> que está basado en el método de Sanger modificado.

Se incuba durante 10 minutos a 37<sup>0</sup> C la siguiente mezcla:

1.5  $\mu$ l de primer de secuenciación

2  $\mu$ l de "plasmid reaction buffer"

12.5  $\mu$ l de ADN (0.5 – 3  $\mu$ g ) de la clona a secuenciar.

Después de incubar se pone en hielo por 10 minutos. A la mezcla anterior se le agregó 1 µl de ditionitrito 0.1 M, 2 µl de labeling mix (dNTPs de G, T, C. 7.5 µM c/u), 0.5 µl de dATP  $\alpha$ -S<sup>35</sup> (3.75 X 10<sup>-13</sup> µCi) y 1 µl de enzima (4 U de polimerasa), dejándose incubar 5 minutos a 37<sup>0</sup> C. Posteriormente en 4 tubos por clona a secuenciar, se agregan 2.5 µl de ddNTPs (80 µM), cada tubo para cada nucleótido de terminación, y a cada tubo se le agrega 4.5 µl de la mezcla anterior incubándose a 37<sup>0</sup> C por 5 minutos. Posteriormente, a cada uno de los tubos se les agrega 4 µl de la solución de paro y se incuba por 5 minutos a 37<sup>0</sup> C por 3 minutos. Posteriormente se agregan 7 µl de cada una de las muestras en los carriles de un gel de poliacrilamida al 8% (39.6 g. de urea, 26.4 ml agua, 16 ml acrilamida/bisacrilamida 38:2, 8 ml TBE 10X, 675 µl persulfato de amonio y 25 µl TEMED).

. Se corre aproximadamente 4.5 horas a 1800 volts, se seca el gel en el secador de geles durante 1 hora a 80<sup>0</sup> C. Se transfiere a un cassette junto con una placa de rayos X de 14" X 16" durante 72 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se revela la placa y se realiza la lectura manual de las secuencias.

En el caso de los fagémidos se realiza una desnaturalización alcalina rápida del ADN de doble cadena mediante el uso de NaOH 1M y HCl 1 M. siguiendo las indicaciones del proveedor (T7 Sequenase versión 2.0 Quik-Denature plasmid sequencing" Amersham Life Science, OH). Posteriormente se realiza el procedimiento como si fuera ADN de cadena sencilla.

#### **Análisis de secuencias.**

Las secuencias de los péptidos expresadas en los fagos fueron analizadas mediante el uso de programas de computadora ALIGN y LALING del Servidor de Genestream Bioinformatics Resource (<http://xylian.igh.cnrs.fr/>).

### **Inmunización de ratones BALB/cAnN**

Se seleccionaron 5 clonas obtenidas de la bioselección con el suero 8 y 4 obtenidas con el suero 13, las cuales fueron utilizadas para inmunizar ratones BALB/cAnN.

Para cada muestra se inmunizaron 3 ratones hembras Balb/C de 4 a 6 semanas de edad. La vía de inmunización fue intra peritoneal y subcutánea alternadamente. Se inmunizaron 2 X  $10^{11}$  pfu/100  $\mu$ l de TBS. Se realizaron 4 inmunizaciones con 10 días de diferencia entre cada inmunización. 10 días posteriores a la última inmunización se sangraron a blanco, se juntaron los sueros de cada grupo experimental y se mantuvieron a  $-20^{\circ}$ C hasta su utilización.

### **Ensayos de neutralización *in vitro* (Captura de antígeno p24 y cuantificación de sincicios).**

Los sueros humanos VIH + fueron evaluados en ensayos de neutralización *in vitro* mediante la medición de la captura de antígeno p24. Este ensayo se realizó por duplicado y utilizando aislados primarios (M24 y NP54) libres de células. Se utilizan PBMC ( $5 \times 10^5$  células/pozo) en 200  $\mu$ l de medio de cultivo RPMI + Suero Fetal Bovino 20% + 1% de antibióticos (penicilina streptomycin). Después de 2 horas de incubación a  $37^{\circ}$ C con 5 % de  $CO_2$  se agregan los sueros a evaluar para obtener una dilución 1:100 además de los aislados virales, de estos se agregan 100  $\mu$ g/pozo. Todo esto se deja incubar por 24 hrs a  $37^{\circ}$ C con 5 % de  $CO_2$ . Posteriormente se centrifuga la placa a 1500 rpm, se elimina el sobrenadante y se agrega PBS (1  $\mu$ l/pozo) y se centrifuga nuevamente. Se elimina el sobrenadante y se agregan 500  $\mu$ l de medio/pozo y se deja en incubación por 72 horas. Posteriormente se toman los sobrenadantes en una dilución 1:5 y se utiliza para realizar el ELISA para determinar la concentración de antígeno p24 mediante la utilización de algún juego comercial.

Los sueros de los ratones inmunizados con las construcciones seleccionadas fueron utilizados en ensayos de neutralización *in vitro* utilizando células MT2 y VIH-1<sub>MN</sub>. El ensayo se basó

en la capacidad de inhibir la formación de sincicios. Los ensayos fueron realizados en el laboratorio del Dr. K. Ugen en la Universidad de Pennsylvania [68, 69] como se describe a continuación: Los ensayos se realizaron por duplicado. Los sueros de los ratones se diluyeron serialmente 1:16, 1:32 y 1:64. Se utilizaron 50 µl de los sueros diluidos fueron mezclados con 100 TCID<sub>50</sub> (50% de Dosis Infecciosa de Cultivo Celular) del aislado de laboratorio VIH<sub>MN</sub> y se dejó en incubación por 2 Hrs. a 37 °C. Posteriormente se agregan 2000 células MT-2/pozo y se incuba toda la noche. Al día siguiente, las placas son lavadas y centrifugadas y se agrega medio RPMI 1640. Y se comienza a contar el número de sincicios que se formen a partir del día 4 mediante la utilización de un microscopio de luz invertida y mediante una amplificación 40X.

### **Clonación del péptido de la región inmunodominante de gp41 del VIH-1 en la pIII y pVIII de fagos.**

La secuencia de la región inmunodominante se clonó en el ADN de fagos para expresarla en la pIII y también se clonó en el ADN de fagémidos para que se expresara en la pVIII.

Para la clonación en la pIII se logró mediante el diseño de oligos que codificaran a esta región inmunodominante después de la secuencia VPFYSHS es parte del péptido señal de la pIII. También en el diseño de estos oligos se incluyen 2 sitios de restricción que son Acc65 I y Eag I.

Lo que se hizo fue tomar a los oligos EXT-NGM (5' CA TGT TTC GGC CGA CAC AGC AGT GGT GCA AAT GAG TTT TCC AGA GCA ACC AGA GTG AGA ATA GAA AGG TAC CCG GG 3'), EXT-GMA1 (5' CA TGT TTC GGC CGA CAC AGC AGT GGT GCA AAT GAG TTT TCC AGA AGC ACC AGA GTG AGA ATA GAA AGG TAC CCG GG 3') y EXT-GMA2 (5' CA TGT TTC GGC CGA CAC AGC AGT GGT AGC AAT GAG TTT TCC AGA GCA ACC AGA GTG AGA ATA GAA AGG TAC CCG GG 3') y fueron sometidos a un proceso de unión o pegado al primer de extensión (5' CAT GCC CGG GTA CCT TTC TAT TCT C 3') y utilizando el protocolo descrito en la tabla 3.

**Tabla 3. Protocolo de unión de primer de extensión con oligos.**

Reactivo	Cantidad
EXT-NGM o EXT-GMA1 o EXT-GMA2	0.5 µg
Primer de extensión	2.9 µg
Volumen total	30 µl

Esta mezcla se calentó a 95<sup>0</sup> C y se fue enfriando lentamente hasta llegar a una temperatura menor a 37<sup>0</sup> C usando un termociclador Perkin Elmer 9600 (Bio Rad). Esto genera que el primer de extensión se una a los oligos utilizados. Esto se demuestra en el siguiente diagrama:

Primer de extensión: 5' CAT GCC CGG GTA CCT TTC TAT TCT 3'

+

Oligo

3' GGGCCCATGGAAAGATAAGAGTGAGACCAACGAGACCTTTTGAGTAAACGGTGGTACGACAC  
AGC CGG CTT TGT AC 5'

⇓

5' CAT GCC CGG GTA CCT TTC TAT TCT CAC TCT 3'

3' GG GCC CAT GGA AAG ATA AGA GTG AGA CCA ACG AGA CCT TTT GAG TAA ACG

TGG TGA CGA CAC AGC CGG CTT TGT AC 5'

Posteriormente para extender las cadenas de ADN unidas en el protocolo anterior, se llevó a cabo el protocolo descrito en la tabla 4.

**Tabla 4. Protocolo de extensión para oligos unidos al primer de extensión.**

Reactivo	Cantidad
Reacción de unión inserto + primer	30 $\mu$ l
Sol. amortiguadora de enzima Klenow 10X (NEB)	20 $\mu$ l
10 mM dNTP's	8 $\mu$ l
Enzima Klenow	3 U
Agua	139 $\mu$ l
Volumen total	200 $\mu$ l

Esta reacción se dejó incubando a 37<sup>0</sup> C por 10 minutos, posteriormente se puso a 65<sup>0</sup> C por 15 minutos. Con este protocolo se obtienen productos con extremos romos. Pero para poder dirigir la clonación de estos productos en el vector de fago es necesario digerir el extremo 5' con Acc65 I y el extremo 3' con Eag I. Para poder lograr esto, cada una de las 3 construcciones para clonar en fago, fueron sometidas al protocolo descrito en la tabla 5.

**Tabla 5. Protocolo de digestión de insertos para clonación en vector de fago M13KE.**

Reactivo	Cantidad
Reacción de extensión	200 $\mu$ l
Buffer 3 de enzima 10X (NEB)	40 $\mu$ l
Eag I (10U/1 $\mu$ l)	5 U
Acc65 I(10U/1 $\mu$ l)	5 U
Agua	160 $\mu$ l
Volumen total	400 $\mu$ l

Esto se incubó por 3 horas a 37<sup>0</sup>C y se purificó con acetato de sodio y etanol. Posterior a este tratamiento se guardó a -20<sup>0</sup>C hasta su uso.

Para la clonación en la pIII del fago se utilizó el vector de clonación M13KE (NEB) figura 6, el cual se digirió de acuerdo al protocolo descrito en la tabla 6.

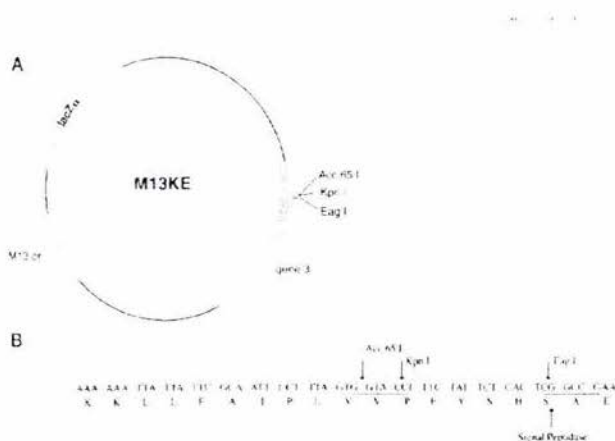


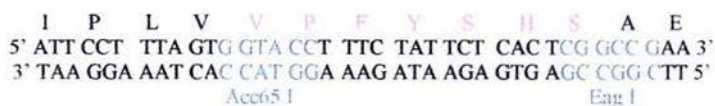
Figura 6. Mapa del vector de clonación M13KE.

**Tabla 6. Protocolo de digestión del vector M13KE.**

Reactivo	Cantidad
M13KE	3µg
EagI	3 U
Acc65I	3 U
Volumen total	120 µl

Se dejó digiriendo 16 horas a 37<sup>0</sup> C y se purificó el vector digerido mediante su purificación en una electroforesis en gel de Tris-Borato-EDTA (TBE, Tris 54 g/Lt, ácido bórico 27.5 g/Lt, EDTA 20 ml.) agarosa 1% con 0.5% de bromuro de etidio. Esto genera que en el vector digerido se pueda clonar un inserto que tenga los extremos complementarios. En el diagrama siguiente se muestra como quedan los extremos del vector digerido

Vector M13KE sin digerir.



Vector M13KE digerido con Acc65 I y Eag I





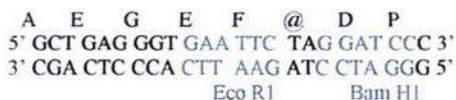
Para la clonación en la pVIII se digirió el vector de fagémido PF8 (133) utilizando el protocolo descrito en la tabla 7.

**Tabla 7. Protocolo de digestión del vector PF8.**

Reactivo	Cantidad
PF8	10 µg
Eco RI	3 U
Bam HI	3 U
Buffer 10X	10 µl
Volumen total	100 µl

Esto se digiere toda la noche a 37<sup>0</sup> C. Posteriormente se precipitó con acetato de sodio/etanol y se llevó a un volumen de 20 µl mediante el uso de agua Milli Q. Esto genera que los extremos del vector sean cohesivos. Con lo cual se puede dirigir la clonación. Esto se muestra en el siguiente diagrama:

Vector PF8 sin digerir



Vector PF8 digerido con Eco RI y Bam HI.



Para la preparación de los insertos se realizó el “annealing” de los primers AnGM1 (5' AA TTC GGT TGC TCT GGA AAA CTC ATT TGC ACC ACT GCT GTG 3') con AnGM2 (5' G ATC CAC AGC AGT GGT GCA AAT GAG TTT TCC AGA GCA ACC G 3'); AnGMA11 (5' AA TTC GGT GCT TCT GGA AAA CTC ATT TGC ACC ACT GCT GTG 3') con AnGMA12 (5' G ATC CAC AGC AGT GGT GCA AAT GAG TTT TCC AGA AGC ACC G 3') y del AnGMA21 (5' AA TTC GGT TGC TCT GGA AAA CTC ATT GCT ACC ACT GCT GTG 3') con AnGMA22 (5' G ATC CAC AGC AGT GGT AGC AAT GAG TTT TCC AGA GCA ACC G 3') usando la misma estrategia para el primer de extensión. Al momento de realizar estas uniones o pegados da como resultado que se forme un producto con extremos cohesivos para 5' Eco R1 y Bam H1 para 3' sin necesidad de realizar alguna digestión.

Posteriormente se realizó la ligación del ADN de estos insertos con el ADN del vector PF8 digerido Eco R1 – Bam H1 utilizando el siguiente protocolo mostrado en la tabla 8.

**Tabla 8. Protocolo de ligación del ADN de los insertos con el ADN del vector de fagémido PF8.**

Reactivo	Cantidad
PF8 digerido con Eco R1/Bam H1	100 ng
Inserto	300 ng
Sol. amortiguadora 10X	10 µl
T4 Ligasa (Fermentas)	1 U
Volumen total	20 µl

Esto se dejó 5 minutos a temperatura ambiente y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **Electroporación.**

Para realizar la electroporación se prepararon células competentes *E. coli* TG1 de la siguiente manera:

Las células que se obtienen de 100 ml de cultivo de células *E. coli* TG1 con una D.O.<sub>600</sub> de 0.3 a 0.6 en medio LB son centrifugadas a 1000 g por 10 minutos a 4<sup>0</sup>C. El botón de células es resuspendido en 1/10 del volumen inicial, es decir en 10 ml. de buffer TSB estéril a 4<sup>0</sup> C (Medio LB pH 6.1, PEG-3350 10%, DMSO 5%, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y MgSO<sub>4</sub> 10 mM), se incuban en hielo por 10 minutos y después se congelan en alícuotas en un baño de hielo seco con etanol para su almacenamiento a -70<sup>0</sup> C.

Para la electroporación se toma una alícuota, se descongela a temperatura ambiente y se pone en hielo. Posteriormente en un tubo de polipropileno de 1.5 ml se ponen 40 µl de las células electrocompetentes con 1 ó 2 µl de la muestra de DNA a electroporar. El electroporador (Gene Pulser, Bio Rad) se calibra a 25 µF y 2.5 kV, y 200Ω. La mezcla de células con DNA se traslada a una cubeta, enfriada en hielo previamente, y se pone en la cámara donde se realiza la electroporación.

Posterior a la electroporación, se toma la cubeta de electroporación y se le agrega 1 ml de medio SOC (Bacto-tryptone 2 %, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM y glucosa 20 mM), y se traslada esta nueva mezcla hacia un tubo de polipropileno de 15 ml. Se deja incubando a 37<sup>0</sup> C por 30 minutos sin agitación y luego otros 30 minutos con agitación.

Dependiendo de si se electroporó fago o fagémido, es el tratamiento que se le da posteriormente.

Para fagos se agregan 40 µl de células electrocompetentes a la mezcla con medio SOC y posterior a los períodos de incubación se mezcla todo con Top Agar fundido para verterlo todo en una caja de petri con medio LB Agar.

Para fagémidos, después del período de agitación, se toman muestras de diferentes volúmenes (10, 50, 200 µl, etc.) y se les agrega medio SOC para llegar a un volumen

aproximado de 300  $\mu$ l y se plaquea en una caja de petri con LB + Ampicilina 100  $\mu$ g/ml con la ayuda de una espátula.

### **Ensayos de ELISA**

Para evaluar la reactividad de las construcciones, en fagos y fagémidos, con un panel de sueros VIH-1 positivos y negativos se realizaron diferentes tipos de ELISA.

**ELISA PARA FAGOS:** En una placa para ELISA de 96 pozos (Nunc Maxi Sorp, Denmark) sensibilizada con un anticuerpo monoclonal anti-Fc de IgG humano y bloqueada con una solución de PBS-BSA al 3% se le agregaron los sueros humanos VIH + diluidos 1:300 en PBS-BSA al 1%. Como control negativo se usan sueros de pacientes no infectadas o VIH negativos. Se dejaron en incubación por 1 hr. a 37<sup>0</sup> C. Posteriormente fueron lavadas con PBS-Tween 0.01% y se les agregó 10<sup>10</sup> pfu de cada construcción (M13 sin inserto como control) y se dejó en incubación toda la noche a 4<sup>0</sup>C. Posteriormente después de otra serie de lavados se le agregó un anticuerpo monoclonal anti M13 conjugado con peroxidasa (HRP) (Amersham Pharmacia Biotech) y se dejó en incubación por 1 hr. a 37<sup>0</sup> C. Después de este período se lavó nuevamente y se agregaron 100  $\mu$ l de substrato ABTS (Zymed Laboratoires Inc., San Francisco, CA. USA). Se tomaron lecturas de la absorbancia a 405 nm en un lector de placas automático (Opsys MR Microplate Reader, DYNEX Technologies Inc., Chantilly, VA. USA).

**ELISA PARA FAGÉMIDOS:** En este formato los fagémidos se agregan a la placa de ELISA (10<sup>11</sup> pfu de la clona a evaluar) en PBS por pozo. Como control se agrega el M13 sin inserto. Se deja en incubación a 4<sup>0</sup> C toda la noche. Posteriormente se lava la placa, se bloquea y se agregan los sueros humanos a evaluar como se describió en el protocolo de la ELISA para fagos. Después del lavado se agrega un anticuerpo monoclonal de cabra anti IgG humano conjugado con HRP, en una dilución 1:10,000 en PBS-BSA al 1%. Se deja incubar 1 hr. a 37<sup>0</sup> C, se lava y se agregan 100  $\mu$ l de substrato ABTS. La lectura se toma como se describió anteriormente.

ELISA CON  $\beta$ -MERCAPTO ETANOL. Este tipo de ELISA se realiza de la misma manera que en el protocolo descrito para ELISA con fagémidos, la diferencia está en que los fagémidos a utilizar estuvieron diluidos en una solución de PBS-BSA 1%-  $\beta$ -mercapto etanol al 15%. Los controles estuvieron en una solución de PBS-BSA al 1%. El porcentaje de inhibición de reconocimiento o unión de cada suero se calcula usando la siguiente fórmula:

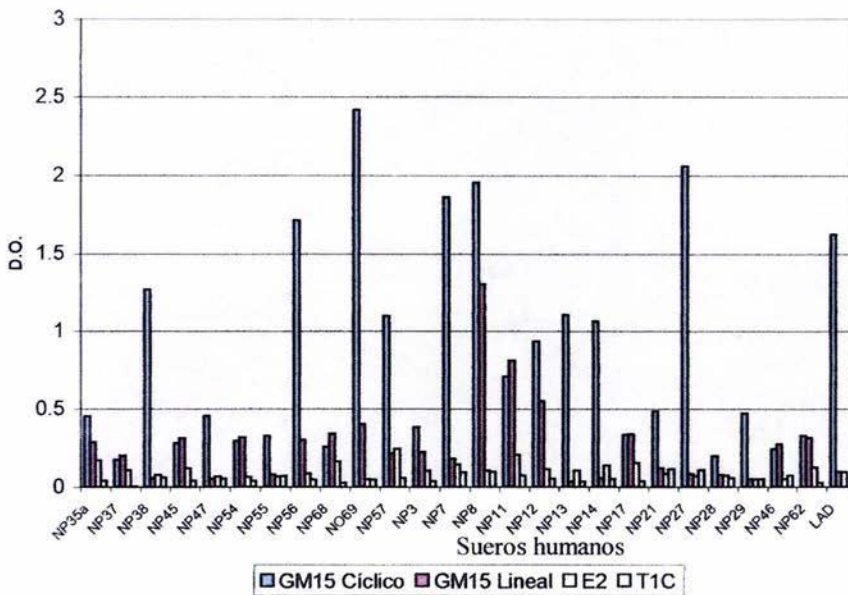
$$100 - \frac{(\text{lectura con } \beta\text{-mercapto-etanol} \times 100)}{(\text{lectura sin } \beta\text{-mercapto etanol} - \text{lectura con M13})}$$

ELISA DE COMPETENCIA: Este tipo de ELISA se realiza de la misma manera que en el protocolo descrito para ELISA con fagémidos con la diferencia está en que los sueros humanos fueron incubados a 4<sup>0</sup> C toda la noche previa a su uso con un péptido sintético: GM15 o con el péptido no relacionado C44 (CASVRGWYVRSVDFPAC) Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA.

## 5. RESULTADOS

En este estudio se evaluó la capacidad antigénica e inmunogénica de la región inmunodominante de gp41 del VIH-1 desplegada en la superficie de el fago filamentoso M13. Se usó un banco de sueros proporcionados por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Subirán”. Se cuenta con la siguiente información: fecha de diagnóstico, carga viral, cantidad de CD4's y CD8's (Apéndice 1), régimen de tratamiento antiviral. Se nos proporcionó información de algunos sueros en cuanto a su capacidad de neutralización con aislados primarios basándose en la capacidad de producción de p24 (Gráfica 2, página 28). Con el objetivo de obtener información adicional de los sueros, evaluamos en un ELISA su capacidad de reconocimiento de la región inmunodominante en una forma cíclica y lineal mediante el uso del péptido sintético GM15 en forma cíclica y en forma lineal mediante el uso de  $\beta$ -mercapto etanol (Gráfica 3). Como controles se utilizaron 2 péptidos no relacionados denominados E2 y T1C.

**Gráfica 3. Reactividad en ELISA de sueros VIH+ con GM15 lineal o cíclico**



En la Gráfica 3 se observa que el suero NP8 reacciona más que los demás con el péptido GM15 en su forma lineal y sin tener reactividad con los péptidos no relacionados. También se observa otros sueros (NP38, NP56, NP69, NP57, NP7 NP12, NP13, NP14, NP27 y LAD) muestran reactividad con GM15 en su forma cíclica. Esto es normal debido a que la mayoría de las personas infectadas presentan anticuerpos en contra de esta región.

Se seleccionaron 2 sueros denominados No. 8 y No. 13. El suero NP8 fue seleccionado debido a su reactividad con la forma lineal del péptido ya que el anticuerpo monoclonal Clona 3, que es neutralizante en contra de aislados primarios y cepas AZT resistentes, reconoce a esta región en una forma lineal y no en la presentación cíclica [83,84]. El suero 13 fue seleccionado debido a sus valores en cantidad de CD4's (Anexo I) y a su capacidad neutralizante (Gráfica 2, pág. 28).

Para identificar epítomos de los anticuerpos presentes en ellos se usaron 3 bibliotecas comerciales, 2 que expresan los péptidos en forma lineal (7 y 12 aminoácidos) y 1 que lo expresa en forma cíclica (7 aminoácidos flanqueados por 2 cisteínas). Estos péptidos están expresados en la pIII del fago M13.

Con cada uno de los sueros se realizaron 3 rondas de bioselección para cada biblioteca. Después de cada ronda se titularon los fagos, se amplificaron y se sometieron a una nueva bioselección. En la Tabla 9 se muestran los títulos obtenidos en cada ronda.

**Tabla 9. Títulos de fagos obtenidos en cada ronda de bioselección utilizando los sueros VIH + 8 y 13 utilizando bibliotecas comerciales.**

<b>Suero 8</b>	<b>1ª Ronda</b>	<b>2ª. Ronda</b>	<b>3ª. Ronda</b>
Biblioteca 7 aa	$1.09 \times 10^5$	$2.19 \times 10^7$	$1.11 \times 10^8$
Biblioteca 12 aa	$8 \times 10^4$	$5.78 \times 10^7$	$3.22 \times 10^8$
Biblioteca 9 aa	$1.33 \times 10^5$	$1.32 \times 10^7$	$1.22 \times 10^8$
<b>Suero 13</b>			
Biblioteca 7 aa	$1.76 \times 10^7$	$1.4 \times 10^7$	$2.11 \times 10^9$
Biblioteca 12 aa	$2 \times 10^6$	$7 \times 10^6$	$8.16 \times 10^9$
Biblioteca 9 aa	$2.2 \times 10^6$	$1.56 \times 10^6$	$9.8 \times 10^8$

Como se observa con el suero 8, en la primera ronda se obtuvieron de  $10^4$  a  $10^5$  fagos. Esta cantidad de fagos aumentó 100 veces en la segunda ronda con las bibliotecas de 7 y 9 aa y 1000 veces con la de 12 aa. Ya para la tercera ronda en los 3 experimentos aumentó 10 veces.

En relación al suero 13 se observa que desde la primera ronda se obtuvo un título grande de  $10^6$  a  $10^7$ . Y que en la 2ª ronda solo con la biblioteca de 12 aa hubo un aumento en el título de 10 veces. Sin embargo con las bibliotecas de 7 y 9 aa hubo una ligera reducción. En la 3ª ronda la biblioteca de 12 aa mostró un aumento 1000 veces mientras que de las otras bibliotecas se mostró un aumento de 100 veces.

#### SECUENCIACIÓN DEL ADN DE LAS CLONAS

Se seleccionaron 36 clonas de las 3 rondas realizadas con el suero 8 y 32 clonas de las 3 rondas realizadas con el suero 13. Se secuenciaron los ADN de cada una de las clonas para determinar la secuencia de aminoácidos de los péptidos expresados en cada una de las clonas seleccionadas. Las secuencias obtenidas están en la tabla 10 utilizando el código de una letra por aminoácido.



Tabla 10. Secuencia de clonas obtenidas con los sueros 8 y 13 usando bibliotecas comerciales\*

SUERO 8	SUERO 13
7-1 WSFTWMH	7-1 HVRPGTP
7-2 DSGTRHR	7-2 AGHLAQP
7-3 RSTATLM	7-3 LFQPPAT
7-4 GAHGHSN	7-5 HVTGSMP
7-5 ALACRSL	7-6 TSTMSTR
7-8 ITLNQNA	7-7 VNLSPQ
7-9 LESYIYS	7-8 TQEYFAP
7-10 LVTTFKP	7-9 FLHSSHA
7-11 SDSPSWL	7-10 YYMSQPA
7-12 STSTLSY	7-11 YVHPKYF
7-13 LVLPPSL	7-12 WSPLTPV
7-14 WNSAWPV	7-13 TDSRLYH
7-15 HMQATLR	7-14 IPNTPHG
7-16 GLIASTL	9-1 CSPQVGGMC
7-20 YSPTLFY	9-2 CMLQHTSDC
7-24 SLIASTL	9-3 CKLDNHQTC
9-1 CHESSNIC	9-4 CSKVMLDTC
9-2 CEPFTRTSC	9-6 CDINSMRPC
9-3 CWPTLHLSC	9-7 CSTSLTRMC
9-4 CTWSWPSSC	9-8 CPRLPPGIS
9-5 CQVADSQSC	9-10 CPLSDIQLC
9-6 CLPHTNTHC	9-11 CSQYARSMC
9-7 CYPQMQRNC	9-12 CLSLPLVPC
9-8 CYRSASQLC	9-13 CSQSRANFC
9-9 CPTTIPLAC	9-14 CDQPGRLLC
9-11 CEAAGSTSC	12-5 KNLDTTWLRSRV
9-12 CKTNMAANC	12-8 SLKTLDQTWHHY
9-13 CARPRAIKC	12-10 STKYSDATWIQM
9-14 CKNHQTASC	12-11 TMPDRAPWPLPP
9-15 CFSMSLSRC	12-12 KISFEESSC HR
9-16 CFGKLIQNC	12-13 DLVSKNLDAIWS
9-18 CHVHNWQTC	12-14 ATNATYFGRLLI
9-20 CSSLIAFKC	
12-1 HQNVAPSFPPGT	
12-2 ATNNPLFTLRL	
12-3 ATYSNSTARAPG	
12-4 SLSELHPNGLKR	
12-5 QAPGESTLLSIW	
12-6 LPTTMKIPVIFT	
12-7 APVIALKLAPIR	
12-8 EMTLGELPPARA	
12-9 TPPTHINWQVQR	
12-10 PTWNPPLRHNV	
12-11 GLISSTFEVSM	
12-12 GTQAHGRLHTHT	
12-22 YDPHVTILLALW	

\* Los números indican el tipo de biblioteca-número de clona en el cual se obtuvo la clona.

El análisis de estas secuencias demostró una homología con la región inmunodominante. La homología entre aminoácidos de las clonas seleccionadas y la región inmunodominante se muestra en rojo. Al final de cada secuencia se muestra el número de clona y el suero con el que se realizó la bioselección. Esto se observa en la tabla 10.

**Tabla 11. Homologías encontradas con la región inmunodominante de gp41 del VIH-1\*.**

---

Región inmunodominante de gp41	
I W G C S G K L I C T T A V P	
C D Q P <b>G R L I C</b>	(clona 14) Suero 13
A T N A T Y F <b>G R L I L</b>	(clona 14) Suero 13
<b>G L I A S T L</b>	(clona 16) Suero 8
<b>S L I A S T L</b>	(clona 24) Suero 8
D <b>S G T R H R</b>	(clona 2) Suero 8
S <b>T S T L S L</b>	(clona 12) Suero 8
W N S A W P V	(clona 14) Suero 8
<b>C F G K L I Q N C</b>	(clona 16) Suero 8
<b>G L I S S T F S E V S M</b>	(clona 11) Suero 8
G T Q A H <b>G R L H T H T</b>	(clona 12) Suero 8

---

\* Las homologías entre los aminoácidos de los péptidos de las clonas seleccionadas y la región inmunodominante se encuentran representadas en rojo. Entre paréntesis se encuentra el número de la clona que expresa la secuencia y posterior el número del suero utilizado con el que se obtuvo.

Con base a los resultados del análisis de secuencias se procedió a inmunizar a ratones BALB/cAnN con los fagos que expresan los péptidos con homología con la región inmunodominante de gp41 del VIH-1. Las clonas seleccionadas utilizadas para la inmunización así como los fagos control se describen en la Tabla 12. Se anexaron al experimento un fago no relacionado que expresa el péptido FHENWPS, un fago que expresa el péptido DMGPGRS. Esta secuencia contiene la secuencia GPGR, la cual es

homólogo al dominio principal de neutralización del asa V3 de gp120 y que esta involucrado en procesos posteriores a la unión con la molécula CD4 [150]. En base a estos antecedentes se pensó que pudiera funcionar como un control positivo en el experimento. Otro control utilizado fue el utilizar un fago que no desplegara péptidos, por lo cual se usó al fago M13 no recombinante. Todos estos fagos son suspendidos en una solución amortiguadora TBS, por lo que también se utilizó esta solución como otro control.

**Tabla 12. Fagos utilizados para la inmunización de ratones Balb/cAnN**

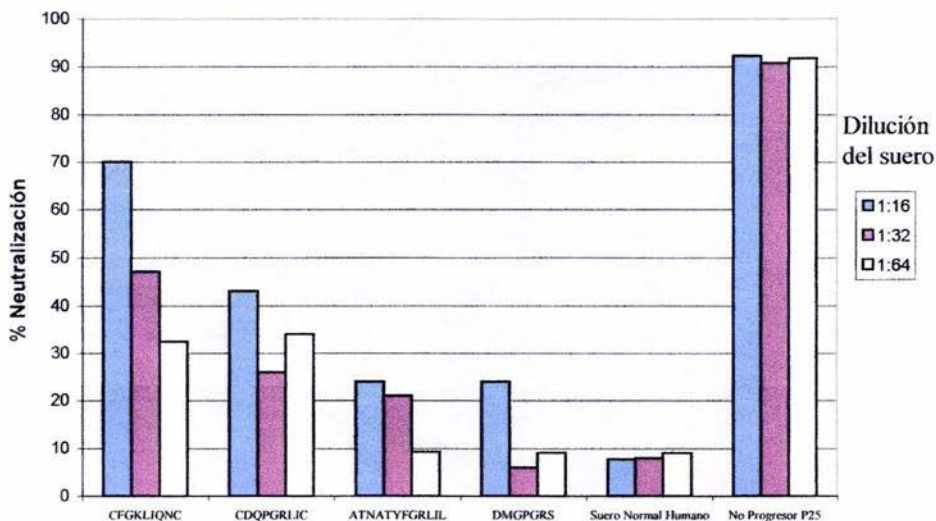
Fagos obtenidos de la Bioselección con suero 8	Fagos obtenidos de la Bioselección con suero 13
9.16 CFGKLIQNC	9-14 CDQPGRLLC
7.24 SLIASTL	12-14 ATNATYFGRLLL
7.12 STSTLSY	7-6 TSTMSTR
7.20 YSPTLFY	9-7 CSTSLTRMC
7.16 GLIASTL	

Como controles en la inmunización se utilizó lo siguiente:

Control de solución TBS	K
Control de vector M13 sin inserto	M13
Fago no relacionado (FHENWPS)	P25
Posible control + de fago (DMGPGRS)	P24

Los sueros de los ratones inmunizados fueron utilizados en ensayos de neutralización *in vitro* (ver mat. y met). Se determinó la capacidad de inhibir la formación de sincicios obteniendo los siguientes resultados mostrados en la Gráfica 4.

**Gráfica 4. Ensayo de Neutralización *in vitro* del VIH-1 MN en células MT-2 utilizando sueros de ratones inmunizados con las contrucciones en fagos.**



En este experimento se utilizó como control positivo el suero de un paciente no progresor (P25), proporcionado por el Dr. K. Ugen [83,84], del cual se obtuvo el anticuerpo monoclonal CL3 (ver página 24) que tiene una alta capacidad de neutralización. Como control negativo se utilizó suero VIH negativo humano. Como se observa el suero de los ratones inmunizados con la clona que expresa el péptido CFGKLIQNC mostró un porcentaje de neutralización de 70% con una dilución 1:16. Con la misma dilución el suero de los ratones inmunizados con la clona CDQPGRILIC mostró un 43% de neutralización. Mientras que los sueros restantes mostraron una neutralización del 24%. El suero P25 alcanzó un 92.3%. Este suero mostró un porcentaje arriba del 90% de neutralización el cualquiera de las 3 diluciones utilizadas. El resto de los sueros de ratones inmunizados no se evaluaron en este experimento debido a la restricción en el tamaño del experimento.

Al utilizar una dilución 1:32 la muestra CFGKLIQNC obtuvo una neutralización del 47%, CDQPGRILIC del 26%, ATNATYFGRLLIL del 21%, DMGPGRS del 6% y el Suero Normal Humano del 8%. Ya al utilizar la dilución 1:64 los resultados de los sueros fueron

los siguientes: CFGKLIQNC mostró un 32.4% de neutralización, CDQPGR LIC 34%, ATNATYFGR LIL 9.3%, DMGPGRS 9% y el Suero Normal Humano (SNH) obtuvo un 9%.

En la 2ª. parte de este trabajo se evaluó la antigenicidad (capacidad de ser reconocida por anticuerpos) de la región inmunodominante desplegada en la superficie de el fago filamentoso M13. Esto se hizo mediante el análisis del reconocimiento de sueros VIH + hacia esta región. Para esto se clonó la región inmunodominante de gp41 del VIH-1 (IWGCSGKLICTTAV) en la pIII o pVIII haciendo sustituciones alternadas de las cisteínas por alaninas para eliminar la presencia del asa en esta región, con lo cual se obtuvieron 3 secuencias diferentes GCSGKLICTTAV, GASGKLICTTAV y GCSGKLIATTAV las cuales se clonaron en la pIII o en la pVIII. Para poder clonar en la pIII se utilizó el vector M13KE. El protocolo de clonación se resume en la figura 7.

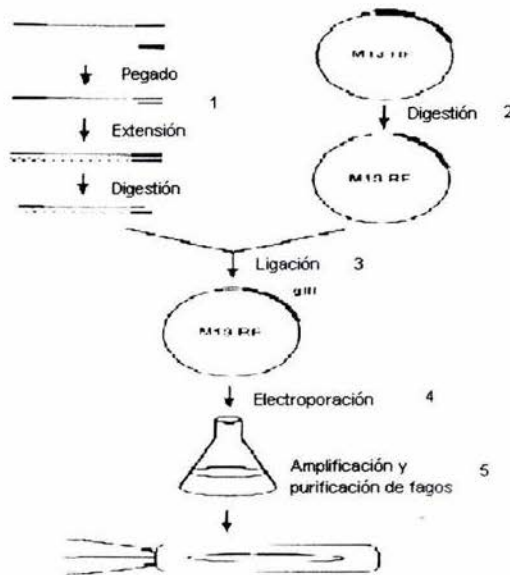


Figura 7. Diagrama de clonación de la región inmunodominante en el vector M13KE

Este protocolo se utilizó para obtener cada una de las construcciones hechas para la expresión del inserto en la pIII. Con esta estrategia se obtienen 5 copias del péptido clonado en la superficie del fago, ya que es el número de copias que hay de la pIII en cada fago. A este tipo de despliegue o clonación se le llamó “en baja copia”. Se obtuvieron 3 construcciones diferentes, a cada construcción se le identificó de manera diferente ya que cada una expresa insertos diferentes.

E1: GCSGKLICTTAV

E2: GASGKLICTTAV

E3: GCSGKLIATTAV

Como se aprecia, las 3 construcciones son diferentes en la posición de las cisteínas, ya que se diseñaron los oligos para obtener este tipo de sustituciones por alanina.

Las construcciones hechas para la pVIII se obtuvieron mediante otro protocolo, descrito en material y métodos. Con este procedimiento se expresan en la superficie de cada fago aproximadamente unas 800 copias del péptido en la superficie del fago. Debido a las características de despliegue del inserto, a este tipo de construcciones se les llamó “en alta copia”. Las construcciones se identificaron de la siguiente manera:

45: GCSGKLICTTAV

67: GASGKLICTTAV

89: GCSGKLIATTAV

A las construcciones en alta y baja copia que expresan a la región inmunodominante con sus 2 cisteínas se les llamó “en forma cíclica” mientras que aquellas en donde existen las sustituciones por alanina se les llamó “en forma lineal”. Cada una de las clonas obtenidas (E1, E2, E3, 45, 67 y 89) fueron secuenciadas para confirmar la clonación del inserto.

Posteriormente se utilizaron las construcciones en baja y en alta copia que expresan a la región inmunodominante en una forma cíclica en ensayos de ELISA con un panel de 63 sueros VIH + y con 5 sueros normales. En este ensayo 62 de los 63 sueros demostraron la reactividad hacia la construcción cíclica en alta copia (45C-C). Ninguno de estos sueros reaccionaron con el fago control M13. Además los sueros VIH negativos no reaccionaron

con ninguna construcción ni con el fago control M13. Los resultados se muestran en la tabla 13.

**Tabla 13. Porcentaje de sueros VIH+ que reaccionan con las construcciones.**

Construcción	Sueros VIH+	
E1C-C	62/63	98.4%
E2A-C	9/63	14.3%
E3C-A	3/63	4.8%
45C-C	62/63	98.4%
67A-C	11/63	17.5%
89C-A	19/63	30.2%

Los sueros VIH + reaccionaron con las construcciones cíclicas en un mayor porcentaje (arriba del 98 %). Sin embargo con las construcciones lineales fueron menos sensibles ya que con E2 reaccionaron 9 de 63 sueros (14.3%) y con E3 solo 3 de 63 (4.8%). En comparación con las construcciones lineales en alta copia con la construcción 67A-C reaccionaron 11 de 63 sueros (17.5%) y con la construcción 89C-A reaccionaron 19 de 63 (30%). Ninguno de los sueros controles reaccionaron con ningún tipo de fago.

ELISA con  $\beta$ -mercapto etanol. Este tipo de ELISA se realizó para evaluar si la conformación cíclica de la región inmunodominante de gp41 influye en el reconocimiento de los sueros VIH+. Para estudiar esto se clonó la región inmunodominante en las pIII y pVIII de el fago filamentoso M13. Pocos sueros VIH+ reaccionaron con las construcciones lineales. Para eliminar la posibilidad de que el reconocimiento fuera dado por la existencia de enlaces disulfuro entre 2 cisteínas de las proteínas recombinantes cercanas se realizó un ELISA con las construcciones y el uso de 2ME etanol para eliminar los enlaces disulfuro presentes y esclarecer la presencia de anticuerpos que reconozcan a la región inmunodominante de gp41 en una forma lineal.

Los resultados obtenidos mostraron una disminución en la unión de los anticuerpos presentes en los sueros hacia los péptidos expresados en fagos. Esto es debido a la eliminación de los enlaces disulfuro reconocidos por los anticuerpos presentes en los sueros evaluados. Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición de reconocimiento (materiales y métodos), los cuales se muestran en la Tabla 14. Los valores indican que un valor menor en el porcentaje de inhibición (menor al 30%) indica que el reconocimiento observado hacia la construcción 45C-C está dada por anticuerpos que reconocen una conformación lineal y en consecuencia un valor alto (mayor al 70%) indica que el reconocimiento está dado por la presencia de anticuerpos anti-conformación cíclica.

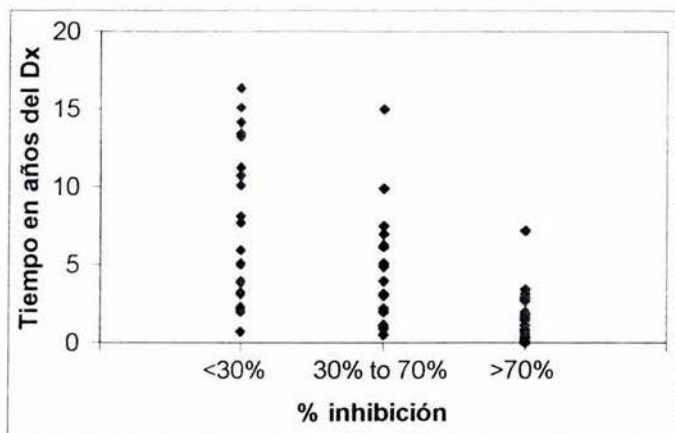
**Tabla 14. Valores obtenidos en el porcentaje de inhibición de unión de sueros VIH+ hacia la construcción 45C-C en presencia de  $\beta$ -mercapto etanol**

Inhibición de reconocimiento	Número de sueros	Grupos de sueros		
		1 (CD4: menor a 200)	2 (CD4: 200-400)	3 (CD4: mayor a 400)
Menor al 30%	23	4	3	16
30 – 70%	20	9	3	8
Mayor al 70%	19	3	10	6

El reconocimiento de la región inmunodominante en forma lineal en alta copia es inhibido en 19 de 62 sueros en más de un 70%, en 20 de 62 sueros fue inhibido en un rango que va del 30 al 70%, y en 23 de 62 sueros el reconocimiento fue inhibido en no más de un 30%. En éste último grupo 7 sueros mostraban un reconocimiento que no cambiaba en presencia o ausencia  $\beta$ -mercapto etanol, lo cual indica que la mayoría de los anticuerpos reconocen una conformación lineal. También se observa que el mayor número de sueros, 16 de 23, en este valor pertenecen al grupo de pacientes 3 (cuentas de CD4 mayores a 400, mat. y méts.) Por lo que se hizo una correlación entre inhibición de reconocimiento y tiempo de diagnóstico de los sueros obteniendo los siguientes resultados mostrados en la Gráfica 5.



Gráfica 5. Correlación entre la inhibición de la unión de sueros VIH+ con la construcción 45C-C y el tiempo de diagnóstico ( $P<0.01$ .)



En esta correlación se observa que la mayor inhibición de reconocimiento en presencia de  $\beta$ -mercapto etanol se obtuvo cuando los pacientes tienen menos de 5 años de infección ( $P<0.01$ ). Este resultado confirma la hipótesis de que los no progresores tienen anticuerpos dirigidos contra la región inmunodominante en una conformación lineal como se había reportado en los trabajos previos del monoclonal Clona 3 [83, 84].

Los resultados obtenidos respecto a la construcción 67A-C están reportados en la Tabla 15.

**Tabla 15. Valores obtenidos en el porcentaje de inhibición de unión de sueros VIH+ hacia la construcción 67A-C en presencia de  $\beta$ -mercapto etanol**

Inhibición de reconocimiento	Número de sueros	Grupos de sueros		
		1 (CD4: menor a 200)	2 (CD4: 200-400)	3 (CD4: mayor a 400)
Menor al 30%	7	1	2	4
30 – 70%	0	0	0	0
Mayor al 70%	4	3	0	1

El reconocimiento hacia la construcción 67A-C fue inhibido en más de un 70% en 4 de los 11 sueros positivos en este experimento, estos 4 sueros fueron inhibidos en un 100%. En 7 sueros se inhibió su reconocimiento en menos de un 30%. De estos 7 sueros 5 no mostraron cambio en los valores de reconocimiento de los sueros hacia la construcción en presencia o ausencia de  $\beta$ -mercapto etanol.

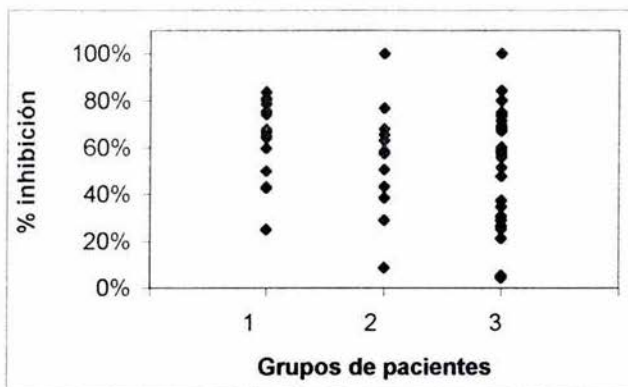
Para la construcción 89C-A, ver Tabla 16, se obtuvo una inhibición del reconocimiento en un 100% en 3 de 19 muestras y en menos de un 30% en 9 muestras, 4 sueros de estos 9 muestras mostraron el mismo reconocimiento en presencia o ausencia de  $\beta$ -mercapto etanol.

**Tabla 16. Valores obtenidos en el porcentaje de inhibición de unión de sueros VIH+ hacia la construcción 89C-A en presencia de  $\beta$ -mercapto etanol**

Inhibición de reconocimiento	Número de sueros	Grupos de sueros		
		1	2	3
Menor al 30%	9	3	3	3
30 – 70%	7	4	1	2
Mayor al 70%	3	0	2	1

ELISA DE COMPETENCIA. Para comparar las propiedades antigénicas de la región inmunodominante en el contexto de péptido sintético y en la forma de despliegue sobre fagos, se realizó una ELISA de competencia.

**Gráfica 6. ELISA de competencia. Inhibición de la unión de la construcción 45 (C-C) con sueros VIH+ mediante el uso del péptido sintético GM15**



Como se muestra en la Gráfica 6, el péptido sintético GM15 (IWGCSGKLICTTAVP) tuvo la capacidad de inhibir la unión de los anticuerpos a la región inmunodominante expresada en la construcción 45 (C-C) en algunos sueros (43 de 62 sueros, es decir el 69.3 %, se inhibió el reconocimiento en más del 50%). No se encontraron diferencias entre los 3 grupos de pacientes evaluados en la ELISA de competencia. Posiblemente esta persistencia en el reconocimiento se deba a alguna reacción cruzada de anticuerpos dirigidos contra otros antígenos.

## 6. DISCUSIÓN

Los tratamientos reportados para el uso en SIDA no han brindado los resultados deseados [151-154]. Diferentes causas dificultan este logro teniendo entre ellos la alta variabilidad del virus, su estructura oligomérica compleja, la diversidad genética que tienen los individuos infectados y los altos costos de producción.

La conformación de cada virión es única y un solo virión de entre 1,000 a 10,000 es infectivo. Los trímeros de las glicoproteínas de envoltura, aproximadamente 72, liberan a gp120 y esto genera el despliegue de epítomos de gp41 en conformaciones inmunogénicamente irrelevantes [155]. En el proceso infectivo virus-célula el sistema inmune reacciona en contra de epítomos importantes y su identificación se ha usado en inmunizaciones pasivas y activas en monos [156-159] y chimpancés [160]. En los humanos esto se observa en los progresores lentos, ya que presentan anticuerpos neutralizantes en contra de aislados primarios así como en contra de virus autólogos [109,115,116] y esto está asociado a la no progresión [98,107]. Esta región es altamente conservada en la mayoría de los retrovirus [81] lo que hace pensar que tenga una función importante en el ciclo de vida del virus.

En el proceso de infección de una célula permisible por el VIH-1 existe una interacción de gp120 con el receptor (CD4), posteriormente con el coreceptor (que son los receptores de quimiocinas). Todo esto causa una serie de cambios conformacionales en gp41, Figuras 3 y 4, en donde existen 2 regiones  $\alpha$ -hélice, una amino y otra carboxilo terminal, las cuales interaccionan para permitir que el péptido fusión quede expuesto y pueda penetrar la membrana celular [69]. Esta interacción de las  $\alpha$ -hélices pudiera generar un cambio en la conformación de la región inmunodominante de gp41. Es posible que esta región inmunodominante funcione como una región bisagra (RB) que permita la interacción de las regiones  $\alpha$ -hélices y que al permitir esta interacción adquiera una conformación similar a la lineal. Todos estos procesos son dinámicos que duran aproximadamente de 1 a 4 minutos [69], y esto explicaría el por qué la mayoría de los pacientes VIH+ no presenta anticuerpos dirigidos contra esta región. Y aquellos que presentan anticuerpos que reconocen esta

conformación presenten un retraso en el desarrollo de la enfermedad, debido a que se impide la interacción entre las 2 regiones  $\alpha$ -hélice de gp41.

En el presente trabajo se analizaron las propiedades antigénicas e inmunogénicas de la región inmunodominante de gp41 poniendo mayor énfasis en la asa comprendida por las 2 cisteínas. Esto se estudió mediante el uso de fagos filamentosos considerando las siguientes ventajas: la posibilidad de evaluar una gran variedad de péptidos simultáneamente y seleccionar aquellos de mayor relevancia, la posibilidad de desplegar los péptidos en la superficie de los fagos además de que la capacidad de producción es rápida y barata. Finalmente el contexto en el cual se utilizan los péptidos para su uso en los ensayos de ELISA ofrece una gran ventaja ya que se puede mantener la conformación similar a la que presenta el VIH.

La identificación de los epítomos/mimótopos de sueros de pacientes VIH + de una manera fácil y rápida se realizó mediante el uso de bibliotecas comerciales de péptidos expresados en fagos filamentosos. Esta metodología permite seleccionar entre una alta diversidad de péptidos ( $10^9$ ) de una manera rápida y barata. Mediante una serie de rondas de bioselección se va enriqueciendo la selección de éstos péptidos. El suero 13 se seleccionó debido a las características clínicas de los pacientes y en el caso del suero 8 fue el único que reaccionó en ELISA hacia la región inmunodominante en una forma lineal. Esto se observa también con el monoclonal neutralizante CL3 que reconoce su epítopo cuando el péptido es reducido con 2ME [84]. Después de realizar las 3 rondas de bioselección, se realizó un análisis de las secuencias y se observó que algunas clonas presentaban homología con la región inmunodominante de gp41. Esto no es de sorprender ya que la mayoría de las personas infectadas con VIH presentan anticuerpos dirigidos contra esta región [30,72,73]. El resto de las secuencias no mostraba homología con el VIH ni con algún otro agente patógeno. Estas secuencias se pueden considerar mimótopos de antígenos reconocidos por inmunoglobulinas IgG presentes en el suero de los pacientes utilizados para la bioselección pero que tal vez no sean dirigidos en contra del VIH.

Posteriormente se utilizaron estos fagos como inmunógenos en ratones BALB/cAnN y se observó que el suero de los ratones inmunizados con la clona que expresa la secuencia CFGKLIQNC obtuvo un 70% de neutralización. Los sueros utilizados en este ensayo son sueros hiperinmunes. En un trabajo previo Scala y col. [137] purifican IgG's de sueros hiperinmunes de ratones y los utilizan en ensayos de neutralización obteniendo porcentajes superiores al 75% para las cepas de VIH<sub>III</sub>B y NL4-3. Además inmunizan macacos para evaluar el efecto de los anticuerpos y obtienen bajos niveles de virus en 4 de 5 monos utilizados[159]. Esto hace pensar que la clona obtenida en nuestra bioselección podría tener un efecto neutralizante mayor debido a que el suero de ratón utilizado en mis experimentos de neutralización no tenía modificación alguna y si se purifican las IgG's presentes en este suero el efecto neutralizante se pudiera aumentar y ser considerada para el diseño de biomoléculas para el tratamiento del VIH. El poder aumentar la capacidad de neutralización hacia un número mayor de cepas de VIH se basa en el reporte de la producción de anticuerpos neutralizantes hacia nuevas variantes del virus de la hepatitis C (VHC) mediante la inmunización con mimótopos de la región hipervariable 1 del VHC. [161]

El péptido CFGKLIQNC (que se obtuvo en la bioselección con el suero 8 y se utilizó para inmunizar ratones generando un 70% de neutralización en ensayos *in vitro*) está expuesto de 3 a 5 copias en cada fago y en un contexto en el cual puede mantener una conformación capaz de inducir la producción de anticuerpos con actividad neutralizante. Sin embargo, brindaría información importante la evaluación de este péptido en construcciones en alta copia para analizar sus características inmunogénicas, ya que estas se podrían variar si se expresa en la pIII o en la pVIII. Con estos cambios, de ser expresado en alta copia, sería importante evaluar si la cantidad y capacidad neutralizante de los anticuerpos inducidos cambiaría.

Para el estudio de las propiedades antigénicas de la región inmunodominante de gp41 se tomaron en cuenta características como el alto número de personas infectadas que presentan anticuerpos dirigidos contra esta región así como su alto porcentaje de conservación.

Esta reportado que la conformación que pueda adquirir la RID es importante para el reconocimiento de anticuerpos monoclonales [163]. Aunque existen reportes en donde se menciona que la ausencia de la cisteína, ya sea la amino o carboxilo, no influye en el reconocimiento [72,164] pero en otro estudio se reporto que la sustitución de éstas por serinas causa una disminución en el reconocimiento de sueros VIH + [162].

En base a lo anterior se clonó la región inmunodominante en la pIII y pVIII para tener bajo y alto despliegue (5 copias y 800 copias respectivamente) en los fagos. También se hicieron sustituciones a las cisteínas presentes en la región inmunodominante por alaninas para poder determinar que función desempeña el asa y las mismas cisteínas.

Los resultados obtenidos mediante ELISA de los sueros VIH + muestran un reconocimiento de 62 sueros de los 63 evaluados (98.4%) hacia la región inmunodominante en forma cíclica. Además los sueros VIH negativos no reaccionaron ni con las construcciones ni con el fago sin inserto. Sin embargo evaluando los 2 formatos de ELISA se obtienen mejores resultados para las construcciones en alta copia, esto debido a que el protocolo es más rápido, sencillo y las lecturas obtenidas son mayores que con el formato para baja copia. Al evaluar las construcciones lineales (2 en alta copia y 2 en baja copia) fueron reconocidas de un 4 al 30% por los sueros VIH+. Estos resultados coinciden con los reportados por Oldstone y Gershoni [78,162]. Para excluir la posibilidad de que las lecturas positivas se debieran a interacciones de cisteínas intracatenarias, es decir con proteínas cercanas [165], se decidió utilizar 2ME para eliminar los puentes disulfuro existentes. Al evaluar nuevamente las ELISAS no se encontró cambio alguno, el 30% de los sueros seguía reaccionando con las construcciones. Esto hace pensar que la persona de la cual se obtuvo el MoAb CL3, que reconoce a la región inmunodominante de gp41 en presencia de  $\beta$ -mercapto etanol [83,84], presenta anticuerpos que reconocen esta conformación. Los resultados muestran además una correlación entre la ausencia de anticuerpos anti péptidos lineales y poco tiempo de infección. Esto confirma la hipótesis de que los progresores lentos producen anticuepos anti-RID como el MoAb CL3 [83,84].

Todo esto nos hace pensar que en el proceso de fusión, posterior a la interacción entre las 2  $\alpha$ -hélices de gp41, la región inmunodominante funciona como una RB, y que en un cierto momento adquiere una conformación similar a la de los péptidos lineales. En este proceso dinámico, algunas personas infectadas reconocen esta conformación y pueden generar anticuerpos con una capacidad neutralizante. Todo esto se podría ver reflejado en el control de la infección.

También es importante mencionar que en los juegos de diagnóstico, tanto de VIH como para otras enfermedades, su costo elevado se debe a la dificultad de producción de los reactivos, en referencia a los péptidos sintéticos y/o proteínas recombinantes. Una desventaja de los péptidos sintéticos es su débil pegado en las placas de ELISA así como la dificultad de mantener una conformación nativa. Mediante el uso de ésta poderosa tecnología, PhD, se pueden eliminar estos problemas. Además de poder manejar cantidades de péptido de acuerdo a las necesidades, es decir fusionados a la pIII o pVIII. Está el antecedente del uso de los MAP's (Múltiple Antigenic Peptides) [166], sin embargo el despliegue en alta copia en fagos ofrece los mismos beneficios y de una manera mas rápida y barata que el MAP. Hay que mencionar que el uso de estos productos no afecta la reproducibilidad de los ensayos.

Con todos estos beneficios en un futuro los péptidos sintéticos y proteínas recombinantes pudieran ser desplazados por nuevas biomoléculas, como las expresadas en fagos, debido a las grandes ventajas que aportan.



## 7. CONCLUSIONES

En este proyecto se evaluaron las características inmunogénicas y antigénicas de la región inmunodominante de gp41 del VIH-1 expresadas en la superficie de fagos filamentosos. De esta investigación se puede concluir lo siguiente:

- Se confirmó la presencia de anticuerpos anti región inmunodominante de gp41 del VIH-1 en sueros humanos mexicanos VIH+.
- Con el uso de “Phage display” es posible seleccionar diferentes péptidos análogos de la región inmunodominante de gp41. Al utilizar estos péptidos como inmunógenos en ratones generan la producción de anticuerpos que al ser evaluados en ensayos *in vitro* muestran hasta un 70% de inhibición de producción de sincicios.
- Se demostró que la región inmunodominante, expresada en la superficie de fagos filamentosos, mantiene las propiedades antigénicas y puede utilizarse en pruebas de inmunodiagnóstico. Los antígenos expresados en fagos filamentosos tienen ventajas en comparación con otras formas alternativas (péptidos sintéticos, proteínas recombinantes) que pueden ser de interés para los países en vías de desarrollo.
- La presencia de anticuerpos en sueros de personas VIH+ que reconocen a la región inmunodominante de gp41 del VIH-1 en una forma lineal está correlacionada con un mayor tiempo de infección por el VIH-1.

## 8. PERSPECTIVAS

La clona obtenida en la bioselección con el suero 8 y que expresa la secuencia CFGKLIQNC puede ser utilizada en más ensayos de inmunización haciéndole modificaciones como la de ser clonada en la pVIII del fago M13 para poder evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos que genere.

Los antígenos, como la región inmunodominante de gp41 del VIH-1, expresados en la superficie de fagos filamentos podrían continuar evaluándose utilizando bancos de sueros VIH+ más numerosos para poder ser utilizados en el desarrollo de nuevas pruebas de inmunodiagnóstico de menor costo.

## 9. REFERENCIAS

1. Kaposi's sarcoma and pneumocystis pneumonia among homosexual men – New York City and California. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 30, 305-308 (1981).
2. Pneumocystis pneumonia – Los Angeles. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 30, 250-252. (1981).
3. UNAIDS Questions & Answers. Basic facts about the AIDS epidemic and its impact. July 2004. [www.unaids.org/wad/2003Epiupdate2003\\_sp/Epi03\\_11\\_sp.htm#TopOfPage](http://www.unaids.org/wad/2003Epiupdate2003_sp/Epi03_11_sp.htm#TopOfPage)
4. Secretaria de Salud. Centro Nacional para la prevención y control de VIH/SIDA. Epidemiología del VIH/SIDA en México en el año 2003. [www.salud.gob.mx/conasida/](http://www.salud.gob.mx/conasida/)
5. Curran JW, Jaffe HW, Hardy AM, Morgan WM, Selik RM, and Dondero TJ. Epidemiology of HIV infection and AIDS in the United States. *Science* 1988;239:610–616.
6. George S, Jacob M, John TJ, et al. A case-control analysis of risk factors in HIV transmission in South India. *J AIDS Hum Retrovir* 1997;14:290–293.
7. Dickerson MC, Johnston J, Delea TE, White A, and Andrews E. The causal role for genital ulcer disease as a risk factor for transmission of human immunodeficiency virus. An application of the Bradford Hill criteria. *Sex Transm Dis* 1996;23:429–440.
8. Tyndall MW, Ronald AR, Agoki E., Malisa, W., Bwayo, J. J., Ndinja/Achola, J. O., Moses, S. and Plummer, F. A. Increased risk of infection with human immunodeficiency virus type 1 among uncircumcised men presenting with genital ulcer disease in Kenya. *Clin Infect Dis* 1996;23:449–453.
9. Bassett MT, McFarland WC, Ray, S., Mbizvo, M. T., Machezano, R., Van de Wijgert, J. H. and Katsenstein, D. A. Risk factors for HIV infection at enrollment in an urban male factory cohort in Harare, Zimbabwe. *J AIDS Hum Retrovir* 1996;13:287–293.
10. Rodrigues JJ, Mehendale SM, Shepherd M. E., Divekar, A. D., Gangakhedkar, R. R., Quinn, T. C., Paranjape, R. S., Risbud, A. R., Brookmeyer, R. S., Gadkari, D. A., et al. Risk factors for HIV infection in people attending clinics for sexually transmitted diseases in India. *Br Med J* 1995;311:283–286.
11. Hayes RJ, Schulz K. F. and Plummer, F.A. The cofactor effect of genital ulcers on the per-exposure risk of HIV transmission in sub-Saharan Africa HIV-1 seroconversion in patients with and without genital ulcer disease. A prospective study. *J Trop Med Hyg* 1995;98:1–8.
12. Eigen, M., and Nieselt-Struwe, K. How old is the immunodeficiency virus?. *AIDS* 1990; 4:S85-S93.
13. Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, L. O., Peeters, M., Shaw, G. M., Sharp, P. M. and Hahn, B. H. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*. 1999; 397:436-441.
14. Coffin, J.M. Structure and classification of retroviruses. *The Retroviridae*. (Levy JA. Ed). Vol. 1. Plenum Press, New York, 1992. p. 19-50
15. Haase, A.T. Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature (London)* 1986; 322:130-136.
16. Ancelle, R., Bletry, O., Baglin, A.C., Brun-Vezinet, F., Rey, M.A. and Godeau, P. Long incubation period for HIV-2 infection. *Lancet*. 1987; 1:688-689.
17. Pepin, J., Morgan, G., Dunn, D., Gevao, S., Mendy, M., Gaye, I., Scollen, N., Tedder, R. and Whittle, H. HIV-2-induced immunosuppression among asymptomatic West African prostitutes: evidence that HIV-2 is pathogenic, but less so than HIV-1. *AIDS*. 1991; 5:1165-1172.
18. Clavel, F., Mansinho, K., Chamaret, S., Guetard, D., Favier, V., Nina, J., Santos-Ferreira, M. O., Champalimaud, J. L. and Montagnier, L. Human immunodeficiency

- virus type 2 infection associated with AIDS in West Africa. *N. Engl. J. Med.* 1987; 316:1180-1185.
19. Gnann, J. W., McCormick, Jr., J. B., Mitchell, S., Nelson, J. A. and Oldstone, M.B.A. Synthetic peptide immunoassay distinguishes HIV type 1 and HIV type 2 infections. *Science.* 1987; 237:1346-1349.
  20. Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, R., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A. G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Champalimaud, J. L. and Montagnier, L. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science.* 1986; 233:343-346.
  21. Coffin, J., Haase, A., Levy, J. A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P. and Weiss, R. Human immunodeficiency viruses. *Science.* 1986; 232:697. (Letter).
  22. Guyader, M., Emerman, M., Sonigo, P., Clavel, F., Montagnier, L. and Alizon, M. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature.* 1987; 326: 662-669.
  23. Leitner T. Genetic subtypes of HIV-1. In: Myers G, Foley B, Mellors J, Korber B, Jeang K, and Wain-Hobson S, eds. *Human retroviruses and AIDS 1996.* Los Alamos, NM: Los Alamos National Laboratory, 1996:28-40.
  24. Wainberg, M. A. HIV resistance to antagonists of viral reverse transcriptase. In: *HIV and the new viruses.* (Dalglish, A. and Weiss, R. Ed.). 2a. Ed. Academic Press, San Diego, 1999, p. 223-250
  25. Coffin, J.M., Hughes, S.H and Varmus, H. E. *Retroviruses.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. p. 121-160.
  26. Earl, P.L., Doms, R.W. and Moss B. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc. Natrl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87:648-652.
  27. Gelderblom, H.R., Ozel, M. Hausmann, E.H.S., Winkel, T., Pauli, G. and Koch, M. A. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) immunolocalization of structural proteins and virus-cell retraction. *Micron Microscop.* 1988; 19:41-60.
  28. Ozel, M., Pauli, G. and Gelderblom, H.R. The organization of the envelope projections on the surface of HIV. *Arch. Virol.* 1988; 100:255-266.
  29. Pinter, A., Honnen, W.J., Tilley, S.A., Bona, C., Zaghouni, H., Gorny, M.K. and Zolla-Pazner, S. Oligomeric structure of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 1989; 63:2674-2679.
  30. Weiss, C.D., Levy, J.A. and White, J.M. Oligomeric organization of gp120 on infectious human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol.* 1990; 64:5674-5677.
  31. Wyatt, R. and Sodroski, J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens and immunogens. *Science.* 1998; 280:1884-1888.
  32. Wei, P., Garber, M.E., Fang, S. M., Fischer, W.H. and Jones, K.A. A novel CDK9-associated C-Type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell.* 1998; 92:451-462.
  33. Camaur, D. and Trono, D. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation. *J. Virol.* 1996; 70:6106-6111.
  34. Ou, S.H.I., and Gaynor, R. B. Intracellular factors involved in gene expression of human retroviruses. *The Retroviridae*, vol. 4. Plenum Press, New York. 1995. p. 97-187.
  35. Peterlin, B.M. Molecular biology of HIV. *The Retroviridae*, vol. 4. Plenum Press, New York. 1995. p. 185-238.
  36. Hanna, Z., Kay, D. G., Rebai, N., Guimond, A., Jothy, S. and Jolicoeur, P. Nef harbors a major determinant of pathogenicity for and AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell.* 1998; 95:163-175.

37. Cullen, B.R. HIV-1 auxiliary proteins: Making connections in a dying cell. *Cell*. 1998; 93:685-692.
38. Emerman, M. and Malim, M.H. HIV-1 Regulatory/Accessory genes: Keys to unraveling viral and host cell biology. *Science*. 1998; 280:1880-1884.
39. Dalgleish, A.G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F. and Weiss, R. A. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. 1984; 312: 763-767.
40. Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J. C. and Montagnier, L. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*. 1984; 312:767-768.
41. Capon, D.J. and Ward, R.H. The CD4-gp120 interaction and AIDS pathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 1991; 9:649-678.
42. Sweet, R. W., Truneh, A. and Hendrickson, W. A. CD4: its structure, role in immune function and AIDS pathogenesis, and potential as a pharmacological target. *Curr. Opin. Biotech.* 1991; 2:622-633.
43. Cordonnier, A., Montagnier, L. and Emerman, M. Single amino-acid changes in HIV envelope affect viral tropism and receptor binding. *Nature*. 1989; 340: 571-574.
44. Olshesky, U., Helseth, E., Furman, C., Li, J., Haseltine, W. and Sodroski, J. Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 aminoacids important for CD4 receptor binding. *J. Virol.* 1990; 64: 5701-5707.
45. Sattentau, Q.J., and Moore, J.P. Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J. Exp. Med.* 1991; 174:407-415
46. Schultz, T. F., Jameson, B. A., Lopalco, L., Siccardi, A. G., Weiss, R. A. and Moore, PI Conserved structural features in the interaction between retroviral surface and transmembrane glycoproteins. *AIDS. Res. Hum Retro.* 1992; 8:1571-1580.
47. Fauci, A.S. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature*. 1996; 384: 529-534.
48. D'Souza, M. P. and Harden, V. A. Chemokines and HIV-1 second receptors. Confluence of two fields generates optimism in AIDS research. *Nat. Med.* 1996; 2:1293-1300.
49. Chesebro, B., Buller, R., Portis, J and Wehrly, K. Failure of human immunodeficiency virus entry and infection in CD4-positive human brain and skin cells. *J. Virol.* 1990; 64:215-221.
50. Tersmette, J., Van Dongen, J.J.M., Clapham, P. R., De Goede, R. E. Y., Wolvers-Tettero, I. L. M., Van Kessel, A.G., Huisman, J. G., Weiss, R. A. and Miedema, F. Human immunodeficiency virus infection studied in DC4-expressing human-murine T-cell hybrids. *Virol.* 1989; 168:267-273.
51. Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P. and Berger, E. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. 1996; 272:872-877.
52. Kozak, S. L., Platt, E. J., Madani, N., Ferro, F. E., Peden K. and Kabat, D. CD4, CXCR-4, and CCR-5 dependencies for infections by primary patient and laboratory-adapted isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 1997; 71:873-882.
53. Berson, J. F., Long, D., Doranz, B. J., Rucker, J., Jirik, F. R. and Doms, R. W. A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J. Virol.* 1996; 70:6288-6295.
54. Doranz, B. J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R. J., Samsom, M., Peiper, S. C., Parmentier, M., Collman, R. G. and Doms, R. W. A dual-tropic primary HIN-1 isolate that uses fusin and the  $\beta$ -chemokine receptors CKR-5, CKR-3, AND CKR-2b as fusion cofactors. 1996; 85: 1149-1158.

55. Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M. and Berger, E.A. CC-CKR-5: a RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*. 1996; 272:1955-1958.
56. Berger, E. A. HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection. *AIDS*. 1997; 11: s3-s16.
57. Simmons, G., Wilkinson, D., Reeves, J. D., Dittmar, M., Beddows, S., Weber, J., Carnegie, G., Desselberger, U., Gray, P. W., Weiss, R. A. and Clapham, P. R. Primary syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 isolates are dual-tropic and most can use either Lestr or CCR5 as coreceptors for virus entry. *J. Virol*. 1996; 70:8355-8360.
58. Speck, R.F., Wehrly, K., Platt, E. J., Atchison, R. E., Charo, I. F., Kabat, D., Chesebro, B. and Goldsmith, M. A. Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop. *J. Virol* 1997; 71: 71-36-7139.
59. Chang, D. K., Cheng, S. F. and Chien, W. J. The amino-terminal fusion domain peptide of human immunodeficiency virus type 1 gp41 inserts into the sodium dodecyl sulfate micelle primarily as a helix with a conserved glycine at the micelle-water interface. *J. Virol*. 1997; 71:6593-6602
60. Bullough, P. A., Hughson, F. M., Skehel, J. J. and Wiley, D. C. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature*; 1994:371:37-43.
61. Fass, D., Harrison, S. C. and Kim, P. S. Retrovirus envelope domain at 1.7 angstrom resolution. *Nat. Struct. Biol*. 1996; 3:465-469.
62. Kobe, B., Center, R. J., Kemp, B. E. and Pombourios. Crystal structure of human T cell leukemia virus type 1 gp21 ectodomain crystallized as a maltose-binding protein chimera reveals structural evolution of retroviral transmembrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96:4319-4324.
63. Malashkevich, V. N., Schneider, B. J., McNally, M. L., Milhollen, M. A., Pang, J. X. and P. S. Kim. Core structure of the envelope glycoprotein GP2 from Ebola virus at 1.9-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96:2662-2667.
64. Baker, K. A., Dutch, R. E., Lamb, R. A. and Jardetzky, T. S. Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion. *Mol. Cell.* 1999; 3:309-319.
65. Zhao, X., Singh, M., Malashkevich, V. N. and Kim, P. S. Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97:14172-14177.
66. Buzko, O. V. and Shokat, K.M. Blocking HIV entry. *Nat. Struct. Biol*. 1999; 6:906-908.
67. Trivedi, V.D., Cheng, S-F., Wu, C-W., Karthikeyan, R., Chen, C-J. and Chang, D-K. The LLSGIV stretch of the N-terminal region of HIV-1 gp41 is critical for binding to a model peptide, T20. *Prot. Engin*. 2003; 16:311-317.
68. Koshiba T. and Chan, D.C. The prefusogenic intermediate of HIV-1 gp41 contains exposed C-peptide regions. *J. Biol. Chem*. 2003; 9:7573-7579.
69. Chan, D.C. and Kim, P. S. HIV entry and its inhibition. *Cell*. 1998; 93:681-684.
70. Gnann, J. W. Jr., Nelson, J. A. and Oldston, M. B. Fine mapping of an immunodominant domain in the transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J. Virol* 1987; 61:2639-2641.
71. Gnann, J. W. Jr., Schwimbeck, P. L., Nelson, J. A., Truax, A.B., and Oldstone, M.B. Diagnosis of AIDS by using a 12-amino acid peptide representing an immunodominant epitope of the human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis*. 1987, 156:261-267.
72. Närvänen, A., Korkkolainen, M., Suni, J., Korpela, J., Kontio, S., Partanen, P., Vaheri, A. and Huhtala, M. Synthetic env gp41 peptide as a sensitive and specific diagnostic reagent

- in different stages of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Med. Virol.* 1988; 26:111-118.
73. Gevorkian, G., Soler, C., Viveros, M., Padilla, A., Govezensky, T. and Larralde C. Serologic reactivity of a synthetic peptide from human immunodeficiency virus type 1 gp41 with sera from a Mexican population. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 1996; 6:651-653.
  74. Eberle, J., Loussert-Ajaka, I., Brust, S., Zekeng, L., Hauser, P. H., Kaptue, L., Knapp, S., Damond, F., Saragosti, S., Simon, F. and Gurtler, L. G. Diversity of the immunodominant epitope of gp41 of HIV-1 subtype O and its validity for anti body detection. *J. Virol. Methods.* 1997; 67:85-91.
  75. Dorn, J., Masciotra, S., Yang, C., Downing, R., Biryahwaho, B., Mastro, T. D., Nkengasong, J., Pieniasek, D., Rayfield, M. A., Hu, D. J. and Lal R. B. Analysis of genetic variability within the immunodominant epitopes of envelope gp41 from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M and its impact on HIV-1 antibody detection. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38:773-780.
  76. Robinson, W. Jr., Kawamura, T., Gorny, M. K., Lake, D., Xu, J. Y., Matsumoto, Y., Sugano, T., Masuho, Y., Mitchell, W. M., Hersh, E., et. al. Human monoclonal antibodies to the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmembrane glycoprotein gp41 enhance HIV-1 infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990; 87: 3185-3189.
  77. Robinson, W. Jr., Kawamura, T., Lake, D., Masuho, Y., Mitchell, W. M., and Hersh, E. M. Antibodies to the primary immunodominant domain of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) glycoprotein gp41 enhance HIV-1 infection in vitro. *J. Virol.* 1990; 64:5301-5305.
  78. Oldstone, M. B., Tishon, A., Lewicki, H., Dyson, H. J., Feher, V. A., Assa-Munt, N., and Wright, P. E. Mapping the anatomy of the immunodominant domain of the human immunodeficiency virus gp41 transmembrane protein: peptide conformation analysis using monoclonal antibodies and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Virol.* 1991. 65:1727-1734
  79. Merat, R., Raoul, H., Leste-Lasserre, T., Sonigo, P. and Pancino, G. Variable constraint on the principal immunodominant domain of the transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 1999; 73:5698-5706.
  80. Dederá, D., Gu, R. and Ratner, L. Conserved cysteine residues in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane envelope protein are essential for precursor envelope cleavage. *J. Virol.* 1992, 66:1207-1209.
  81. Pancino, G., Camoin, L. and Sonigo. Structural analysis of the principal immunodominant domain of the feline immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein. *J. Virol.* 1995; 69: 2110-2118.
  82. Syu, W.-J., Lee, W.R., Du, B., Yu, Q. C., Essex, M. and Lee, T. H. Role of conserved gp41 cysteine residues in the processing of human immunodeficiency virus envelope precursor and viral infectivity. *J. Virol.* 1991; 65:6349-6352.
  83. Cotropia, J., Ugen, K. E., Lkiks, S., Broliden, P. A., Hoxie, J. A., Srikantan, V., Williams, W. V. and Weiner, D. B. A human monoclonal antibody to HIV-1 gp41 with neutralizing activity against diverse laboratory isolates. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Human Retrovirol.* 1996; 12:221-232.
  84. Viveros, M., Dickey, C., Cotropia, J. P., Gevorkian, G., Larralde, C., Broliden, K., Levi, M., Burgess, A., Cao, C., Weiner, D., Agadjanyan, M. G. and Ugen, K. E. Characterization of a novel human immunodeficiency virus type 1 neutralizable epitope within the immunodominant region of gp41. *Virology.* 2000; 270:135-145.
  85. Rovinski, B., Dekaban, G., Cao, S., Yao, F., Persson, R., Matthews, T. J. and Klein, M.H. Engineering of noninfectious HIV-1-like particles containing mutant gp41 glycoproteins

- as vaccine candidates that allow vaccines to be distinguished from HIV-1 infectees. *Virology*. 1999; 257: 438-448.
86. Bosch, M., Earl, P. L., Fargnoli, K., Picciafuoco, S., Giombini, F., Wong-Staal, F. and Franchini, G. Identification of the fusion peptide of primate immunodeficiency viruses. *Science*. 1989; 244:694-697.
  87. Coffin, J.M., Hughes, S.H and Varmus, H. E. Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. pp 71-119.
  88. Chan DC, Fass, D., Berger, J.M. and Kim, P.S. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*. 1997;89:263-273.
  89. Check, E. Back to "plan A". *Nature*. 2003; 423:912-914.
  90. Pantaleo, G., Graziosi, C. and Fauci, A. Virologic and immunologic events in primary HIV infection. *Springer Semin Immunopathol* 1997;18:257-266.
  91. Clerici, M., Stocks, N. I., Zajac, R. A., Boswell, R.N., Lucey, D. R., Via, C. S. and Shearer, G. M. Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-positive patients. Independence of CD4+ cell numbers and clinical staging. *J. Clin. Invest.* 1989; 84:1892-1899.
  92. Tindall, B. and Cooper, D. A. Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS*. 1991; 5:1-14.
  93. Pantaleo, G., Menzo, S., Vaccarezza M, Graziosi, C., Cohen, O. J., Demarest, J. F., Montefiori, D., Orenstein, J. M., Fox, C., Schragar, L. K., Margolick, J. B., Buchbinder, S., Giorgi, J. V. and Fauci, A. S. Studies in subject with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1995;332:209-216.
  94. Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J., et al. Role of lymphoid organs in the pathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Immunol Rev* 1994;140:105-130.
  95. Pantaleo, G., Graziosi, C., Butini, L., et al. Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88:9838-9842.
  96. Lathey, J. L., Pratt, R. D. and Spector, S. A. Appearance of autologous neutralizing antibody correlates with reduction in virus load and phenotype switch during primary infection with human immunodeficiency virus type 1. *J. Inf. Dis.* 1997; 175:231-232.
  97. Burton, D. R. and Montefiori, D. C. The antibody response in HIV-1 infection. *AIDS*. 1997; 11 (SupplA):S87-S98.
  98. Pilgrim, A., Pantaleo, G., Cohen, O. J., Fink, L. M., Zhou, J. Y., Zhou, J. T., Bolognesi, D. P., Fauci, A. S. and Montefiori, D. C. Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection *J Infect Dis* 1997;176:924-932.
  99. Richman, D. D., Wrin, T., Little, S. J. and Petropoulos, C. J. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2003;100:4144-4149.
  100. Homsy, J., Meyer, M. and Levy, J. A. Serum enhancement of human immunodeficiency virus (HIV) correlates with disease in HIV infected individuals. *J. Virol.* 1990; 64:1437-1440.
  101. Haigwood, N. L., Nara, P. L., Brooks, E., Van Nest, G. A., Ott, G., Higgins, K. W., Dunlop, N., Scandella, C. J., Eichberg, J. W. and Steimer, K. S. Native but not denatured recombinant human immunodeficiency virus type 1 gp120 generates broad-spectrum neutralizing antibodies in baboons. *J Virol.* 1992; 66:172-182.
  102. Javaherian, K., Langlois, A. J, LaRosa, G. J., Profy, A. T., Bolognesi, D. P., Herlihy, W. C. Putney, S. D. and Matthews, T. J. Broadly neutralizing antibodies elicited by the hypervariable neutralizing determinant of HIV-1. *Science*. 1990; 250:1590-1593.



103. Weber, J.N., Clapham, P.R., Weiss, R.A., et al. Human immunodeficiency virus infection in two cohorts of homosexual men: neutralizing sera and association of anti-gag antibody with prognosis. *Lancet* 1987;1:119–122.
104. Fenyo, E.M. and Putkonen, P. Broad cross-neutralizing activity in serum is associated with slow progression and low risk of transmission in primate lentivirus infections. *Immunol Lett* 1996;51:95–99.
105. Albert, J., Abrahamsson, B., Nagy, K., et al. Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. *AIDS* 1990;4:107–112.
106. Lu, W., Shih, J. W., Tourani, J. M., Eme, D., Alter, H. J. and Andrieu, J. M. Lack of isolate-specific neutralizing activity is correlated with an increased viral burden in rapidly progressing HIV-1-infected patients. *AIDS* 1993;7(suppl 2):91–99.
107. Tsang, M.L., Evans, L.A., McQueen, P., et al. Neutralizing antibodies against sequential autologous human immunodeficiency virus type 1 isolates after seroconversion. *J Infect Dis* 1994;170:1141–1147.
108. Wrin, T., Crawford, L., Sawyer, L., Weber, P., Sheppard, H.W. and Hanson, C.V. Neutralizing antibody responses to autologous and heterologous isolates of human immunodeficiency virus. *J AIDS* 1994;7:211–219.
109. Montefiori, D.C., Pantaleo, G., Fink, L.M., et al. Neutralizing and infection-enhancing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in long-term nonprogressors. *J Infect Dis* 1996;173:60–67.
110. LaCasse, R. A., Follis, K. E., Trahey, M., Scarborough, J. D., Littman, D. and Numberg, J. H. Fusion-competent vaccines: broad neutralization of primary isolates of HIV. *Science*. 1999; 283:357-262.
111. Schragar, L., Young, J., Fowler, M., Mathieson, B. and Vermund, S. Long-term survivors of HIV-1 infection: definitions and research challenges. *AIDS* 1994;8(suppl 1):95–108.
112. Levy, J. A. Overall features of HIV pathogenesis: Prognosis for long-term survival. In *HIV and the pathogenesis of AIDS*. 2a.ed. ASM Press. 1998. p.311-338.
113. Wong, M.T., Warren, R.Q., Anderson, S.A., et al. Longitudinal analysis of the humoral immune response to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp160 epitopes in rapidly progressing and non-progressing HIV-1-uninfected subjects. *J Infect Dis* 1993;168:1523–1527.
114. Hogervorst, E., Jurriaans, S., deWolf, F., et al. Predictors for non- and slow progression in human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection: low viral RNA copy numbers in serum and maintenance of high HIV-1 p24-specific but not V3-specific antibody levels. *J Infect Dis* 1995;171:811–821.
115. Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, et al. Studies in subject with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1995;332:209–216.
116. Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1995;332:201–208.
117. Sei Y, Tsang PH, Roboz JP, Sarin PS, Wallace JI, and Bekesi JG. Neutralizing antibodies as a prognostic indicator in the progression of acquired immune deficiency syndrome (AIDS)-related disorders: a double-blind study. *J Clin Immunol* 1988;8:464–472.
118. Arendrup M, Nielsen C, Hansen J-ES, Pedersen C, Mathiesen L, and Nielsen JO. Autologous HIV-1 neutralizing antibodies: emergence of neutralization-resistant escape virus and subsequent development of escape virus neutralizing antibodies. *J AIDS* 1992;5:303–307.

119. Scott, J. K. and Smith, G. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*.1990; 249:386-390.
120. Hufton, E. E., Moerkerk, P. T., Meulemans, E. V., De Bruine, A., Arends, J. W. and Hoogenboom, H. R. Phage display cDNA repertoires: the pVI display system and its applications for the selection of immunogenic ligands. *J. Immunol. Meths*. 1999; 1-2:39-51.
121. Makowski, L. Structural constrains on the display of foreing peptides on filamentous bacteriophages. *Gene*. 1993; 1:5-11.
122. Jung, S., Arndt, K. M., Müller, L. M. and Plückthun, A. Selectively infective phage (SIP) technology: scope and limitations. *J. Immuno. Meths*. 1999; 231:93-104
123. Manoutcharian, K., Gevorkian, G., Cano, A. and Almagro, J. C. Phage displayed biomolecules as preventive and therapeutic agents. *Curr. Pharm. Biotech*. 2001; 2:217-223.
124. Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Almagro, J. C., Govezensky, T. and Domínguez, V. Identification of autoimmune thrombocytopenic purpura. Related epitopes using phage display peptide library. *Clin. Immun. And Immunopathology*. 1998; 86:305-309.
125. Manoutcharian, K., Sotelo, J., García, E., Cano, A. and Gevorkian, G. Characterization of cerebrospinal fluid antibody specificities in neurocysticercosis using phage display peptide library. *Clin. Immunol*. 1999; 91:117-121.
126. Ferrer, M. and Harrison, S. Peptide ligands to human immunodeficiency virus type 1 gp120 identified from phage display libraries. *J. Virol*. 1999; 73:5795-5802.
127. Boots, L., McKenna, P., Arnold, B., Keller, P., Gorny, M., Zolla-Pasner, S., Robinson, J. and Conley, A. Anti-human immunodeficiency virus type-1 human monoclonal antibody that bind discontinuous epitopes in the viral glycoproteins can identify mimotopes from recombinant phage peptide display libraries. *AIDS Research and Hum Retroviruses*. 1997; 13:1549-1559.
128. Glee, P., Pincus, S., Mc-Namer, D., Smith, M., Burritt, J. and Cutler, J. Peptide ligands that bind IgM antibodies and block interaction with antigen. *J. Immunol*. 1999; 163:826-833.
129. Grothaus, M. C., Srivastava, N., Smithson, S. L., Kieber-Emmons, T., Williams, D.B., Carlone, G. M. and Weterink, M. A. Selection of an immunogenic peptide mimic of the capsular polysaccharide of *Neisseria meningitides* serogroup A using a peptide display library. *Vaccine*. 2000; 18:1253-1263.
130. Dybwad, A., Forre, O., Natvig, J. B. and Sioud, M. Structural characterization of peptides that bind synovial fluid antibodies from FA patiens: a novel strategy for identification of disease-related epitopes using a random peptide library. *Cin. Immunol. Immunopathol*. 1995; 75:45-50.
131. Di Marzo Veronese, F., Willis, A. E., Boyer-Thompson, C., Appella, E. and Perham, R. N. Structural mimicry and enhanced immunogenicity of peptide epitopes displayed on filamentous bacteriophage. *J. Mol. Biol*. 1994; 243:167-172.
132. Manoutcharian, K., Díaz-Orea, A., Gevorkian, G., Fragoso, G., Acero, G., González, E., Villalobos, N., Gómez-Conde, E. and Sciotto, E. Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Vet. Immunol Immunopathol*. 2004; 99:11-24.
133. Neri, D., Carnemolla, B., Nissim, A., Leprini, A., Querzè, G., Balza, E., Pini, A., Tarli, L., Halin, C., Neri, P., Zardi, L. and Winter, G. Targeting by affinity-matured recombinant antibody fragments of an angiogenesis associated fibronectin isoform. *Nat. Biotech*. 1997; 15:1271-1275.

134. Cyr, J. L. and Hudspeth, A. J. A library of bacteriophage-displayed antibody fragments directed against proteins of the inner ear. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1999; 97:2276-2281.
135. Keller, P. M., Arnold, B. A., Shaw, A. R., Tolman, R. L., Middlesworth, F. V., Bondy, S., Rusiecki, V. K., Koenig, S., Zolla-Pazner, S., Conard, P., Emini, E. A. and Conley, A. Identification of HIV vaccine candidate peptides by screening random phage epitope libraries. *J. Virology.* 1993; 193:709-716.
136. Veronese, F. D. M., Willis, A. E., Boyer-Thompson, C., Appella, E. and Perham, R.N. Structural mimicry and enhanced immunogenicity of peptide epitopes displayed on filamentous bacteriophage. The V3 loop of HIV-1 gp120. *J.Mol.Biol.* 1994; 269:167-172.
137. Scala, G., Chen, X., Liu, W., Telles, J. N., Cohen, O. J., Vaccarezza, M., Igarashi, T. and Fauci, A.S. Selection of HIV-Specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1-positive sera. *J. of Immunol.* 1999; 162: 6155-6161.
138. Hoess, R. H. Protein design and phage display. *Chem Rev.* 2001; 101:3205-3218.
139. Pomerantz, R. and Horn, D.L. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat. Med.* 2003; 9:867-873.
140. Lucas, G.M., Chaisson, R. E. and Moore, R.D. *Ann. Intern. Med.* 1999; 131:81
141. Pöhlmann, S. and Doms, R. W. Evaluation of current approaches to inhibit HIV entry. *Curr. Drug. Targ. Inf. Disord.* 2002; 2:9-16
142. Markosyan, R. M., Ma, X., Lu, M., Cohen, F. and Melikyan, G.B. The mechanism of inhibition of HIV-1 Env-mediated cell-cell fusion by recombinant cores of gp41 extodomain. *Virology.* 2002; 302:174-184.
143. Eckert, D. M., Malashkevich, N., Hong, L. H., Carr, P. A. and Kim, P. S. Inhibiting HIV-1 entry: discovery of D-peptide inhibitors that target the gp41 coiled-coil pocket. *Cell.* 1999; 99:103-115.
144. Lalezari, J. P. et. al. Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America. *N. Engl. J. Med.* 2003;
145. D'Souza, M. P., Geyer, S. J., Hanson, C. V., Hendry, R. M., Milman, G., and collaborating investigators. Evaluation of monoclonal antibodies to HIV-1 envelope by neutralization and binding assays: an international collaboration. *AIDS.* 1994; 8:169-181.
146. Peisajovich, S.G., Blank, L., Epanand, R. F., Epanand, R. M. and Shai, Y. On the interaction between gp41 and membranes: the immunodominant loop stabilizes gp41 helical hairpin conformation. *J. Mol. Biol.* 2003; 326:1489-1501.
147. Cotropia, J. P. and Ugen, K. Passive immunotherapy against HIV-1. in *Human retroviral infections.* Kluwer Academic. N.Y. 2000. pp. 217-237.
148. Gevorkian, G., Viveros, M., Zamudio, F. and Larralde, C. Solid phase synthesis of a peptide comprising the 605-611 disulfide loop of gp41, transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Org. Prep. Proced. Int.* 1995; 27: 375-377.
149. Valadon, P. and Scharff, M. D. Enhancement of ELISAs for screening peptides in epitope phage display libraries. *J. Immunol. Meths.* 1996; 197: 171-179.
150. LaRosa, G.J., Davide, J. P., Weinhold, K., Waterbury, J.A., Profy, A. T., Lewis, J.A., Langlois, A. J., Dreesman, G. R., Boswell, R. N., Shaddock, P., Holley, L. H., Karplus, M., Bolognesi, D. P., Matthews, T. J., Emini, E. A. and Putney, S. D. Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant. *Science.* 1990; 249:932-935.
151. Johnston, R. AIDS VAX Results: An answer, or just more questions?. *AIDS Patient Care and STDs.* 2003; 17:47-51
152. Watanabe, M. E. Skeptical scientist skewer VaxGen statistics. *Nat. Med.* 2003; 9:376.

153. McCarthy, M. HIV vaccine fails in phase 3 trial. *The Lancet*. 2003; 361:755-756.
154. Fauci, A.S. HIV and AIDS: 20 years of science. *Nat. Med.* 2003; 9:839-843.
155. McMichael, A. J. and Hanke, T. HIV vaccines 1983-2003. *Nat. Med.* 2003; 9: 874-880.
156. Haigwood, N. L., Watson, A., Sutton, W. F., McClure, J., Lewis, A., Ranchalis, J., Travis, B., Voss, G., Letvin, N. L., Hu, S.L., Hirsch, V. M. and Johnson, P. R. Passive immune globulin therapy in the SIV/maaque model: early intervention can alter disease profile. *Immunol. Lett.* 1996; 51: 107-114.
157. Shibata, R., Igarashi, T., Haigwood, N., Buckler-White, A., Ogert, R., Ross, W., Willey, R., Cho, M.W. and Martin M. A. Neutralizing antibody directed against the HIV-1 envelope glycoprotein can completely block HIV-1/SIV chimeric virus infections of macaque monkeys. *Nat. Med.* 1999; 5:204-210.
158. Foresman, L., Jia, F., Li, Z., Wang, C., Stephens, E. B., Sahni, M., Narayan, O. and Joag, S. Neutralizing antibodies administered before, but not after, virulent SHIV prevent infection in macaques. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 1998; 14: 1035-1043.
159. Chen, X., Scala, G., Quinto, I., Liu, W., Chun, T., Justement, J. S., Cohen, O. J., VanCott, T. C., Iwanicki, M., Lewis, M., Greenhouse, J., Barry, T., Venzon, D. and Fauci, A. Protection of rhesus macaques against disease progression from pathogenic SHIV-89.6PD by vaccination with phage-displayed HIV-1 epitopes. *Nat. Med.* 2001; 7:1225-1231.
160. Conley, A. J., Kessler, J.A.I., Boots, L.J., McKenna, P.M., Schleif, W. A., Emini, E. A., Mark, G. E.I., Kaatinger, H., Cobb, E. K., Lunceford, S. M., Rouse, S. R. and Murthy, K.K. The consequence of passive administration of an anti-human immunodeficiency virus type 1 neutralizing monoclonal antibody before challenge of chimpanzees with a primary isolate. *J. Virol.* 1996; 70: 6751-6758.
161. Punteriero, G., Meola, A., Lahm, A., Zucchelli, S., Ercole, B.B., Tafi, R., Pezzanera, M., Mondelli, M.U., Cortese, R., Tramontano, A., Galfre, G. and Nicosia, A. Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants. *EMBO J.* 1998; 13:3521-3533.
162. Enshell-Seijffers, D., Smelyanski, L., Vardinon, N., Yust, I. and Gershoni, J.M. Dissection of the humoral immune response toward and immunodominant epitope of HIV: a model for the analysis of antibody diversity in HIV + individuals. *FASEB J.* 2001; 15: 2112-2120.
163. Xu, J., Gorny, M.K., Palmer, T., Karwowska, S. and Zolla-Pazner, S. Epitope mapping of two immunodominant domains of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1, using ten human monoclonal antibodies. *J. Virol.* 1991; 65: 4832-4838.
164. Cumming, S.A., McPhee, D.A., Maskill, W. J., Kemp, B. E., Doherty, R. R. and Gust, I. D. Use of a conserved immunodominant epitope of HIV surface glycoprotein gp41 in the detection of early antibodies. *AIDS.* 1990; 4: 83-86.
165. Zwick, M.B., Shen, J. and Scott, J.K. Homodimeric peptides displayed by the major coat protein of filamentous phage. *J.Mol.Biol.* 2000; 300: 307-320.
166. Tam, J.P. Recent advances in multiple antigen peptides. *J. Immunol. Meths.* 1996; 196: 17-32.

## **APÉNDICE I**

Base de datos de muestras de sueros  
humanos.

Clave INCMNSZ	Fecha de diagnóstico	Fecha de toma de muestra	Carga viral (copias/ml)	CD4 (cél/mm3)	CD8 (cél/mm3)	Tratamiento
CV 1061 f	2000	6-May-02	124	154	348	Si
CV 1130 b	1999	3-Jun-02	8,180	450	1094	Si
CV 1161 c	1996	23-Jul-02	< 50	154	1156	Si
CV 1175 c	2000	24-Jul-02	< 50	348	770	Si
CV 1198 b	Dec-94	20-May-02	< 50	648	1120	Si
CV 1223 b	1999	17-May-02	< 50	618	1290	Si
CV 1262 c	1998	28-May-02	< 50	189	433	Si
CV 1268 c		2-Aug-02	101	180	338	Si
CV 1271	2000	17-May-02	249	166	475	Si
CV 1310 c	1999	12-Jul-02	1,180	695	1538	Si
CV 1335 b	1988	22-May-02	23,100	243		Si
CV 1361 d	1-Feb	26-Jul-02	2,780	262	787	Si
CV 1422 b	2000	7-May-02	< 50	280	254	Si
CV 1455 d	2001	9-Jul-02	21,400	164	386	Si
CV 1633 b	2001	13-May-02	< 50	222	418	Si
CV 1640 a	1999	9-Jul-02	< 50	754		Si
CV 1650 a	2001	30-Jul-02	16,900	540	703	No
CV 1666	1995	9-May-02	3,270	541	782	Si
CV 170 g	1997	19-Jul-02	< 50	432	1561	Si
CV 1706 b		19-Jul-02	196	296	932	Si
CV 1725 b		16-Jul-02	242	624	3202	Si
CV 1735 a	1-May	9-Jul-02	> 75,000	499	2,251	No
CV 1789 a	1-Nov	21-May-02	25,000	438	728	No
CV 1846	2000	6-Aug-02	< 50	490	1574	Si
CV 1885	2-Mar	30-Apr-02	22,900	17	149	
CV 1890 o						
CV 1692 <sup>a</sup>	1-Dec	7-May-02	1,120	438	1,243	Si
CV 1895	1992	8-May-02	29,000	57	645	Si
CV 1905	1997	20-May-02	28,400	187	893	Si
CV 1908	1996	22-May-02	467	198	965	Si
CV 1909	1-Sep	23-May-02	661	1289	2,375	Si
CV 1947		27-Jun-02	> 75,000	9	308	No
CV 1968	2-Apr	12-Jul-02	> 75,000	201	2,019	No
CV 1973	1999	18-Jul-02	< 50	427	531	Si
CV 1976	2001	19-Jul-02	5,110	108	710	Si
CV 1980	2-Jul	23-Jul-02	< 50	214	1304	Si
CV 1981	2001	23-Jul-02	325	126	708	Si

CV 1991	1-Oct	30-Jul-02	< 50	696	676	Si
CV 1993	17-Jul-02	1-Aug-02	> 75,000	35	345	No
CV 2009	1996	13-Aug-02	> 75,000	59	577	Si
CV 228 h	1987	30-May-02	< 50	599	3,124	Si
CV 260	Mar-99	16-May-02	< 50	550	1010	Si
CV 367 (22-May-02)	Oct-98	22-May-02	942	390		Si
CV 367 (25-Jul-02)	Oct-98	25-Jul-02	121	680		Si
CV 527 d	1997	16-Jul-02	< 50	415	1147	Si
CV 534 k	1987	12-Jul-02	3,570	453	641	Si
CV 591 d	1998	27-May-02	< 50	173	1188	Si
CV 633 e		23-Jul-02	< 50	760		Si
CV 770 d	Feb-00	28-May-02	< 50	287	537	Si
CV 94	1997	6-May-02	< 50	377	367	Si
LAD	1985	4-Jun-98	12,280	383		No
NP 11	12-Feb-88	4-Mar-98	41,304	539		No
NP 13	May-85	25-Sep-98	9,945	527		No
NP 14	Nov-87	13-Jan-99	4,255	823		No
NP 17	Mar-91	30-Mar-99	< 50	1448		No
NP 21	1990	6-Feb-98	106,976	470		No
NP 35 a	May-88	12-Jan-99	56,742	494		No
NP 36	Mar-96	20-Jul-99	12,528	846		No
NP 37	Jun-98	25-Jan-99	29592	267		No
NP 45	Dec-97	18-Jun-99	58,188	189		No
NP 47	Jun-92	27-Jul-99	6,089	241		No
NP 54	Jan-99	11-Feb-99	62,138	223		No
NP 57	Jun-97	3-Mar-99	12,135	349		No
NP 62	Dec-91	22-Mar-99	<50	433		No
NP 68	Mar-97	29-Nov-99	168,000	269		No
NP8	1989	4-Sep-98	216,818	507		No
NP 7 MAF)	1985	10-Aug-01	31,300	486		No

## APÉNDICE II



## Antigenic properties of phage displayed peptides comprising disulfide-bonded loop of the immunodominant region of HIV-1 gp41

Alberto Cano<sup>a</sup>, Monica Viveros<sup>b</sup>, Gonzalo Acero<sup>a</sup>, Tzipe Govezensky<sup>a</sup>, Maria Elena Munguia<sup>a</sup>, Eric Gonzalez<sup>a</sup>, Luis Soto<sup>b</sup>, Goar Gevorkian<sup>a</sup>, Karen Manoutcharian<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, México, DF CP04510, México

<sup>b</sup> Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Subirán", Vasco de Quiroga #15, México, DF CP14000, México

Received 22 June 2004; received in revised form 23 July 2004; accepted 23 July 2004

Available online 21 August 2004

### Abstract

The HIV-1 envelope glycoprotein gp41 contains Cys(X)<sub>3</sub>Cys motif, which has been shown to elicit a strong antibody response in almost all HIV-1 infected individuals. This disulfide-bonded loop region is conserved in most retroviruses suggesting the existence of an essential function in virus life cycle. In this study, we displayed the peptides comprising 12 amino acids of the immunodominant loop of gp41 on the surface of M13 phage as N-terminal fusions to the minor coat protein pIII and major coat protein pVIII of the phage and demonstrated that cysteine loop containing peptide expressed on phage recognized 62 out of 63 (98.4%) HIV-1 positive samples but not control negative sera while phage bearing linear peptides detected 4–30% of HIV-1-positive sera. The main advantage of phage-based ELISA or other antibody detection-based diagnostic tests of HIV-infection to be used for massive screening in developing countries is the reproducible, simple, rapid and low-cost production of recombinant antigens.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Phage displayed peptides; Antigen; Immunogen; HIV-1 gp41 immunodominant region

### 1. Introduction

The envelope glycoprotein gp41, a transmembrane subunit of the viral envelope, generated through proteolytic cleavage of the polypeptide precursor gp160, is thought to play an important role in virus entry into the cell [1–5]. The gp41 molecule contains hydrophobic, glycine-rich sequence referred as the fusion peptide at its amino terminus, which is thought to insert into cell membrane. The fusion peptide region is followed by two heptad repeat sequences of hydrophobic amino acids (N-terminal heptad repeat and C-terminal heptad repeat) that form helical domains with hydrophobic faces, and packing interactions between these two regions are critical for membrane fusion. These two heptad

repeats are linked by a nonhelical loop region containing a Cys(X)<sub>3</sub>Cys motif, which has been shown to elicit a strong antibody response in almost all (more than 98%) HIV-1 infected individuals [6–9]. This disulfide-bonded loop region is conserved in most retroviruses suggesting the existence of an essential function in virus life cycle, and in the subfamily of lentiviruses this loop is the main constituent of the principal immunodominant domain with highly conserved amino acid sequence in the same lentivirus species [10]. Although it has been shown undoubtedly that the substitution of both cysteine residues of this loop in HIV-1 impaired the precursor cleavage and resulted in loss of viral infectivity [11,12], there is a discrepancy in results on recognition of human sera by linear peptides bearing substitution of one of the cysteines. Thus, while Cumming and Narvanen reported that peptides without C-terminal or N terminal cysteines recognized more than 99% of serum samples, others showed that elimination of the

\* Corresponding author. Tel.: +5255 56223869; fax: +5255 56223855.

E-mail address: [karman@servidor.unam.mx](mailto:karman@servidor.unam.mx) (K. Manoutcharian).

loop by substitution of N-terminal or C-terminal cysteine by serine may abrogate the binding of a number of human monoclonal antibodies as well as of human HIV-1-positive sera, suggesting that the disulfide bridge is necessary to maintain the three-dimensional structure required for antibody recognition [7,13,14].

Keeping in mind that one of the components of all currently available antibody detection-based diagnostic tests of HIV infection comprises the amino acid sequence of this loop (synthetic peptides or recombinant proteins), the search for alternative presentations of this domain may be of interest for design of cost effective diagnostic tools for massive screening in developing countries. The filamentous bacteriophage display technology is a powerful tool for the display of peptides, proteins and antibody fragments of interest, and the resulted constructs may be used as diagnostics as well as vaccine components [15–18].

In this study, we displayed the peptides comprising 12 amino acids of the immunodominant loop of gp41 on the surface of M13 phage as N-terminal fusions to the minor coat protein pIII and major coat protein pVIII of the phage. Both, disulfide-loop containing peptide as well as peptides with substitutions of any one of cysteine residues by alanine to disrupt the loop, were displayed and the antigenic properties of these molecules were studied performing a series of ELISA with human sera.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Human sera and clinical features of patients

All sera from HIV-1 infected patients as well as healthy HIV-1 negative individuals were obtained from Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubiran”, Mexico City, Mexico, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Patients data were managed in a strictly confidential way.

About 63 sera from HIV-1-infected individuals as well as 5 sera from HIV-1-negative healthy controls (group 0) were used in this study. Clinical data were available for all individuals. Among HIV-1-positive sera, 16 were from patients having CD4 counts less than 200 cells per  $\mu\text{l}$  (group 1), 16 patients had from 200 to 400 CD4 cells per  $\mu\text{l}$  (group 2) and 31 had more than 400 CD4 cells per  $\mu\text{l}$  (group 3). Forty one out of 63 patients were under antiretroviral therapy at the time of serum collection and 22 patients did not receive any treatment. Viral loads ranged from less than 50 RNA copies per ml of plasma to  $1.68 \times 10^5$  RNA copies per ml. No correlation between CD4 cell counts and viral load were observed.

### 2.2. Generation of recombinant phage/phagemid clones bearing HIV-1 gp41 immunodominant region

Three dodecapeptides GCSGKLICTTAV (named C–C peptide), GASGKLICTTAV (named A–C) and GCS-

GKLIATTAV (named C–A) were cloned in M13 phage and phagemid vectors, respectively. In M13 phage system foreign peptides are expressed as fusions to M13 coat protein pIII and in recombinant phage all pIII proteins have foreign peptide inserts. In M13 phagemid expression system foreign peptide are expressed as fusions to M13 coat protein pVIII in the context of hybrid phage where recombinant coat proteins are encoded by phagemids while all other M13 proteins including wild type pVIII are provided by helper phage during superinfection. All molecular biology procedures were carried out using standard protocols [19] or as recommended by manufacturers. Restriction enzymes, DNA polymerase, T4 DNA ligase were obtained from New England Biolabs, Beverly, MA, USA and M13KO7 Helper Phage was obtained from Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA. The synthetic oligonucleotides (oligos) were synthesized at Operon Technologies, CA, USA. To display the gp41-derived peptides on M13 phage surface as fusion to major coat protein pVIII, three pairs of oligos were combined in separate annealing reactions: 5' AnGM1: AATTCGGTGTCTGGAAAACCTATTGGACCACTGCTGTG and 3' AnGM2: GATCCACAGCAGTGGTGCAAAATGAGTTTCCAGAGCAACCG for C–C peptide; 5' AnGMA21: AATTCGGTGTCTGAAAAAAGCTATTGGCTACCAGT-GCTGTG and 3' AnGMA22: GATCCACAGCAGTGGTGCAAAATGAGTTTCCAGAGCAACCG for A–C peptide; 5' AnGMA11: AATTCGGTGTCTGGAAAACCTATTGGACCACTGCTGTG and 3' AnGMA12: GATCCACAGCAGTGGTGCAAAATGAGTTTCCAGAAGCAACCG for C–A peptide. The annealing products had cohesive ends corresponding to *EcoRI* and *BamHI* restriction sites at 5' and 3' of the DNA fragments, respectively, for directional cloning in PF8 phagemid vector, which is similar to the previously described pF3 vector [20] with the exception that in the latter the foreign peptides are fused to M13 pIII. The vector DNA was digested with *EcoRI/BamHI* and purified from agarose gel. About 0.5  $\mu\text{g}$  of vector DNA and the DNAs from annealing reactions were combined in three ligation reactions using T4 DNA ligase. The ligation mixtures were used to transform competent *E. coli* TG1 cells. The cells were plated on LB-Amp plates and individual colonies were picked up and resultant recombinant phagemids 45C–C, 67A–C and 89C–A were rescued and amplified by superinfection with M13KO7 helper phage as described previously [20].

To display the gp41-derived peptides on M13 phage surface as fusion to minor coat protein pIII, the Ph.D. Peptide Display Cloning system (New England Biolabs) was used.

The oligos 3'Ext-NGM: CATGTTTCGGCCGACACAGCAGTGGTGCAAAATGAGTTTCCAGAGCAACCGAGTGAGAATAGAAAGGTACCCGGG; 3' Ext-GMA1: CATGTTTCGGCCGACACAGCAGTGGTGCAAAATGAGTTTCCAGAGCAACCGAGTGAGAATAGAAAGGTACCCGGG; 3' Ext-GMA2: CATGTTTCGGCCGACACAGCAGTGGTGCAAAATGAGTTTCCAGAGCAACCGAGTGAGAATAGAAAGGTACCCGGG; and the extension

primer 5' EP: CATGCCCGGGTACCTTCTATTCTC provided in the kit were used to synthesize the DNA fragments coding for C–C, A–C and C–A peptides and carrying *AccI/EagI* restriction sites. These DNA fragments were cloned into the M13KE phage vector as described above, and the recombinant phage clones E1C–C, E2A–C and E3C–A displaying gp41 peptides as fusion to M13 pIII were amplified by infecting TG1 cells as described elsewhere [20,21].

The correct cloning was confirmed by dideoxy DNA sequencing using [ $\alpha$ - $^{35}$ S] dATP and Sequenase Quick-Denature plasmid sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). Recombinant phagemid/phage particles were purified from 2 l of 2 $\times$  YT by double PEG/NaCl (20% w/v polyethylene glycol-8000, 2.5 M NaCl) precipitation and resuspended in Tris-buffered saline (TBS). Typical yields of phagemid/ phage particles were  $5 \times 10^{11}$  and  $5 \times 10^{12}$  per ml of culture medium, respectively.

### 2.3. Peptide synthesis

A 15-residue cyclic peptide GM15 (sequence: IWGCS-GKLICTTAVP) comprising the immunodominant region of HIV-1 gp41 was synthesized in our laboratory by Merrifield's stepwise procedure with some modifications [9,22]. A 17-residue non-related cyclic peptide (sequence: CASVRG-WYVRSVDFPAC) was purchased from Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA.

### 2.4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA experiments with phage displaying foreign peptides as fusion to pIII were carried out as previously described [21]. Briefly, human sera diluted 1:300 in PBS-1%BSA were added to anti-human IgG coated microtiter plates and incubated 1 h at 37 °C. Plates were washed and  $10^{10}$  pfu of each phage were added and incubated overnight at 4 °C. Horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-M13 monoclonal antibody (Amersham Pharmacia Biotech) and ABTS Single Solution (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA) were used to detect phage bound to human antibodies. The optical densities (OD) at 405 nm were registered using Opsy MR Microplate Reader (DYNEX Technologies Inc., Chantilly, VA, USA).

ELISA experiments with phagemid clones bearing disulfide-bonded loop of gp41 as fusion to pVIII were performed using a different format. About  $10^{11}$  pfu of 45C–C, 67A–C and 89C–A clones in PBS were added to microtiter plates (Nunc MaxiSorp, Roskilde, Denmark) and incubated overnight at 4 °C. Plates were washed and blocked with PBS-3% BSA. Human sera diluted 1:300 in PBS-1% BSA were added and incubated 1 h at 37 °C. HRP-goat anti-human IgG conjugate (Zymed) diluted 1:10000 in PBS-1% BSA and ABTS Single Solution were used to detect bound antibodies. OD were registered as described above.

ELISA experiments with  $\beta$ -mercaptoethanol were performed as described above with some modifications: phage were diluted in PBS-1% BSA-15%  $\beta$ -mercaptoethanol or PBS-1% BSA. All other steps were performed without modification.

Competition ELISA was performed as described above with the exception that human sera were incubated at 4 °C overnight with synthetic peptide GM15 comprising disulfide-bonded loop of gp41 and then used in ELISA with phage. Non-related synthetic peptide C44 was used as a negative control.

### 2.5. Statistical analyses

The cut off values to classify sera as positive or negative were determined as the mean + 3 S.D. (standard derivation) of control negative sera.

The correlation between variables was verified by using the  $\chi^2$ -test for contingency tables.

## 3. Results

### 3.1. Prevalence of anti-gp41 disulfide-bonded loop immunodominant region antibodies in patient groups

Phage bearing cyclic gp41 immunodominant region-based peptide in low (E1C–C) and high (45C–C) copies were recognized in ELISA assay by 62 out of 63 of HIV-1-positive sera (Tables 1 and 2). None of these serum samples bound to control M13 phage. Also, none of the HIV-1-negative sera showed binding to E1C–C, 45C–C or M13 phage. No differences of ELISA OD values were observed between groups 1–3. Phage bearing linear peptides were less sensitive in ELISA. 11 out of 63 (17%) sera bound to 67A–C, 19 out of 63 (30%) sera bound to 89C–A, 9 out of 63 (14%) sera bound to

Table 1  
Sensitivity of ELISA using recombinant phage and HIV-1-positive serum samples

Recombinant phage	Positive sera	
E1C–C	62/63	98.4%
E2A–C	9/63	14.3%
E3C–A	3/63	4.8%
45C–C	62/63	98.4%
67A–C	11/63	17.5%
89C–A	19/63	30.2%

Table 2  
ELISA reactivity of phage bearing cyclic gp41 immunodominant region-based peptide in low (E1C–C) and high (45C–C) copies with HIV-1-positive serum samples

	E1C–C	45C–C
Group 1	0.773 $\pm$ 0.266	0.853 $\pm$ 0.266
Group 2	0.678 $\pm$ 0.265	1.181 $\pm$ 0.265
Group 3	0.800 $\pm$ 0.403	0.915 $\pm$ 0.403

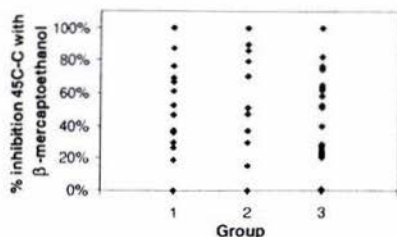


Fig. 1. Inhibition of binding of phage 45C-C bearing cyclic peptide to HIV-1-positive sera by  $\beta$ -mercaptoethanol.

E2A-C, and 3 out of 63 (4.7%) sera bound to E3C-A. None of the control HIV-1-negative sera bound to these recombinant phage particles.

### 3.2. ELISA under reducing conditions (in the presence of 15% $\beta$ -mercaptoethanol)

$\beta$ -Mercaptoethanol was used in ELISA to study if disulfide-bonded loop was necessary for antibody recognition. Although phage bearing peptide with substitution of any one of cysteine residues by alanine to disrupt the loop did not show recognition with most HIV-1-positive sera, it is difficult to make a conclusion from these experiments that the disulfide bond is necessary for antibody binding. Since we can not exclude the existence of the disulfide bond between two cysteines from neighbor phage coat proteins bearing the insert, only using  $\beta$ -mercaptoethanol in ELISA for reduction of existing disulfide bonds may help to elucidate if anti-gp41 antibodies bind to linear immunodominant region-based peptide. As shown in Figs. 1 and 2, the recognition of phage 45C-C bearing cyclic peptide in high copy was inhibited for 19 out of 62 sera by more than 70%, for 20 out of 62 sera by 30–70%, and for 23 out of 62 sera by less than 30%. Among the latter group, 7 HIV-1-positive sera showed the same binding both in the presence and in the absence of  $\beta$ -mercaptoethanol. Higher inhibition was observed when testing sera from HIV-1-positive patients having less than 5

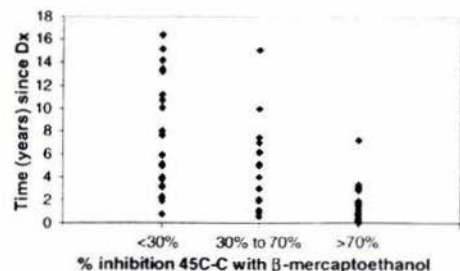


Fig. 2. Inhibition of binding of phage 45C-C bearing cyclic peptide to HIV-1-positive sera by  $\beta$ -mercaptoethanol. Positive correlation between % of inhibition and years after diagnosis was observed ( $P < 0.01$ ).

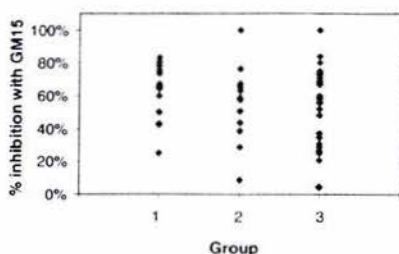


Fig. 3. Inhibition of binding of phage 45C-C bearing cyclic peptide to HIV-1-positive sera by synthetic peptide GM15.

years of infection ( $P < 0.01$ ) (Fig. 2), confirming our hypothesis that the long-term non-progressors develop anti-linear peptide antibodies like the previously reported human monoclonal antibody CL3 (17, 30). The binding of linear peptide expressing phage 67A-C to HIV-1-positive sera was inhibited by 100% for 4 out of 11 samples and less than 30% for seven samples. Five samples among the latter group showed the same binding both in the presence and in the absence of  $\beta$ -mercaptoethanol. The binding of linear peptide expressing phage 89C-A to HIV-1-positive sera was inhibited by 100% for 3 out of 19 samples and less than 30% for nine samples. Four samples among the latter group showed the same binding both in the presence and in the absence of  $\beta$ -mercaptoethanol.

### 3.3. Competition ELISA

To compare the antigenic properties of the peptide comprising the gp41 immunodominant region in free form and expressed on phage, competition ELISA was performed. As shown in Fig. 3, cyclic synthetic peptide was able to inhibit the binding of phage 45C-C to antibodies for some but not all serum samples. No differences between three patient groups were observed in competition ELISA.

## 4. Discussion

We studied here the antigenic properties of the disulfide-bonded loop region of gp41 displayed on filamentous phage M13. Both, the phage major coat protein pVIII and minor coat protein pIII fusion was employed. There are up to five copies of pIII and approximately 2700 copies of pVIII on the surface of the phage, and the antigenic and/or immunogenic properties of foreign peptides displayed as fusions to pIII or pVIII may vary. The effect of cysteine substitution by alanine was also examined in an attempt to define the role of disulfide loop conformation on the recognition of this epitope by human HIV-1-positive sera.

We showed that cysteine loop containing peptide expressed on phage indeed recognized 62 out of 63 (98.4%) HIV-1 positive samples but not control negative sera

(Table 1). Although phage expressing cyclic peptide as fusion either to pIII or pVIII recognized 98.4% of HIV-1-positive sera, we suggest that pVIII fusion is more preferable since the ELISA protocol is more rapid, simple and OD readings are higher compared with phage bearing cyclic peptide as fusion to pIII. Four remaining phage constructs bearing linear peptides detected 4–30% of HIV-1-positive sera. These results are in agreement with some but not all previous studies [6–9,13,14]. To exclude the possibility that positive ELISA signal in assays with phage bearing linear peptides with one cysteine residue were related to spontaneous intermolecular disulfide bond formation between two cysteines comprising neighbor peptides [23], we used  $\beta$ -mercaptoethanol as a reducing agent in ELISA experiments and showed that 30% of sera still reacted with phage construct indicating that these individuals had antibodies recognizing linear peptide. Since it is extremely difficult to maintain the monomer form of any single cysteine containing peptide, we may also suppose that a discrepancy in all previous studies was related to this phenomena. On the other hand, there is at least one human neutralizing monoclonal anti-HIV-1 gp41 antibody that recognized the immunodominant region loop comprising peptide only in the presence of  $\beta$ -mercaptoethanol indicating that some individuals have antibodies recognizing linear peptide [24,25]. In addition, in agreement with these reports, we found here a correlation between the presence of anti-linear peptide antibodies and endurance of infection.

Use of recombinant phage bearing the immunodominant loop (as well as other regions of HIV that are currently used in all immunodiagnostic assays) has a clear advantages comparing with synthetic peptides. Synthetic peptides are known to bind weakly to the surface of ELISA plates and conformational changes occur during binding. It is known that in order to optimize antigen-antibody interactions, the peptide should be in its native conformation, and approaches helping to maintain this native conformation are of great interest. Using of phage displayed peptides may be suitable for maintaining the native conformation. Also, since phage particles bear approximately 2700 copies of pVIII and about five copies of pIII, using phage displayed peptides in ELISA is comparable to using multiple antigenic peptides (MAP) that attracted a great interest recently but the preparation of phage is less difficult. Phage displayed peptides have also advantages comparing with recombinant proteins since the production of phage is very simple compared with recombinant protein purification systems. We think that phage displayed antigens may replace traditional recombinant antigens or synthetic peptides in ELISA as well as in other currently available immunodiagnostic assays such as commercial Western Blot kits and different immunochromatographic tests. It is important to emphasize that these tests have high costs due to high costs of antigens used. The main advantage of phage-based ELISA or other diagnostic tests would be the reproducible, simple, rapid and low-cost production of recombinant antigens, and such tests may be of interest for massive screening in developing countries.

## Acknowledgments

We acknowledge the technical assistance of Leonor Huerta, Yetzi Robles and Natalia Kopitin. This work was supported by CONACYT, Mexico, grants #30813-M and #40523-M.

## References

- [1] Chan DC, Kim PS. HIV entry and its inhibition. *Cell* 1998;93:681–4.
- [2] Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 1998;280:1884–8.
- [3] Doms RW, Moore JP. HIV-1 membrane fusion: targets of opportunity. *J Cell Biol* 2000;151:F9–14.
- [4] Eckert DM, Kim PS. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem* 2001;70:777–810.
- [5] Gallo SA, Finnegan CM, Virad M, Raviv Y, Dimitrov A, Rawat SS, Puri A, Durell S, Blumenthal R. The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim Biophys Acta* 2003;1614:36–50.
- [6] Gnann JW, Schwimbeck PL, Nelson JA, Truax AB, Oldstone MBA. Diagnosis of AIDS by using a 12-amino acid peptide representing an immunodominant epitope of the human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1987;156:261–7.
- [7] Narvanen A, Korkolainen M, Suni J, Korpela J, Kontio S, Partanen P, Vaheri A, Untala ML. Synthetic env gp41 peptide as a sensitive and specific diagnostic reagent in different stages of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Med Virol* 1988;26:111–8.
- [8] Horal P, Svennerholm B, Jeansson S, Rymo L, Hall WW, Vahlne A. Continuous epitopes of the human immunodeficiency type 1 (HIV-1) transmembrane glycoprotein and reactivity of human sera to synthetic peptides representing various HIV-1 isolates. *J Virol* 1991;65:2718–23.
- [9] Gevorkian G, Soler C, Viveros M, Padilla A, Govezensky T, Larralde C. Serologic reactivity of a synthetic peptide from human immunodeficiency virus type 1 gp41 with sera from a Mexican population. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3:651–3.
- [10] Pancino G, Camion L, Sonigo P. Structural analysis of the principal immunodominant domain of the feline immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein. *J Virol* 1995;69:2110–8.
- [11] Syu WJ, Lee WR, Du B, Yu QC, Essex M, Lee TH. Role of conserved gp41 cysteine residues in the processing of human immunodeficiency virus envelope precursor and viral infectivity. *J Virol* 1991;65:6349–52.
- [12] Dederá D, Gu RL, Ratner L. Conserved cysteine residues in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane envelope protein are essential for precursor envelope cleavage. *J Virol* 1992;66:1207–9.
- [13] Cumming SA, McPhee DA, Maskill WJ, Kemp BE, Doherty RR, Gust ID. Use of conserved immunodominant epitope of HIV surface glycoprotein gp41 in the detection of early antibodies. *AIDS* 1990;4:83–6.
- [14] Xu JY, Gorny MK, Palker T, Karwowska S, Zolla-Pazner S. Epitope mapping of two immunodominant domains of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1, using ten human monoclonal antibodies. *J Virol* 1991;65:4832–8.
- [15] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985;228:1315–7.
- [16] Venkatesh N, Im SH, Balass M, Fuchs S, Katchalski-Katzir E. Prevention of passively transferred experimental autoimmune myasthenia gravis by a phage library-derived cyclic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:761–6.
- [17] Manoutcharian K, Gevorkian G, Cano A, Almagro JC. Phage displayed biomolecules as preventive and therapeutic agents. *Curr Pharm Biotechnol* 2001;2:217–23.

- [18] Matthews LJ, Davis R, Smith GP. Immunogenically fit subunit vaccine components via epitope discovery from natural peptide libraries. *J Immunol* 2002;169:837–46.
- [19] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- [20] Manoutcharian K, Terrazas LI, Gevorkian G, Acero G, Petrossian P, Rodriguez M, Govezensky T. Phage-displayed T-cell epitope grafted into Immunoglobulin heavy-chain complementarity-determining regions: an effective vaccine design tested in murine cysticercosis. *Infect Immun* 1999;67:4764–70.
- [21] Manoutcharian K, Sotelo J, Garcia E, Cano A, Gevorkian G. Characterization of cerebrospinal fluid antibody specificities in neurocysticercosis using phage display peptide library. *Clin Immunol* 1999;91:117–21.
- [22] Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc* 1963;85:2149–54.
- [23] Zwick MB, Shen J, Scott JK. Homodimeric peptides displayed by the major coat protein of filamentous phage. *J Mol Biol* 2000;300:307–20.
- [24] Cotropia J, Ugen KE, Kljaks S, Broliden K, Broliden PA, Hoxie JA, Srikantan V, Williams WV, Weiner DB. A human monoclonal antibody to HIV-1 gp41 with neutralizing activity against diverse laboratory isolates. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996;12:221–32.
- [25] Viveros M, Dickey C, Cotropia JP, Gevorkian G, Larralde L, Broliden K, Levi M, Burgess A, Cao C, Weiner DB, Agadjanyan MG, Ugen KE. Characterization of a novel human immunodeficiency virus type 1 neutralizable epitope within the immunodominant region gp41. *Virology* 2000;270:135–45.

## Phage Displayed Biomolecules As Preventive and Therapeutic Agents

K. Manoutcharian<sup>1\*</sup>, G. Gevorkian<sup>1</sup>, A. Cano<sup>1</sup> and J. C. Almagro<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, and <sup>2</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México

**Abstract:** Phage display is a powerful technology for selecting and engineering peptides and proteins expressed on the surface of filamentous bacteriophage. The advantages of phage display technology over other research tools and its great potential have been demonstrated by successful application of phage display in diverse fields of biomedical/clinical research. In this review we will describe some recent developments in phage display, including new expression vectors, display formats, bioselection strategies and applications in pharmaceutical biotechnology. We highlight some important applications of phage display to identify disease- and pathogen-specific biomolecules, making particular emphasis on development of phage display-derived preventive and therapeutic vaccines.



### INTRODUCTION

Phage display is a powerful technology for selecting and engineering peptides and proteins expressed on the surface of filamentous bacteriophage. This methodology relies on the connection between phenotype and genotype, which in this case is the physical link between the engineered fusion protein or peptide expressed on the phage surface and the phage DNA encoding them. Such linkage, along with the simplicity of *in vitro* and *in vivo* manipulations of the phage, allows rapid generation of phage-displayed ligands and receptors with high binding affinities within 2-3 weeks. Over the last years, after the first reports describing the methodological features of phage display technology, more than one thousand phage display-related papers covering various fields of both basic and applied biomedical research, have been published (for review see [1,2]).

Large random peptide and antibody fragment (Fab and scFv) phage libraries with complexities up to  $10^{10}$ , as well as libraries expressing gene-, genomic-DNA fragments and cDNAs have been generated and successfully used for fine epitope mapping, as well as studying of protein-protein, DNA-protein, antigen-antibody (Ag-Ab), enzyme-substrate interactions and other biologically important phenomena. The most fascinating application of phage display has perhaps been the generation of monoclonal antibodies (mAbs), particularly the human mAbs.

In this review we will describe some recent developments in phage display, including new expression vectors, display formats, bioselection strategies and applications in pharmaceutical biotechnology. We highlight some important applications of phage display to identify

disease- and pathogen-specific biomolecules, making particular emphasis on development of phage display-derived preventive and therapeutic vaccines.

### PHAGE DISPLAY

Phage display refers to the expression of peptides or proteins on the surface of filamentous phage (Ff) [3]. The most commonly used Ff is M13 phage, which consists of a single-stranded circular DNA genome packaged in a tube comprised of 2700 copies of the major coat protein pVIII and closed at the ends by 4 or 5 copies of each of four species of minor coat proteins pIII, pVI, pVII and pIX. The wild type M13 is a long (900 nm) and narrow (7 nm) filamentous particle and needs the F-pilus for infection of *Escherichia coli* host [1, 2].

Unlike lytic phage, which are released by cell lysis after assembly in the host cell cytoplasm, Ff phage are continuously extruded through the host cell envelope in a process that couples assembly with export. Every step in the viral life cycle has the potential to affect the production of phage and expression of foreign peptides on the surface of phage particle. The biases introduced by the phage life cycle can be modulated by different choices of vector or experimental parameters. Three structural proteins of M13 - pVIII, pIII and occasionally pVI have been used as fusion partners to express foreign peptides/proteins. Phage display can be classified as Types 3, 3+3, 33 for phage pIII and as Types 8, 8+8, 88 for pVIII fusions. In the case of Type 3 (or Type 8) expression system, all copies of phage protein (pIII or pVIII) contain the insert. Alternatively, insert-encoding gene can be inserted into plasmid DNA called phagemids and recombinant phage can be recovered after infection of the bacteria, containing the phagemid, by helper phage carrying native pIII or pVIII genes. By this way Type 3+3 (or 8+8) phage where only a fraction of phage proteins contain foreign peptides/proteins are generated. Finally, if

\*Address correspondence to this author at the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, México City, C.P.04510, MÉXICO; Tel: 525-6223854; Fax: 525-6223369; Email: karman@servidor.unam.mx

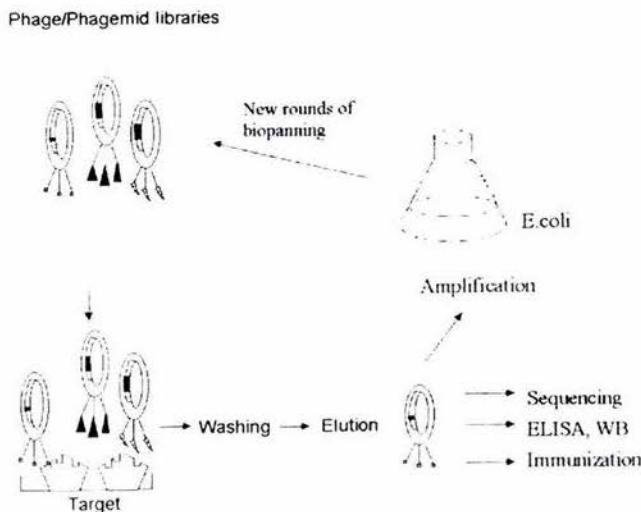
both native and mutant phage genes are included in the phage genome, Type 33 (or 88) phage can be constructed.

Generally, in phage display, foreign peptides or proteins are expressed as N-terminal fusions to phage coat proteins. While in Type 3 system pIII can tolerate large protein inserts, pVIII in Type 8 system can efficiently express only peptides of up to 6-8 amino acids in length as 2700 copies per phage particle. In contrast, in the case of Type 8+8/88 expression format larger proteins can be fused also to M13 pVIII by generating hybrid phage instead of recombinant phage [1,2]. Although in phage display technology only these six types of expression systems have been used, the great diversity of phage display constructs is the result of the expression of different types of molecules, ranging from random peptides, defined epitopes/mimotopes to antibody fragments, cDNA libraries and gene-, genomic-DNA fragments.

The first phage display library (PDL) was constructed by Smith [3] by cloning EcoR I gene fragments into gene III of phage  $\phi$ 1. Later, the generation of phage displayed random peptide libraries and affinity selection of phage displaying antibody-binding peptides have been reported [4] (Fig. 1). Interestingly, at the same time de la Cruz et al [5] have shown that phage expressing foreign protein fragment were immunogenic in mice and rabbits. All these pioneering studies allowed subsequently to generate a number of diagnostic as well as preventive and therapeutic phage display-generated molecules.

As in any other field of molecular biology, many innovations have been made in phage display technology since its introduction. Thus, while only N-terminal fusions to M13 pIII were used for phage display in early studies, functional polypeptide display with all five M13 coat proteins has been demonstrated later [6]. Functional display of pathogen-derived proteins attached to C-terminus of M13 pVI was shown by fusing cDNA sequences to 3' end of gene VI expressed by phagemid vector [7]. In another study a fragmented leukocyte cDNA library was displayed on phage allowing the identification of phosphorylated ligands of modular binding domains and their functional interaction [8]. Also, whole genome phage display libraries have been constructed using a pJuFo display system, based on the interaction between the leucine zippers Jun and Fos [9]. This methodology provides a general biochemical approach to functional analysis of protein-protein interactions on a genome-wide basis. Recently, high copy display format for expression of large proteins on the phage was developed [10] by constructing and selecting of M13 pVIII mutant variants fused to human growth hormone. Furthermore, the artificial coat protein mimicking the functions of the natural M13 coat proteins was designed [11], allowing the engineering of the phage for new functions such as expression of foreign proteins fused at carboxy termini of phage proteins.

A detailed understanding of protein-protein interactions is an important part of modern biotechnology and many different mutagenesis strategies have been used for studying protein structure and function. Recently, an extremely rapid combinatorial alanine scanning method, combining the



**Fig. (1).** Schematic view of phage display. First, the DNA sequences coding for peptides, proteins or Ab scFv/Fab fragments are inserted into phage/phagemid vectors to generate phage display libraries. Then, these libraries are used in biopanning against the target coated on the solid surface or against the biotinylated target in solution. In the second strategy the biotinylated target-phage complexes are captured on streptavidin-coated solid phase. Finally, after washing eluted phage particles are subjected to 3-4 rounds of selection/amplification and the selected clones can be used to determine amino acid sequences of expressed molecules as well as isolated phage can be used in various assays, such as ELISA, WB or for immunization.



concepts of alanine-scanning and binomial mutagenesis with phage display and allowing many side chains to be analyzed simultaneously with no need for protein purification or biophysical analysis, was reported [12]. Another interesting development was the identification of D-peptide ligands using the elegant strategy of mirror-image phage display [13]. Importantly, this approach allows the identification of D-peptide ligands, which should be resistant to proteolytic degradation *in vivo* and lead to vigorous humoral immune response. New approaches describing improvements in biopanning procedure have also been reported, such a DNA-based selection strategy consisting in incorporation of phage ssDNA hybridization/selection step into phage display and resulting in selection of more specific Ab ligands [14].

Abs are important components of the immune system and their application in medicine has many decades of history. Therefore, the generation of Ab fragments expressed on the phage in form of Fab and single-chain Fv (scFv) rapidly became an important part of phage display technology. Although the phage display of Ab fragments was developed almost simultaneously with small peptide display, the Ab display required several previous additional findings, such as the demonstration that Fab and scFv could be functionally expressed in bacteria and the identification of large collections of Ab variable region genes. Now it is clear, that application of phage display to Ab technology resulted in an impressive success considering a great potential for the application of phage display-generated Abs in biomedical research and in medicine. During the past decade large (>10<sup>9</sup> original clones) Fab and scFv Ab libraries have been constructed using diverse phage and phagemid expression vectors, the PCR amplification and cloning of Ig genes [15,16].

There are three major types of phage display antibody libraries: immune, nonimmune or naive and synthetic, depending on the source of Ig heavy (VH) and light (VL) variable region genes used for library construction. Immune and nonimmune libraries are generated using V genes from B cells of immunized animal (or from patient B cells) or using Ig V genes isolated from healthy individuals, respectively. Alternatively, libraries of synthetic/semi-synthetic origin can be constructed by PCR-cloning of V gene germline segments artificially provided with diversity by oligonucleotide cloning [16]. In the case of synthetic/semi-synthetic libraries there is no need to use any cells since the Ig Ag-binding site is designed and generated using once amplified V genes and oligonucleotides coding for Ig hypervariable regions (semi-synthetic libraries) or, alternatively, using overlapping oligos coding for both Ig framework and hypervariable regions (synthetic libraries). The rodent mAbs, generated by hybridoma technology, have been considered a good class of natural drugs, although their widespread use as therapeutic agents has been hampered due to the induction of anti-rodent Ab response in patients. Phage display technology offers not only the possibility to humanize rodent Abs consisting in transplantation of Ab Ag-binding segments (called complementarity determining regions, CDRs) from rodent Ig to human ones, but also the easy generation of fully human mAbs. For this reason, the majority of constructed Ab phage display libraries are of human origin. The following step is the isolation of Ag-

specific high-affinity (nanomolar range) phage displayed human mAbs by *in vitro* biopanning against the Ag of interest within a few weeks.

Although scFv and Fab Ab fragments provide an effective and highly specific *in vivo* targeting reagents capable of better penetrating various tissues in the body compared to intact Ab, these monovalent Ab fragments are rapidly cleared from blood due to their small size. To overcome this disadvantage, multimer forms of these molecules, such as diabodies, triabodies and dimeric miniantibodies, showing a higher functional affinity and reduced kidney clearance rates, have been designed [17]. Alternatively, isolated Ab fragments could be grafted into whole Ig molecular context if this is not affecting significantly the features of scFv and Fab fragments mentioned above. Additionally, Ig VH single-domain phage display libraries based on small Ab-derived recognition units, hypervariable loops of Abs, have been designed and constructed [18].

Recently, an intriguing concept was reported by Smith and coworkers where phage expressing thousands of copies of the foreign peptide serves as an interacting scaffold to constrain the peptide into a particular conformation, creating a defined organic surface structure called "landscape" [19]. It was shown that landscape libraries could be used as a new type of substitute Abs-filaments capable of binding to protein and glycoprotein Ags with nanomolar affinities and high specificity.

#### GENERATION OF IMMUNOREAGENTS BY PHAGE DISPLAY

The advantages of phage display technology over other research tools and its great potential have been demonstrated by successful application of phage display in diverse fields of biomedical/clinical research. We will discuss below some pioneering as well as outstanding studies in this field describing the use of peptide and Ab PDL to determine molecular specificities involved in infection and/or in pathogenesis as well as possible therapeutic applications of phage display-derived molecules. Despite many efforts targeted to develop mAbs for disease treatment, only one mAb, anti-CD3 (OKT3), had been licensed for clinical use by 1994. However, in the past seven years the situation has changed dramatically: about ten mAbs have been approved for human treatment and more than 70 mAbs are currently in commercial trials beyond Phase I and Phase II (reviewed in [20]). The contribution of phage display to this success was decisive allowing the easy creation of fully human Abs or Ab fragments for therapy [17]. In an early study, tumor targeting based on scFv Ab selected from a phage display combinatorial library was shown to be efficient [21]. In this case, all known tumor deposits in patients with carcinoembryonic antigen (CEA)-producing cancers were located using an iodine-123 labeled anti-CEA scFv. Also, anti-c-erbB-2 scFv of picomolar affinity has been isolated by molecular evolution of Ig CDRs [22]. In the same way, scFvs to MUC1 recognizing unique epitopes and predominantly binding adenocarcinoma, have been selected

[23]. Recently, a guided selection strategy was used to isolate a pan carcinoma specific Ab [24].

Perhaps, the most exiting recent development in Ab phage display is the selection of internalizing Abs which is required for the success of many targeted therapeutics, such as immunotoxins, immunoliposomes, Ab-drug conjugates and for the targeted delivery of genes or viral DNA into cells. While some Abs exert their therapeutic effects directly, either by inducing apoptosis or by causing growth inhibition, many other Abs require internalization by receptor-mediated endocytosis to deliver the cytotoxic agent into the cytosol. For this purpose, attempts have been made to use phage display libraries for direct selection of peptides and Ab fragments binding cell surface receptors (reviewed in [25]). More recently, Ab libraries have been screened not only for their cell binding capacity but also for their internalization into mammalian cells and it has been shown that the selection is most efficient for bivalent diabodies or scFvs, displayed multivalently on phage [25]. Thus, efficient internalization of scFv specific for growth factor receptor ErbB2 which is overexpressed in many solid tumors, has been shown. Moreover, GFP-expressing phage carrying epidermal growth factor was used to demonstrate receptor-mediated internalization and expression of phage genome-encoded foreign protein in mammalian cells [26].

As well known, mAbs target single epitopes while polyclonal Abs are directed to multiple epitopes. Therefore, in some cases the application of polyclonal Abs instead of mAbs as therapeutic agents is more desirable since mAbs are less efficient at activating effector mechanisms and the likelihood of cell escape variants is higher compared to polyclonal Abs [27]. The application of phage display technology to select polyclonal Abs against microbes, tumor cells and other multiantigen targets was demonstrated. Among numerous improvements in design and generation of scFv molecules and corresponding target structures [17], one approach combining the phage display and the screening of lambda phage cDNA expression libraries technologies and allowing the identification of a target tumor-associated antigen (human CD30 receptor) of a scFv displayed on phage, is of particular interest [28]. Another recently developed methodology is the selection of scFv Abs, blotted on nitrocellulose, applying phage Abs to proteomics [29].

The phage display peptide libraries were extensively used along with phage display Ab libraries in a bioselection procedure known as biopanning (Fig. 1) for the development of therapeutic compounds, for new drug discovery and cancer therapy, either as an antagonist or an agonist of natural ligand-receptor interactions. An important challenge in the development of therapeutic agents is to find a small molecule capable of mediating a desired biological effect. In this respect, the phage display technology permits not only the identification of those molecules which are homologous to natural peptides but also generates functionally similar peptides, called mimotopes, with no homology with any natural Ag sequences. Additionally, phage display-derived mimotopes can mimic even natural epitopes of non-peptidic origin, such as carbohydrates and lipids. The specificities of Abs present in sera of patients were determined using PDLs and cDNA phage display libraries where there was not any

information about the parental Ags [30]. This procedure of profiling of immune responses in patient sera allowed to identify serum Ab binding peptide ligands with diagnostic and therapeutic potential. The generation of peptide ligands specifically recognizing different cell types is an important component of cell-targeting strategies and in recent years impressive findings have been made in this field with the application of PDLs. Cell-specific targeting peptides have been identified by phage display selection against purified cell-surface markers, whole cells in tissue culture, and even tissues within live animals (reviewed in [31]). These fascinating studies resulted in isolation of phage displayed peptides that selectively home to tumor vasculature, seven different mouse organs including brain, lung and uterus [31]. There is a clear perspective for the exploration of the utility of these peptides as drug delivery platforms and for the identification of corresponding peptide-specific receptors. For example, by *in vivo* screening of PDLs, peptides that home to tumor blood vessels were isolated, and when coupled to the anticancer drug doxorubicin, the peptides enhanced the efficacy of the drug against human breast cancer xenografts [32].

In a series of studies, PDLs were screened by biopanning using mono- or polyclonal Abs, and isolated peptide epitopes/mimotopes displayed on phage or in form of synthetic peptides showed specific antigenic and immunogenic features. Two main strategies of biopanning were described: screening of the library against the target coated on the solid surface or against the biotinylated target in solution. In the second strategy the biotinylated target-phage complexes were captured on streptavidin coated solid phase. However, since it has been shown recently that biotinylation of monoclonal antibodies could lead to a reduction in specific binding of the antibodies especially if a lysine residue plays an important role in the binding site of the antibody [33], we could not suggest that biopanning in solution would give better results compared with solid phase selection. We conclude that both strategies should be tried for any given antibody. By the application of these strategies, peptides specific for: 1) mAb against human immunodeficiency virus (anti-HIV-1) [34]; 2) CD18 molecule involved in syncytia formation of HIV-1-infected lymphocytes [35]; 3) pyruvate dehydrogenase complex E2 involved in primary biliary cirrhosis [36] and 4) mAb against fibrocarcoma cells [37] were identified. In our group, we have applied PDLs to identify autoimmune thrombocytopenic purpura (AITP)-[38] and neurocysticercosis-related [39] Ab specificities in serum samples and in cerebrospinal fluids of patients, respectively. We have also identified epitopes/mimotopes of platelet autoantigens using phage peptide libraries, mAbs against platelet glycoproteins and rabbit anti-human platelet polyclonal Abs [40].

The PDLs allow to identify not only linear epitopes but also conformational epitopes by selecting phage displayed peptides that mimic the Ab-reactive sites of Ag formed by amino acids that are distant from each other in primary structure of the Ag but are brought together on the folded molecule. Using phage display, molecular modeling, mutagenesis and mAb, such epitopes have been identified on the diabetes autoantigen GAD65 [41]. Also, PDL was used

to identify peptides specific for distinct conformational states of the estrogen receptor and this may have implications for the development of estrogen receptor antagonists for the treatment of tamoxifen-refractory breast cancers [42]. Finally, using the sophisticated strategy of mirror-image phage display, discussed in previous section, and a synthetic peptide representing a pocket on the surface of HIV-1 gp41 protein, D-peptide inhibitors that target this pocket have been generated [43]. These D-peptides could be useful for the generation of a new class of orally bioactive anti-HIV-1 drugs.

## PHAGE IMMUNOGENS AND VACCINES

Although several research groups have been involved in the exploration of immunogenicity of the phage, the contribution of Perham and coworkers, particularly in early studies, was, perhaps, most important. They showed a successful expression of *Plasmodium falciparum*-derived small peptides in the exposed N-terminal segment cpVIII of recombinant fd phage (2700 copies) and expression of larger peptides of this pathogen on the surface of hybrid fd phage (10-30 % of cpVIII copies) [44]. It was shown that this hybrid phage induced malaria epitope-specific Abs in rabbits. Also, the same group engineered the phage with multiple copies of the peptide sequences from the V3 loop of HIV1 surface glycoprotein gp120 fused into cpVIII of the phage [45]. These phage were recognized by human HIV antisera and elicited high titres of HIV neutralizing Abs in mice. In addition, Ab production could be stimulated by simultaneous inoculation with T-cell epitopes similarly displayed on phage. An interesting strategy was developed by imposing conformational constraints on a peptide epitope from *Chlamydia trachomatis* to improve its ability to elicit Abs in mice that cross-react with native Ag [46]. This was achieved by generating epitope peptide-related phage display library where the epitope's contact residues were subject to randomization and by affinity selecting phage-displayed most native-like peptide epitopes. The above mentioned studies demonstrated that the application of phage expressing epitopes as immunogen is advantageous compared to synthetic peptides, since small synthetic peptides are generally poor immunogens and need to be coupled to a carrier molecule or supplemented with an adjuvant, while phage particles per se are highly immunogenic, capable of activating helper T cells and do not need any adjuvant.

As we have already discussed in a previous section, random peptide libraries displayed on phage allow the identification of both peptides homologous to Ag-derived peptide sequences (so called "true" epitopes) and peptides that do not have any homology with original Ag but are functionally mimicking the Ag-derived peptides (called mimotopes). Based on this unique feature of PDLs, antigenic mimics or mimotopes of hepatitis B virus envelope protein (HBsAg) reacting with a panel of sera from patients have been identified [47]. The immunization of mice with these phage-displayed mimotopes elicited a strong HBsAg-specific Ab response indicating the possibility for the application of disease-related epitope/mimotope discovery strategy to vaccine development, without any use of

pathogen's Ag or even without information about the aetiological agent [47]. The same authors have also compared the humoral immune responses induced in mice by these mimotopes in different molecular contexts: phage cpIII and cpVIII, recombinant human H ferritin, HBV core peptide and multiple antigenic peptides [48]. It was clearly shown that mimotopes displayed on phage were best immunogens inducing the most reproducible and potent immune response. Furthermore, this group has shown that HBsAg and HCV phage displayed mimotopes could induce Ag-specific humoral immune response in mice after intranasal or intragastric administration of phage indicating that recombinant phage could be useful for the development of orally effective vaccines [49].

Surprisingly, despite the data presented above, clearly showing that phage are potent immunogens, the first study demonstrating the use of phage as vaccine was reported until 1997 [50]. In this study, a recombinant phage displaying a B-cell epitope of glycoprotein G of human respiratory syncytial virus was used as a vaccine to confer protection against virus infection in mice [50]. Two years later, we have generated a new type of immunogen by expressing Ig VH domain with all three CDRs replaced by *Taenia crassiceps* T-cell epitope on M13 phage and shown for the first time that phage immunization elicits protective cellular immune response in mice susceptible to pathogen challenge [51]. The very short list of reports describing the application of phage as vaccine could be completed perhaps with another two studies: the report showing the protection of neonatal mice against streptococcal infection using maternal immunization with phage displaying recombinant anti-idiotypic Ab scFv fragments [52], and a recent study, showing for the first time that peptides discovered by phage display selection can be used in the context of phage particles to confer protective Ab-mediated immunity against an infectious agent, in this case in the herpes simplex virus (HSV-2) challenge murine model [53].

There are several other recent studies supporting the view that phage display technology is very useful as a discovery and delivery tool for vaccine development. The high degree of antigenic polymorphism observed in HIV envelope proteins is a serious obstacle in identifying epitopes capable to induce broad neutralizing Ab response. To overcome these difficulties, PDLs were screened using sera from HIV-infected subjects to identify antigenic and immunogenic mimics for HIV-1 epitopes [54]. Several phage displayed mimotopes capable both to recognize the sera from HIV-1-infected subjects and to induce HIV-specific and neutralizing Abs in mice, were identified [54]. In another study, HIV-1 reverse transcriptase-derived cytotoxic T-cell (CTL) epitope was displayed on phage and used to immunize HLA-A2 transgenic mice. These recombinant phage were able to elicit CTL response specific for viral epitope upon immunization [55]. Mimotopes displayed on phage have also been identified for another pathogen with high antigenic polymorphism, hepatitis C virus (HCV). A consensus sequence profile was derived from hypervariable region 1 (HVR1) of different HCV isolates and used to generate a vast repertoire of phage displayed mimotopes [56]. After biopanning using different sera from infected subjects phage clones reacting frequently with patients sera were identified.

Furthermore, when injected into mice, mimotopes with the highest cross reactivity, induced Abs recognizing the panel of natural HVRI variants. Additionally, a sequence pattern responsible for the observed cross-reactivity was identified in these mimotopes, and these findings could be important for the development of vaccine against HCV [56]. Recently, PDLs were successfully used with purified IgE specific for Bet V1, the major birch pollen allergen, to select mimotopes representing artificial IgE epitopes. Mice were immunized with selected phage displayed mimotope resulting in the induction of epitope-specific IgG molecules able to block the IgE binding to the allergen *in vitro* [57]. Thus, a mimotope immunotherapy may represent a new and promising concept for the treatment of type I allergic diseases.

In summary, all data presented here, as well as information available from other sources, are pointing to phage display technology as a powerful tool for the discovery and application of new molecules as important recombinant vaccine components. Interestingly, human phage therapy is hardly new since it was used in several European countries for many decades as a natural part of clinical practice [58]. Lytic bacteriophages, (which are not phages discussed in this review), capable of completely lysing the bacteria being treated (such as *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*), were discovered 80 years ago and were used as antibacterial agents in humans. Due to the recent antibiotic-resistant bacterial infections, which are common worldwide, there is an interest and clear need for the development of antibacterial phages. Today, companies such as Phage Therapeutic International and Intarlytix, among others, are working with naturally occurring as well as genetically modified phage in bacterial drug-resistance and the first human clinical trials in the US will begin this year [58]. Another related issue is the appearance of some recent patents (US5994083, WO9729185A1 and US6054312) describing possible clinical applications of recombinant filamentous phage. Although we are aware that safety or even feasibility issues are not subject of detailed analysis by patenting organizations, the fact per se of applying for such patents by experts in the field is interesting. Thus, the last two observations are indicating that phage in general and recombinant phage displaying biologically relevant molecules are promising candidates to be included in new vaccines.

## CONCLUSIONS

We have attempted to summarize some recent developments in phage display technology, a rapidly growing field of modern molecular biotechnology, promising to have benefits in the development of preventive and therapeutic agents targeting many different disorders, including cancer, viral infections, autoimmune and other diseases.

This technology is allowing to perform some molecular and biological procedures which are difficult or impossible to do by other techniques: fast and easy isolation of disease/pathogen-related peptides/proteins or mAbs using huge peptide/Ab repertoires expressed on phage;

identification of molecules involved in basic biologically important receptor-ligand, protein-protein, protein-DNA, enzyme-substrate and other interactions; generation of phage capable to specifically bind, enter and transduce mammalian cells.

The incorporation of phage display into functional genomic and proteomic applications will surely result in new concepts and strategies in the field of biomedical research and pharmaceutical biotechnology.

## REFERENCES

- [1] Wilson, D. R. and Finlay, B. B. (1998) *Can. J. Microbiol.*, **44**: 313-329.
- [2] Rodi, D. J. and Makowski, L. (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **10**: 87-93.
- [3] Smith, G. P. (1985) *Science*, **228**: 1315-1317.
- [4] Scott, J.K.; and Smith, G.P. (1990) *Science*, **249**: 386-390.
- [5] de la Cruz V. F.; Lai A. A. and McCutchan F. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**: 4318-4322.
- [6] Sachdev, S. S. (2000) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **11**: 610-616.
- [7] Jespers, L. S.; Messens, J.H.; de Keyser, A.; Eeckhout, D.; van den Brande, I.; Gansemans, Y.G.; Lauwereys, M.J.; Vlasuk, G.P. and Stanssens, P.E. (1995) *BioTechnology*, **13**: 378-382.
- [8] Cochrane, D.; Webster, C.; Masih, G. and McCafferty, J. (2000) *J. Mol. Biol.*, **297**: 89-97.
- [9] Palzkill, T.; Huang, W. and Weinstock, G. M. (1998) *Gene*, **221**: 79-83.
- [10] Sidhu, S. S.; Weiss, G. A. and Wells, J. A. (2000) *J. Mol. Biol.*, **290**: 487-495.
- [11] Weiss, G. A. and Sidhu, S. S. (2000) *J. Mol. Biol.*, **300**: 213-219.
- [12] Weiss, G. A.; Watanabe, C.K.; Zhong, A.; Goddard, A. and Sidhu, S.S. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**(16): 8950-8954.
- [13] Schumacher, T. N. M.; Mayr, L.M.; Minor, D.L.Jr.; Milhollen, M.A.; Burgess, M.W. and Kim, P.S. (1996) *Science*, **272**: 1854-1857.
- [14] Bartoli, F.; Nuzzo, M.; Urbanelli, L.; Bellintani, F.; Prezzi, C.; Cortese, R. and Monaci, P. (1998) *Nat. Biotechnol.*, **16**: 1068-1073.
- [15] Griffiths, A. D. and Duncan, A. R. (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **9**: 102-108.
- [16] Hoogenboom, H. R. and Chames, P. (2000) *Immunol. Today*, **21**: 371-378.
- [17] Adams, G. P. and Schier, R. (1999) *J. Immunol. Meth.*, **231**: 249-260.
- [18] Reiter, Y.; Schunk, P.; Boyd, L.F. and Plaksin, D. (1999) *J. Mol. Biol.*, **290**: 685-698.

- [19] Petrenko, V. A. and Smith, G. P. (2000) *Protein Engineering*, **13**: 589-592.
- [20] Glennie, M. J. and Johnson P. W. M. (2000) *Immunol. Today*, **21**: 403-410.
- [21] Begen, R. H. J.; Verhaar, M.J.; Chester, K.A.; Casey, J.L.; Green, A.J.; Napier, M.P.; Hope-Stone, L.D.; Cushen, N.; Keep, P.A.; Johnson, C.J.; Hawkins, R.E.; Hilsen, A.J.W. and Robson, L. (1996) *Nat. Med.*, **2**: 979-984.
- [22] Schier, R.; McCall, A.; Adams, G.P.; Marshall, K.W.; Merritt, H.; Yim, M.; Crawford, R.S.; Weiner, L.M.; Marks, C. and Marks, J.D. (1996) *J. Mol. Biol.*, **263**: 551-567.
- [23] Henderikx, P.; Kandilogiannaki, M.; Petrarca, C.; von Mensdorff-Pouilly, S.; Hilgers, J.H.; Krambovitis, E.; Arends, J.W. and Hoogenboom, H.R. (1998) *Cancer Res.*, **58**: 4324-4332.
- [24] Beiboer, S. H.; Reurs, A.; Roovers, R.C.; Arends, J.W.; Whitelegg, N.R.; Rees, A.R.; Hoogenboom, H.R. (2000) *J. Mol. Biol.*, **296**: 833-849.
- [25] Nielsen, U. B. and Marks, J. D. (2000) *PSST*, **3**: 282-291.
- [26] Kassner, P. D.; Burg, M.A.; Baird, A. and Larocca, D. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **264**: 921-928.
- [27] Sharon, J.; Sarantopoulos, S.; Den, W.; Kao, C.-Y.; Baecher-Allan, C.M.; Santora, K.E.; Sompuram, S.R.; Petersen-Mahrt, S. and Williams, B.R. (2000) *Comb. Chem. High Throughput Screening*, **3**: 185-196.
- [28] Barth, S.; Weidenmuller, U.; Tur, M.K.; Schmidt, M.F.G. and Engert, A. (2000) *J. Mol. Biol.*, **304**: 751-757.
- [29] Liu, B. and Marks, J. D. (2000) *Analytical Biochem.*, **286**: 119-128.
- [30] Sioud, M.; Hansen, M. H. and Dybwad, A. (2000) *Int. J. Mol. Med.*, **6**: 123-128.
- [31] Brown, K. C. (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **4**: 16-21.
- [32] Arap, W.; Pasqualini, R. and Ruoslahti, E. (1998) *Science*, **279**: 377-380.
- [33] Hoyer-Hansen, G.; Hamers, M. J. A. G.; Pedersen, A. N.; Nielsen, H. J.; Brunner, N.; Dano, K. and Stephens, R. W. (2000) *J. Immunol. Methods*, **235**: 91-99.
- [34] Keller, P. M.; Arnold, B.A.; Shaw, A.R.; Tolman, R.L.; Middlesworth, F.V.; Bondy, S.; Rusiecki, V.K.; Koenig, S.; Zolla-Pazner, S.; Conard, P.; Emimi, E.A. and Conley, A.J. (1993) *Virology*, **193**: 709-716.
- [35] Poloni, F.; Puddu, P.; Moretti, F.; Flego, M.; Romagnoli, G.; Tombesi, M.; Capone, I.; Chersi, A.; Felici, F. and Cianfriglia, M. (2001) *Eur. J. Immunol.*, **31**: 57-63.
- [36] Rowley, M. J.; Sealey, M.; Whisstock, J.C.; Jois, J.A.; Wijeyewickrema, L.C. and Mackay, I.R. (2000) *J. Immunol.*, **164**: 3413-3419.
- [37] Popkov, M.; Sidrac-Ghali, S.; Alackov, V. and Mandeville, R. (2000) *Clin. Cancer Res.*, **6**: 3629-3635.
- [38] Gevorkian, G.; Manoutcharian, K.; Almagro, J.C.; Govezensky, T. and Dominguez, V. (1998) *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **86**: 305-309.
- [39] Manoutcharian, K.; Sotelo, J.; Garcia, E.; Cano, A. and Gevorkian, G. (1999) *Clin. Immunol.*, **91**: 117-121.
- [40] Gevorkian, G.; Manoutcharian, K.; Govezensky, T.; Cano, J.A.; Dominguez, V.; Santamaria, H. and Larralde, C. (2000) *J. Autoimmunity*, **15**: 33-40.
- [41] Myers, M. A.; Davies, J.M.; Tong, J.C.; Whisstock, J.; Sealey, M.; Mackay, I.R. and Rowley, M.J. (2000) *J. Immunol.*, **165**: 3830-3838.
- [42] Norris, J. D.; Pauge, L.A.; Christensen, D.J.; Chang, C.-Y.; Huacani, M.R.; Fan, D.; Hamilton, P.T.; Fowlkes, D.M. and McDonnell, D.P. (1999) *Science*, **285**: 744-746.
- [43] Eckert, D. M.; Malashkevich, V.N.; Hong, L.H.; Carr, P.A. and Kim, P.S. (1999) *Cell*, **99**: 103-115.
- [44] Greenwood, J.; Willis, A. E. and Perham, R. N. (1991) *J. Mol. Biol.*, **220**: 821-827.
- [45] Veronese, F. D. M.; Willis, A.E.; Boyer-Thompson, C.; Appella, E. and Perham, R.N. (1994) *J. Mol. Biol.*, **243**: 167-172.
- [46] Zhong, G.; Smith, G.P.; Berry, J. and Brunham, R.C. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**: 24183-24188.
- [47] Folgori, A.; Tafi, R.; Meola, A.; Felici, F.; Galfre, G.; Cortese, R.; Monaci, P. and Nicoai, A. (1994) *EMBO J.*, **13**: 2236-2243.
- [48] Meola, A.; Delmastro, P.; Monaci, P.; Luzzago, A.; Nicosia, A.; Felici, F.; Cortese, R. and Galfre, G. (1995) *J. Immunol.*, **154**: 3162-3172.
- [49] Delmastro, P.; Meola, A.; Monaci, P.; Cortese, R. and Galfre, G. (1997) *Vaccine*, **15**: 1276-1285.
- [50] Bastien, N.; Trudel, M. and Simard, C. (1997) *Virology*, **234**: 118-122.
- [51] Manoutcharian, K.; Terrazas, L.I.; Gevorkian, G.; Acero, G.; Petrossian, P.; Rodriguez, M. and Govezensky, T. (1999) *Infect. Immun.*, **67**: 4764-4770.
- [52] Magliani, W.; Polonelli, L.; Conti, S.; Salati, A.; Rocca, P.F.; Cusumano, V.; Mancuso, G. and Teti, G. (1998) *Nat. Med.*, **4**: 705-709.
- [53] Grabowska, A. M.; Jennings, R.; Laing, P.; Darsley, M.; Jameson, C.L.; Swift, L. and Irving, W.L. (2000) *Virology*, **269**: 47-53.
- [54] Scala, G.; Chen, X.; Liu, W.; Telles, J.N.; Cohen, O.J.; Vaccarezza, M.; Igarashi, T. and Fauci, A.S. (1999) *J. Immunol.*, **162**: 6155-6161.
- [55] De Berardinis, P.; Sartorius, R.; Fanutti, C.; Perham, R.N.; del Pozzo, G. and Guardiola, J. (2000) *Nat. Biotechnol.*, **18**: 873-876.
- [56] Puntoriero, G.; Meola, A.; Lahm, A.; Zucchelli, S.; Ercole, B.B.; Tafi, R.; Pezzanera, M.; Mondelli, M.U.; Cortese, R.; Tramontano, A.; Galfre, G. and Nicosia, A. (1998) *EMBO J.*, **17**: 3521-3533.
- [57] Ganglberger, E.; Grunberger, K.; Sponer, B.; Radauer, C.; Breiteneder, H.; Boltz-Nitulezcu, G.; Scheiner, O. and Jensen-Jarolim, E. (2000) *FASEB J.*, **14**: 2177-2184.
- [58] Wakefield J. The Return of the Phage, *Smithsonian Magazine*, October 2000.

Copyright © 2003 EBSCO Publishing