



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL, ANTIGÉNICA E  
INMUNOGÉNICA DE EPÍTOPOS DE ENVOLTURA DEL VIRUS  
DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1): UN  
ESTUDIO CON LA METODOLOGÍA *PHAGE-DISPLAY***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**M. en C. YADIRA PALACIOS RODRÍGUEZ**

**Director de tesis: DR. KARLEN GAZARIAN**

**MÉXICO, D. F.**

**AGOSTO, 2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **Agradecimientos a:**

Posgrado en Ciencias Biológicas

CONACYT por la beca otorgada para estudios de Doctorado (no.  
162621)

DGEP-UNAM por la beca complementaria para estudios de  
Doctorado

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación  
Tecnológica (PAPIIT-DGAPA, UNAM), proyecto IN207506

Doctores José Álvaro Aguilar Setién y Rogelio Alejandro Alonso  
Morales, miembros del Comité Tutorial que siguieron de cerca la  
evolución del proyecto

Doctores Héctor Enrique Espinosa Arciniega, Francisco Javier  
Sánchez García, Leticia Rocha Zavaleta y Antonio Verdugo  
Rodríguez, por la mejoría que hicieron a este trabajo

Dr. Karlen Gazarian,  
Asesor peculiar, siempre comprometido

## **Reconocimientos a:**

Dr. Abraham S. Majluf Cruz de la Clínica de sida del Hospital General No.1, Gabriel Mancera, IMSS

Dra. Leonor Huerta y su equipo de trabajo en fusión celular

M. en C. Tatiana Gazarian

Q. Carlos Castellanos Barba de la Comisión de Seguridad y de la Unidad de Citometría de Flujo del I.I.Biomédicas

MVZ. Gerardo Arrellín Rosas del Bioterio en el I.I.Biomédicas

\*\*\*

**Esta tesis se desarrolló en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la asesoría del Dr. Karlen Gazarian**

***A los que lo vivieron conmigo***  
***Y.P.R.***

# ÍNDICE

## Resumen/Abstract

## Abreviaturas

### 1. Introducción

1.1 Biología de los fagos filamentosos	2
1.2 Bibliotecas <i>phage display</i> para investigación de epítomos	
1.2.1 Bibliotecas de péptidos al azar (RPL por sus siglas en inglés: <i>Random Peptide Libraries</i> )	3
1.2.2 Bibliotecas de fragmentos de genoma (GFL por sus siglas en inglés: de <i>Genome Fragment Libraries</i> )	4
1.2.3 Bioselección o tamizado	4
1.3 Imitación de epítomos	6
1.4 <i>Phage display</i> en el estudio del VIH-1	7

### 2. Justificación

### 3. Hipótesis

### 4. Objetivos

### 5. Materiales y métodos

5.1 Sueros de pacientes estudiados	11
5.2 Purificación de IgG	12
5.3 Péptidos sintéticos	12
5.4 Anticuerpos monoclonales y anti-suero V3	13
5.5 Bibliotecas de péptidos en fago	14
5.6 Tamizado de bibliotecas ( <i>Biopanning</i> )	14
5.7 Algoritmos para alineación	16
5.8 Ensayos de ELISA	
5.8.1 Reactividad con clonas de fago	16
5.8.2 Reactividad frente a péptidos sintéticos y ensayos de competencia	17
5.9 Inmunización de conejos y ratones con clonas de fago	17
5.10 Ensayos de Fusión celular	18
5.11 Líneas celulares	19
5.12 Cultivo celular	19
5.13 Inducción de la expresión las proteínas de envoltura (gp120/gp41)	20
5.14 Colorantes y tinción de membranas celulares	20
5.15 Ensayo de fusión celular	21
5.16 Cuantificación de la fusión por citometría de flujo	22

### 6. Resultados

6.1 OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS MIMÉTICOS DEL EPÍTOPO INMUNODOMINANTE DE LA gp41 DEL VIH-1	
6.1.1 Antecedentes	23
6.1.2 Determinación del nivel de anticuerpos anti-CSGKLIC en sueros de pacientes	24
6.1.3 Selección de péptidos con IgG de pacientes	27
6.1.4 Tamizado de bibliotecas con IgG de pacientes	27

6.1.5 Relación estructural de los mimótopos seleccionados frente al epítipo ID en la gp41	32
6.1.6 Relación antigénica e inmunogénica de los mimótopos respecto al epítipo ID en la gp41	34
6.2 ANÁLISIS DEL EPÍTOPO RECONOCIDO POR 2F5, ANTICUERPO MONOCLONAL NEUTRALIZANTE DEL VIH-1	
6.2.1 Antecedentes	39
6.2.2 Reactividad del anticuerpo 2F5 frente a péptidos sintéticos	40
6.2.3 Tamizado de bibliotecas con 2F5	42
6.2.4 Inmunización de ratones con mimótopos seleccionados por 2F5	46
6.2.5 Actividad biológica de los sueros hiperinmunes	48
6.2.6 Estructura: implicaciones antigénicas e inmunogénicas	52
6.2.7 Consideraciones adicionales	57
6.3 ESTUDIO DEL DOMINIO PRINCIPAL DE NEUTRALIZACIÓN EN EL ASA V3 DE LA gp120	
6.3.1 Antecedentes	59
6.3.2 Reactividad a péptidos sintéticos y evaluación de actividad biológica	60
6.3.3 Selección de péptidos con IgG de pacientes	63
6.3.4 Inmunogenicidad de mimótopos y evaluación de actividad biológica	67
6.3.5 Anticuerpos neutralizantes en el control del VIH-1	73
<b>7. Discusión</b>	75
<b>8. Conclusiones</b>	85
<b>9. Perspectivas</b>	87
<b>Anexos</b>	
I. Estructura del Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1)	88
II. Datos clínicos de los pacientes estudiados	93
III. Reactividad de sueros de animales	94
<b>Referencias</b>	96
<b>Publicaciones</b>	

## Abreviaturas

<b>ddC</b>	Zalcitabina, antirretroviral inhibidor de la transcriptasa reversa análogo a nucleósido
<b>ddI</b>	Didanosina, antirretroviral inhibidor de la transcriptasa reversa análogo a nucleósido
<b>DPN</b>	Dominio Principal de Neutralización
<b>EFV</b>	Efavirenz, antirretroviral inhibidor de la transcriptasa reversa no análogo a nucleósido
<b>GFL</b>	Bibliotecas de fragmentos de genoma (del inglés: <i>Genome Fragment Libraries</i> )
<b>ID</b>	Inmunodominante
<b>mAb</b>	Anticuerpo monoclonal
<b>MPER</b>	Región externa cercana a la membrana (del inglés <i>membrana-proximal external region</i> )
<b>NAb</b>	Anticuerpo neutralizante
<b>NFV</b>	Nelfinavir, antirretroviral inhibidor de proteasa
<b>RPL</b>	Bibliotecas de péptidos al azar (del inglés: <i>Random Peptide Libraries</i> )
<b>SIDA/sida</b>	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Dada su condición de acrónimo, es correcto usar sida.
<b>TARV</b>	Terapia antirretroviral (en inglés <i>Highly Active Antirretroviral Therapy HAART</i> )
<b>ufp</b>	Unidades Formadoras de Placa
<b>VIH-1</b>	Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1
<b>ZDV</b>	Zidovudina, antirretroviral inhibidor de la transcriptasa reversa análogo a nucleósido



## RESUMEN

Los estudios con la tecnología *phage display* se han centrado en aspectos relacionados con la selección de ligandos, ingeniería de proteínas y mapeo de epítomos. En este último campo, la selección de péptidos miméticos de epítomos (mimótopos) con anticuerpos depende de factores como: los parámetros de la biblioteca (complejidad, tamaño y conformación de los péptidos expresados), las condiciones de bioselección (tamizado) y la concentración de anticuerpo.

Agentes patógenos para los cuales aún existen dificultades para su estudio con métodos inmunológicos convencionales son un blanco interesante para evaluar en conjunto los distintos potenciales de *phage display*. Tal es el caso del VIH-1, un virus con gran variabilidad en sus proteínas de envoltura y con mecanismos efectivos de evasión de la respuesta inmune, características que han obstaculizado el desarrollo de vacunas.

En esta tesis se investigaron tres epítomos del VIH-1 con diferentes propiedades antigénicas, inmunogénicas y estructurales. Como resultado general se identificaron factores que permitieron mejorar los procesos de bioselección reflejándose en la obtención de grandes colecciones de mimótopos. En primer lugar, resultó conveniente el tamizado de varias bibliotecas con diferente formato de expresión de péptidos (lineal o en asa), con objeto de identificar detalladamente las preferencias de unión de los anticuerpos. En segundo lugar, fue necesario definir la concentración mínima de anticuerpo requerida para una selección eficiente de mimótopos al usar preparaciones de anticuerpos policlonales obtenidos de sueros de sujetos VIH-1 positivo.

A continuación se describen los resultados obtenidos para los tres epítomos estudiados: (A) Para el epítomo inmunodominante en la gp41 CSGKLIC tres rondas de tamizado con anticuerpos de pacientes VIH-1 positivo permitieron convertir una biblioteca 12mer lineal de  $10^9$  secuencias diferentes, en una población en la que el 79% de los fagos representaron una familia de mimótopos del epítomo inmunodominante (CSGKLIC). Los 21 mimótopos aislados con la secuencia CxxKxxC (en donde "x" representó aminoácidos variables) reprodujeron la conformación, antigenicidad e inmunogenicidad del epítomo nativo. (B) Para el epítomo ELDKWAS en la gp41 reconocido por el anticuerpo monoclonal neutralizante 2F5, se identificó que dos aminoácidos adicionales a DKW están involucrados en el epítomo mínimo de 2F5, se trata de Ala (DKWA) y Leu (LDKWA). De manera particular, con la biblioteca 7mer en asa, la selección estuvo restringida únicamente a DKWA o LDKWA, a diferencia de la selección con la biblioteca 12mer lineal en donde se obtuvieron péptidos con motivos más largos alrededor de DKW. (C) Para el epítomo principal de neutralización localizado en el asa V3 de la gp120, se encontraron dos secuencias consenso de interés (1) GP/QGP de la biblioteca 12mer lineal y (2) PRxL/MGPG de la biblioteca 7mer en asa, en este último la triada GPG fue invariable. Al usar algunos mimótopos como inmunógenos en conejos y ratones se detectó una respuesta de amplia especificidad frente a péptidos sintéticos del epítomo V3 representativos de distintos subtipos virales, a diferencia de la estrecha especificidad que tuvieron los sueros de pacientes frente a los mismos péptidos. Tres mimótopos en particular: CPRIMGPGC y GPGP/GPGR generaron sueros hiperinmunes en conejos capaces de inhibir hasta en un 20% la fusión celular mediada por el complejo *env* gp120/gp41 y la molécula CD4.

En términos generales, la aplicación de la tecnología *phage display* permitió la obtención y caracterización de colecciones de péptidos que pueden contribuir significativamente a una mejor comprensión de la estructura, conformación y propiedades antigénicas-inmunogénicas de tres epítomos de importancia para la respuesta humoral frente al VIH-1. Los mimótopos representan un nuevo formato de antígenos e inmunógenos con potencial aplicación en nuevos métodos de diagnóstico y como componentes de una futura vacuna.

## ABSTRACT

The use of phage display technology focuses on ligand selection, protein engineering and epitope mapping by means of antibodies. Nevertheless, the capacity of an antibody to select peptides mimicking epitopes (mimotopes) from phage display libraries depends on many factors: the parameters of the library (its complexity, the size and conformation of peptides it displays), the biopanning conditions, and the antibody concentration.

Pathogens raising serious concerns in their investigation by means of ordinary immunological methods may appear good systems for phage display methodology. HIV-1 is one of the most dangerous viruses whose enormous variability and mechanisms developed to evade the immune response requires better investigation to discover its immunological characteristics important for vaccine development.

In this thesis we applied phage display to investigate three epitopes of HIV-1, presenting different antigenic, immunogenic and structural properties, by focusing the study on isolation of mimotopes by means of antibodies they induce in infected individuals. The main results of the study permitted us to understand better the selection process and to propose several practical recommendations for successful obtain high quality mimotope collections. First, for each epitope it is recommended to use several libraries with different length and conformation (linear, constrained) of peptides, in order to determine the preferences of the antibody for mimotopes of its epitope. Second, when polyclonal antibody preparations obtained from HIV-1-positive individuals are used in biopanning experiments, it is important to define the concentration of the antibody of interest and use preparations with sufficient antibody level for efficient mimotope selection.

For three HIV-1 epitopes studied here the following principal results were obtained: (1) For the gp41 non-neutralizing but immunodominant loop-epitope CSGKLIC, three rounds of selection with serum IgG of one of the patients converted the 12 mer library of  $10^9$  linear sequences into a relatively homogeneous population, in which up to 79% of phage bore CxxKxxC sequences ("x" designates a non-epitope amino acid). Twenty-one phage clones displaying the most frequently selected peptides were isolated from this population and shown to display structural (sequence and conformational), antigenic and immunogenic features of the HIV-1 immunodominant loop-epitope. (2) For the gp41 non-immunodominant epitope ELDKWAS, the screening of the 12mer linear and the 7mer constrained libraries with the broadly neutralizing antibody 2F5 have indicated that apart from the DKW core reported in the literature, two additional residues, the Ala (DKWA) and Leu (LDKWA) ELDKWAS residues are involved in minimal epitope of 2F5. When 2F5 screened for structures resembling its natural epitope in a 12mer linear library, it retrieved preferentially peptides with sequences longer than DKW. Furthermore, in constrained 7mer library, the selection was restricted to DKWA or LDKWA only. (3) For the principal neutralizing epitope GPGR located on the gp120 V3 loop, we selected a contingent of phage clones displaying peptides with GPGR-like motifs. The following two motifs, each selected by IgG of two patients, were most interesting: (1)GP/QGP from linear library, and (2)PRxL/MGPG from constrained library were the GPG motif was conserved. When some of the mimotopes were used as immunogens in mice and rabbits, the anti-sera they raised showed in ELISA a strong reactivity with synthetic peptides containing V3 GPGR epitope sequences in the context of different HIV-1 strains, whereas the antibody of patient serum showed a narrow specificity towards particular V3 sequence. The rabbit anti-sera raised against mimotopes CPRIMGPGC and GPGP/GPGR were able to decrease for a 20% the fusion of two Jurkat cell lines expressing on their surfaces either gp120/gp41 complex or CD4 as receptor.

This, the application of phage display technology allowed generation and characterization of several peptide collections that significantly contribute to the present knowledge of the fine structure, conformation and antigenic-immunogenic properties of three important B-cell epitopes of HIV-1. The collections of mimotopes obtained in this study represent novel HIV-1-specific antigens and immunogens which may be useful in diagnosis of the infection and as components of a future vaccine.

Nota aclaratoria:

En este trabajo se ha designado *eluato* (del inglés *eluate*) al sobrenadante con fagos obtenido como consecuencia de eluir aquellos que fueron seleccionados por los anticuerpos. Sin embargo, con base en el *Routledge Spanish Technical Dictionary*, se sugiere que la traducción adecuada es *eluido*.

## 1. INTRODUCCIÓN

Fue en 1985 cuando George Smith demostró que una molécula ajena podía fusionarse a las proteínas de envoltura de fagos filamentosos y que de esta manera, dicha molécula podría expresarse, quedando accesible en la superficie del fago (Smith, 1985). Algunos años más tarde el mismo autor introdujo el concepto de selección por afinidad de moléculas blanco expresadas en los fagos como cuerpos extraños, específicamente péptidos, hecho que desencadenó particular interés en este campo, culminado con la publicación prácticamente simultánea de tres trabajos que describían la generación de bibliotecas de epítomos o péptidos con secuencias al azar (Scott y Smith., 1990; Devlin y cols., 1990; Cwirla y cols., 1990). Desde entonces, *phage display* ha evolucionado rápidamente como una herramienta usada en diversos campos de investigación biológica (Sidhu y cols., 2000; Gazarian, 2005; Mullen y cols., 2006).

Algunos aspectos particulares son los que hicieron novedoso este sistema, entre ellos la inserción de una secuencia de naturaleza peptídica extraña en el sitio apropiado del fago, de forma que permitiera su exposición. Al insertar secuencias al azar, se permitía obtener un gran número de fagos cada uno expresando péptidos con secuencias distintas, todo en un volumen muy pequeño. De manera particular, está el vínculo existente entre el fenotipo (molécula expresada) y el genotipo (secuencia que codifica para cada péptido, insertada en el DNA del fago). Es precisamente esta relación la que permite seleccionar un péptido en particular, replicarlo mediante la infección de *E.coli*, ya que el fago conserva sus características como virus infectivo y obtener prácticamente un número ilimitado de copias. La secuencia de cada péptido puede entonces ser deducida a partir de la secuenciación del DNA de cada clona de fago. De esta forma, el procedimiento de selección simplifica el trabajo realizado con otras metodologías (Sidhu y cols., 2000; Gazarian, 2000).

## 1.1 Biología de los fagos filamentosos

Los bacteriófagos o fagos, son virus que infectan bacterias Gram-negativas a través del pili que usan como receptor. Los fagos filamentosos (Ff) incluyen a las cepas m13, f1 y fd que infectan *E.coli* vía pili F. Contienen una cadena sencilla de DNA rodeada por la proteína de envoltura pVIII de 50 aminoácidos, existen alrededor de 2700 copias de ésta. Por otro lado, está la proteína menor o pIII de la cual se expresan tres a cinco copias, está conformada por aproximadamente 406 aminoácidos. Muy próxima a la pIII está la pVI, ambas participan en el proceso de infección de la bacteria. En el otro extremo del fago están la pVII y la pIX, cada una con cinco copias, participan en el inicio del ensamblaje del fago y son importantes para mantener su estabilidad, (fig. 1) (Russel 1991; Rodi y Makowski, 1999). La expresión de los péptidos en las bibliotecas *phage display* se realiza principalmente sobre pIII y pVIII.

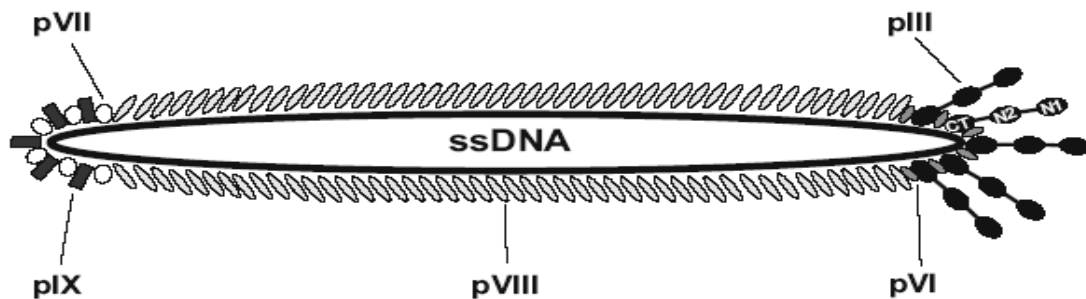


Figura 1. Representación esquemática de un fago filamentososo m13. Tiene aproximadamente 6.5 nm de diámetro y 1  $\mu$ m de longitud. Su cadena sencilla de DNA está contenida en una cubierta cilíndrica de proteínas, señaladas y descritas en el texto. La pIII está constituida por tres dominios (N1, N2 y CT), cada uno conectado por una secuencia flexible (Paschke, 2006).

## **1.2 Bibliotecas *phage display* para investigación de epítomos**

### **1.2.1 Bibliotecas de péptidos al azar (RPL por sus siglas en inglés: *Random Peptide Libraries*)**

El uso de este tipo de bibliotecas ha incrementado de manera exponencial a partir de la publicación de los tres trabajos pioneros de 1990 citados anteriormente. Algunos autores consideran que la principal ventaja de estas bibliotecas es su naturaleza universal (Wang y Yu, 2004). Lo cierto es que la misma biblioteca RPL puede usarse para el mapeo de epítomos por diferentes anticuerpos, para el aislamiento de mimótopos (el término se discutirá más adelante) de proteínas y carbohidratos, y de estudios de diversa índole. Se construyen por la inserción de oligonucleótidos sintéticos al DNA del fago, con cada residuo de aminoácido codificado por un codón degenerado (ya sea NNK ó NNS en donde N=A,C,T ó G; K=G ó T y S=G ó C) e incluye codones para los 20 aminoácidos naturales, más un codón de paro. Las primeras bibliotecas presentaron péptidos lineales propiedad que confiere flexibilidad y configuraciones no estabilizadas. Posteriormente se demostró que la inclusión de cisteínas en los extremos de los péptidos restringía la flexibilidad, además de permitir la formación de asas estabilizadas por puentes disulfuro (O'Neil y cols., 1992). Un dato particular para las bibliotecas producidas por la compañía *New England BioLabs* USA, es que el contenido de cisteínas en los péptidos está disminuido ello para reducir posibles interacciones con las ocho cisteínas constitutivas de la pIII. A pesar de esto, es posible aislar secuencias con cisteínas (Menendez y cols., 2004), hecho que puede ser interpretado como consecuencia de una selección de alta afinidad por la molécula blanco. Estas bibliotecas RPL también han sido denominadas primarias.

### **1.2.2 Bibliotecas de fragmentos de genoma (GFL por sus siglas en inglés: de *Genome Fragment Libraries*)**

Las bibliotecas GFL representan variaciones al azar de la región en particular de una proteína. Se construyen a partir de fragmentos de cDNA generados por digestión con una endonucleasa específica (van Zonneveld y cols., 1995). Debido a que los fragmentos generados por este método son más largos que los usados en RPL, por lo general la expresión de GFLs se hace sobre la pIII aunque en algunos casos también se ha usado la pVIII (Cano y cols., 2004). Estas bibliotecas también son conocidas como secundarias.

### **1.2.3 Bioselección o tamizado**

Típicamente, la selección de fagos por afinidad (*biopanning*, término adoptado para su designación en inglés, mientras que en español se acepta bioselección o tamizado), se lleva a cabo en tres grandes pasos en donde se involucra el uso de un ligando para permitir múltiples interacciones (fig. 2):

1. Periodo de incubación de la biblioteca de fagos con la molécula blanco.
2. Lavados para eliminar los fagos que no fueron seleccionados.
3. Recuperación de los fagos para su amplificación en *E.coli*.

La definición de aspectos como el grado de astringencia en los lavados, el número de rondas de tamizado, así como la concentración de la molécula blanco son factores que contribuyen a la eficiencia del método.

En un sistema ideal, el enriquecimiento de las clonas seleccionadas por la molécula blanco debería estar determinado por la afinidad entre el ligando y el selector, sin embargo, existe una competencia específica de este método que confronta la selección por afinidad con la selección biológica. Está documentado que el crecimiento de los fagos (amplificación) es un proceso dependiente de la capacidad infectiva de cada clona, en

donde el péptido fusionado puede aumentar o disminuir esta propiedad (Rody y Makowsky, 1999). Por lo tanto, es posible que los fagos seleccionados con excelente afinidad al ligando posean baja infectividad y como consecuencia su representación esté disminuida después de cada ronda de amplificación.

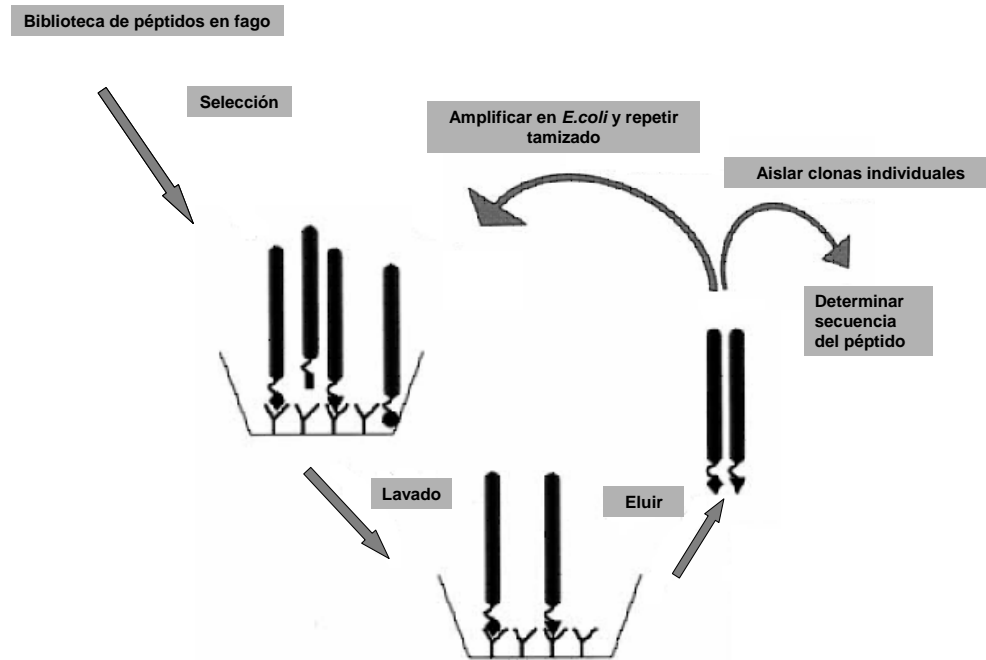


Figura 2. Diagrama que representa una ronda típica de bioselección o tamizado (*biopanning*). La molécula blanco (estructura en forma de Y) representa un anticuerpo inmovilizado a una matriz sólida (modificado de Wang y Yu, 2004).

Otro aspecto fundamental es la definición de la molécula blanco para el tamizado de bibliotecas. Existen numerosas publicaciones reportando el uso de anticuerpos monoclonales (mAb) y policlonales provenientes de sujetos con padecimientos diversos como alergias, enfermedades autoinmunes e infecciosas por parásitos, bacterias y virus (Gazarian, 2005).



### **1.3 Imitación de epítomos**

El término aplicado a los péptidos obtenidos por selección con anticuerpos es el de mimótopo debido a que pueden presentar una secuencia de aminoácidos distinta a la del epítopo original. Se trata de un concepto introducido por Geysen y cols., (1986) en un estudio llevado a cabo con péptidos sintéticos. En este trabajo identificaron que a pesar de que ciertos péptidos poseían una secuencia diferente al epítopo nativo en un antígeno dado, eran capaces de interaccionar con el parátipo de una manera similar a la ocurrida con el epítopo nativo. Este concepto ha madurado con el advenimiento de *phage-display* en el mapeo de epítomos. Los mimótopos obtenidos con esta metodología son capaces de imitar la especificidad frente al epítopo aún presentando combinaciones de aminoácidos diversas. Por otro lado, en los mimótopos es posible también identificar los sitios de contacto imprescindibles para la interacción con la molécula blanco, en particular los denominados residuos críticos de unión en la interacción epítopo-parátipo. Las propiedades de unión han sido analizadas principalmente con base en la estructura primaria de los mimótopos y su relación con la del epítopo original, en la mayoría de los casos la confirmación directa de la relación mimótopo-epítopo se evalúa además con su potencial inmunogénico, es decir, la capacidad del mimótopo para estimular una respuesta humoral *in-vivo* específica para el epítopo original (Wang y Yu, 2004).

A pesar de que el estándar de oro en la definición de epítomos ha sido la cristalografía de rayos X de complejos antígeno-anticuerpo, es una técnica sofisticada que no puede ser aplicada a muchos antígenos y que además requiere de reactivos de alta pureza. Por otro lado, los métodos de mutagénesis no permiten identificar la evolución en los grados de variación, aunado a ello, se corre el riesgo de perder por completo la unión del anticuerpo a las variantes mutadas. Algunas de estas deficiencias pueden ser compensadas con *phage display*, sumado a la generación de

protocolos que permitan integrar otros métodos para el análisis de los mimótopos (O'Connor y cols., 2006). En todo caso, es deseable comprender la relación existente entre la secuencia del mimótopo, su capacidad de unión con el blanco de selección (antigenicidad para el caso de anticuerpos) (Rowley y cols., 2004), la inmunogenicidad y sus características estructurales.

#### **1.4 *Phage display* en el estudio del VIH-1**

Algunos virus como el de inmunodeficiencia humana (VIH) causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), han evolucionado generando mecanismos eficientes de evasión de la respuesta inmune (Rambaut y cols., 2004). La variabilidad en sus proteínas de envoltura representa uno de los principales obstáculos para la generación de agentes terapéuticos eficientes, nuevos métodos de diagnóstico y de una vacuna (McMichael, 2006) (descripción detallada del VIH-1 en el anexo I). La complejidad y el grado de afectación de la pandemia por este agente infeccioso, exigen el desarrollo de nuevas biomoléculas que ayuden a la comprensión de su comportamiento, todo encaminado a la prevención y control de la infección causada por el VIH-1.

Existen diversas investigaciones en este campo aplicando *phage display*, la mayoría de ellas se ha centrado en el uso de anticuerpos monoclonales para el mapeo de epítopos (Keller y cols., 1993; Muster y cols., 1993; di Marzo y cols., 1994; Zwick y cols., 2001a; Menendez y cols., 2004). Mención especial merece la obtención del mAb b12 con esta técnica, aislado originalmente como Fab (Burton y cols., 1991) y posteriormente convertido a IgG1 (IgG1b12) con eficiente actividad neutralizante sobre aislados primarios (Burton y cols., 1994).

La exploración con anticuerpos de sujetos VIH-1 positivo no ha sido tan vasta como el caso de los mAbs, particularmente con el uso de bibliotecas RPL (Scala y cols., 1999; Enshell-Seijffers y cols., 2001). Con los nuevos conocimientos y experiencias previas en el uso de *phage display*

(Gazarian y cols., 2000; 2001a; 2001b; 2003) es posible sugerir que el control de algunos parámetros en los tamizados de bibliotecas así como las características de los anticuerpos para la selección, pueden contribuir a desarrollar tamizados exitosos empleando anticuerpos de sujetos infectados con VIH-1.

Por lo tanto, uno de los primeros retos es lograr desarrollar tamizados tan eficientes como ocurre con la mayoría de los mAbs, existe además la necesidad de evaluar de una manera integral el potencial de los mimótopos aislados. La combinación de diversos métodos de análisis pero sobre todo, el diseño de estrategias diferentes para la selección de mimótopos pueden contribuir a una mejor explotación de *phage-display*, enfocado al estudio de epítomos del VIH-1.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La metodología *phage display* ha evolucionado de forma significativa desde su generación hace más de quince años. Se ha demostrado su potencial en distintas líneas de investigación, sin embargo, la explotación en el mapeo de epítomos y en la generación de nuevas moléculas con actividad biológica se han desarrollado por lo general de manera aislada, dificultando con ello la integración de todos los aspectos posibles de abordar para el estudio de un agente patógeno en particular. Los avances en este campo exigen por tanto la propuesta de nuevas estrategias que permitan integrar simultáneamente conocimientos sobre aspectos diversos. Patógenos para los cuales aún existen graves problemas para su estudio resultan un blanco interesante para abordar los distintos potenciales de *phage display*. Tal es el caso del VIH-1, un virus para el cual los principales obstáculos han sido la gran variabilidad que presenta en las proteínas de envoltura y los mecanismos de evasión de la respuesta inmune. Es por lo anterior que se ha elegido al VIH-1 como objeto de estudio para evaluar la aplicación de *phage display* en la caracterización de epítomos de envoltura, centrando los análisis en tres aspectos en particular: antigenicidad, inmunogenicidad y estructura.

## **3. HIPÓTESIS**

El uso de bibliotecas combinatorias con secuencias de péptidos al azar permitirá caracterizar epítomos de envoltura del VIH-1 mediante la selección por afinidad de péptidos miméticos con anticuerpos anti VIH-1.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 General**

Caracterizar tres epítomos de envoltura del VIH-1 a partir de la selección de sus respectivos mimótopos con anticuerpos anti VIH-1.

### **4.2 Particulares**

- Definir las condiciones óptimas para seleccionar mimótopos de epítomos de envoltura del VIH-1 de bibliotecas combinatorias de péptidos.
- Analizar la estructura de los mimótopos y la homología que presenten con epítomos nativos en el virus.
- Determinar la reactividad específica y cruzada de los mimótopos frente a anticuerpos.
- Evaluar las propiedades antigénicas de los mimótopos.
- Emplear los mimótopos como inmunógenos para determinar la respuesta inmune humoral que generen en animales.
- Evaluar la actividad biológica de los sueros hiperinmunes.
- Proponer mimótopos con potencial de uso como nuevas moléculas de interés biológico.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Sueros de pacientes estudiados**

Se trabajó con sueros de pacientes que acudieron a la clínica de SIDA del Hospital General Regional No. 1 Gabriel Mancera del IMSS, durante los años 1999-2000. Se seleccionaron pacientes mexicanos VIH positivo candidatos a iniciar Terapia Antirretroviral (TARV). Lo anterior se determinó con base en los niveles de linfocitos T CD4+ (definido en esa época con niveles menores o iguales a 350 células/mL). Se excluyeron aquellos pacientes que hubieran recibido TARV previa, que presentaran incapacidad para llevar a cabo la TARV o ambas. Los sueros se prepararon en el hospital y se congelaron a -20°C hasta su uso. Los datos clínicos de cada paciente se presentan en el anexo II. Se definieron tomas de muestras después del inicio de TARV, aproximadamente a las 4, 12 y 24 semanas, con base en los protocolos establecidos en el hospital.

Como testigos se emplearon sueros de sujetos VIH-1 negativo, aceptados como donadores en el Banco de Sangre del Instituto Nacional de Pediatría.

La manipulación de los sueros se hizo siguiendo los reglamentos generales establecidos en las “Normas de bioseguridad para laboratorios de diagnóstico e investigación que trabajan con el VIH”, editadas por la OMS, así como los lineamientos establecidos por la Comisión de Bioseguridad del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Tanto los desechos biológicos como el material usado se sometieron a procesos de desinfección con hipoclorito de sodio al 0.1% de cloro libre o bien a esterilización por vapor, según fuera el caso. Los desechos sólidos se depositaron finalmente en un contenedor apropiado para su incineración.

## 5.2 Purificación de IgG

Se purificó IgG de los sueros de pacientes y testigos, mediante cromatografía de afinidad a la proteína recombinante G en agarosa (GibcoBRL, *Life Technologies*, USA). Para ello, se mezclaron 250  $\mu$ L de proteína G con 500  $\mu$ L de suero, la mezcla se incubó 20 min a temperatura ambiente, homogenizando cada 2 min. Se centrifugó 30 seg a 3000 rpm para desechar el sobrenadante. Se lavó 5 veces con el amortiguador de unión (fosfato de sodio 0.01 M/cloruro de sodio 0.15M, pH 7). Posteriormente, se mezcló con 750  $\mu$ L del amortiguador de elución (glicina-HCl, pH 2.6) para centrifugar bajo las mismas condiciones y obtener el sobrenadante como fracción de IgG, previo ajuste a pH 7 con el amortiguador correspondiente (Trizma-base 1.0 M). La cuantificación de IgG se realizó por el método de Bradford (Bio-Rad *protein assay*). El rendimiento de IgG determinado por ELISA fue del 80-85%.

## 5.3 Péptidos sintéticos

Los péptidos sintéticos se obtuvieron a través del *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, USA*. A continuación se presentan las secuencias con número de catálogo asignado a cada péptido.

Para el estudio el epítipo inmunodominante en la gp41 se usaron seis péptidos que cubrieron la región de aminoácidos 585-619: 6354 VLAVERYLKDQQLLG, 6355 ERYLKDQQLLGFWGC, 6356 DQQLLGFWGC SGKL, 6357 LLGFWGC SGKLICTT, 6358 WGCSGKLICTTVPW, 6359 GKLICTTVPWNASW (números asignados en el catálogo del *NIH AIDS research and reference reagent program* [www.aidsreagent.org](http://www.aidsreagent.org)).

Para el estudio del epítipo de la gp41 reconocido por el anticuerpo monoclonal neutralizante 2F5 se usaron cinco péptidos sintéticos que abarcaron la región de aminoácidos 652-682: 6372 QQEKNEQELLELDKW, 6373 NEQELLELDKWASLW, 6374 LLELDKWASLWNWFD, 6375 DKWASLWNWFDITNW, 6376 SLWNWFDITNWLWYI.

Finalmente, en el estudio del asa V3 ubicada en la gp120 se usaron los péptidos: 8836 EINCTRPNNNTRKSI, 8837 TRPNNNTRKSIHIGP, 8838 NNTRKSIHIGPGRAF, 8839 KSIHIGPGRAFYTTG, 8840 IGPGRAFYTTGEIIG, 8841 RAFYTTGEIIGDIRQ, 1837 CKSIHIGPGRAFYTTGC-NH2, 1839 CKGIRIGPGRAVYAAFYTTEC-NH2, 1841 CTRPNYNKRKRIHIGPGRAFYTTKNIIQAC-NH2, 1840 TRPNYNKRKRIHIGPGRAFYTTKNIIGTIRQAH-NH2.

#### **5.4 Anticuerpos monoclonales y anti-suero V3**

- 2F5: anticuerpo monoclonal humano recombinante anti gp41/VIH-1, producido en células CHO. Isotipo IgG1, donado por el Dr. Herman Katinger (Buchacher y cols., 1994; Purtscher y cols., 1994; Purtscher y cols., 1996).
- 2G12: anticuerpo monoclonal humano recombinante anti gp120/VIH-1, producido en células CHO. Isotipo IgG1. Donado por el Dr. Herman Katinger (Buchacher y cols., 1994; Crawford y cols., 1999; Etemad-Moghadam y cols., 1999; Mascola y cols., 1999; Trkola y cols., 1996).
- 447-52D: Anticuerpo monoclonal anti V3/VIH-1, obtenido de linfocitos B transformados con EBV fusionados con células de heteromioma SHM-D33 donado por la Dra. Susan Zolla-Pazner (Gorny y cols., 1992; 1993; Conley y cols., 1994a; Zolla-Pazner y cols., 1995; Gorny y cols., 1997; Nyambi y cols., 1998).
- WO-07: Suero anti V3/VIH-1<sub>MN</sub> obtenido por inmunización en conejo (female Flemish Giant rabbit) con un péptido sintético correspondiente a los aminoácidos 310-324 de la gp120, asa V3 del VIH-1<sub>MN</sub> (KRIHIGPGRAFYTTKC) donado por el Dr. J. Laman (Laman y cols., 1992; Laman y cols., 1993).



Los reactivos anteriores fueron obtenidos por donación de los doctores citados a través del *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, USA*.

- Anti-CD4 (*BD Pharmigen*) 1µg/µL.

### **5.5 Bibliotecas de péptidos en fago**

Las bibliotecas de péptidos se obtuvieron de *New England BioLabs Inc.* (Beverly, MA, USA). En cada biblioteca los péptidos con secuencias al azar (aproximadamente  $2.7 \times 10^9$  secuencias electroporadas) se fusionaron a la región N-terminal de la proteína III (pIII) del fago m13, unidos a través de la secuencia Gly-Gly-Gly-Ser. Las bibliotecas fueron amplificadas por el proveedor una vez para tener al menos 55 copias (para la biblioteca en asa hasta 200) de cada secuencia en 10 µL, cantidad que corresponde al volumen usado en cada ronda de selección. Las bibliotecas usadas fueron lineales de 12 y 7 aminoácidos (Ph.D.-12 y Ph.D.-7 respectivamente), y en asa de 7 aminoácidos (Ph.D. C7C).

### **5.6 Tamizado de bibliotecas (*Biopanning*)**

El proceso de selección o tamizado de las bibliotecas (*biopanning*), se desarrolló con base en los procedimientos descritos por Smith y Scott, 1993; Dower y Cwirla, 1994; Smith y Petrenko, 1997, con algunos ajustes propuestos por Gazarian y cols., (2001b). Brevemente, se usaron placas de poliestireno de 96 pozos (*Immulon 4 flat bottom plates, Dynatech Lab Inc., USA*). Para cada ronda se sensibilizan dos pozos con 15 y 7.5 µg de IgG por pozo, en 100 µL de PBS (0.01M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.37M de NaCl, 0.027M KCl, pH 7.4) y se incubó a 4°C durante toda la noche con agitación suave. Posteriormente se eliminó la IgG que no se unió y los pozos se lavaron 6 veces con PBS-T (PBS-0.1% Tween 20), a temperatura ambiente, para bloquear con 300 µL de PBS-1%BSA durante 1 hora a 4°C, seguido de 5 lavados consecutivos con PBS-T. Para la selección de péptidos, a 10µL de la biblioteca correspondiente ( $2 \times 10^{10}$  unidades formadoras de placa,

PFU) se adicionaron 190  $\mu$ L de PBS-T, la mezcla se distribuyó entre los dos pozos sensibilizados con IgG (100  $\mu$ L/pozo). La placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave. Transcurrido el tiempo de incubación, el fago no unido se eliminó y los pozos se lavaron 10 veces con PBS-T. El fago unido se eluyó mediante cambio de pH adicionando 100  $\mu$ L del amortiguador correspondiente (0.1N HCl-glicina, pH 2.2). Cuando se trabajó con dos pozos, el fago eluido (en lo sucesivo se denominará eluato), de ambos, se recolectó como un solo eluato para proceder rápidamente a la neutralización de pH mediante la adición de Tris 2M (pH 9.1). El eluato de la primera ronda se cuantificó por titulación en *E. coli* ER2738 (BioLabs) en placas de LB-tetraciclina 20 $\mu$ g/mL. El 75% del eluato se amplificó con la misma cepa de *E. coli*, en 30 mL de 2xYT durante 4.5 horas, a 37°C en agitación. Las células se eliminaron por centrifugación (11,000 rpm, 10 min, 4°C). El fago se recuperó del sobrenadante mediante precipitación con  $\frac{1}{4}$  del volumen de PEG-NaCl (20%/40%), manteniendo toda la noche a 4°C, para transferir a tubos de centrífuga no cónicos y eliminar el sobrenadante por centrifugación (11,000 rpm, 10 min, 4°C). El fago precipitado se resuspendió en PBS y se realizó una segunda precipitación bajo el mismo procedimiento. El fago purificado se resuspendió finalmente en 80-100  $\mu$ L de PBS/0.02% azida de sodio, se tituló (aproximadamente  $10^{12}$ - $10^{13}$  ufp/mL) y se usó para llevar a cabo la segunda y tercera ronda de selección. En estos casos se siguió la misma metodología con la única variante en la solución de lavado en la cual se usó PBS-0.5% Tween 20 (en lugar de 0.1%). El eluato de la tercera ronda se tituló sin amplificar, en placas de LB/x-gal/IPTG para aislar clonas individuales que se amplificaron en 3 mL de 2xYT/*E. coli* ER2738.

En los tamizados llevados a cabo con el mAb 2F5 e IgG del paciente 17 con tres semanas de TARV para cada biblioteca se sensibilizó un pozo con 15 $\mu$ g/100 $\mu$ L de PBS del respectivo anticuerpo en la primera ronda. Para la segunda y la tercera ronda se usó menor cantidad de anticuerpo (7.5 y 3.75  $\mu$ g, respectivamente). En cada caso se trabajó con 10  $\mu$ L de

biblioteca ajustados a un volumen final de 100µL en PBS-T. Todo el procedimiento se desarrolló bajo las condiciones descritas.

De cada clona de fago se purificó DNA de cadena sencilla y se determinó la secuencia empleando el uso de dATP α-S35 (*Perkin Elmer*), iniciadores de secuencia (-28 gIII *New England BioLabs*) y la secuenasa T7 versión 2.0 de la DNA polimerasa (*Sequenase quick-denature plasmid sequencing kit*, USB, USA). La secuencia de aminoácidos de los péptidos se dedujo de la secuencia obtenida de ADN.

## **5.7 Algoritmos para alineación**

Para la alineación de los mimótopos se usó el algoritmo *Pileup-Tudos* (Davies y cols., 1999).

Para definir la relación de los péptidos aislados con los epítomos virales, se emplearon algunos programas desarrollados por Mandava y cols., (2004) para el análisis de colecciones de péptidos seleccionados de bibliotecas combinatorias. RELIC (*Receptor Ligand Contacts*) que involucra el uso de bases de datos y un servidor en línea (<http://relic.bio.anl.gov/>).

## **5.8 Ensayos de ELISA**

### **5.8.1 Reactividad con clones de fago**

La reactividad de las clonas con IgG se avaluó mediante ELISA. Se emplearon placas de 96 pozos (*Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp F96, NUNC Brand Products, Roskilde, Denmark*). Los pozos fueron sensibilizados con fago (100 µL,  $1 \times 10^9$ - $1 \times 10^{10}$  PFU en PBS-50 ng BSA), la placa se incubó toda la noche a 4°C. El fago no unido se eliminó, los pozos se lavaron tres veces con PBS-0.3% Tween 20 para bloquear con PBS-1%BSA, 1h a 37°C. Después de los lavados se incubó con IgG (o el anticuerpo correspondiente) en PBS-0.2%BSA-0.2%Tween 20 (5µg/pozo o bien, la cantidad indicada en cada figura), durante 1 h a 37°C. El anticuerpo unido se detectó usando anticuerpo anti-IgG humana (o el anticuerpo secundario correspondiente) acoplado a fosfatasa alcalina (*Zymed Laboratories Inc., USA*) diluido

1:1000. Como sustrato se usó p-nitrofenil fosfato diluido en amortiguador de dietanolamina (1M, pH 9.8). Después de incubar a 37°C, se determinó la absorbancia a 405 nm en lector automático.

### **5.8.2 Reactividad frente a péptidos sintéticos y ensayos de competencia**

Los pozos se sensibilizaron con péptidos sintéticos preparados en amortiguador de carbonatos (0.2M, pH 9.5), toda la noche a 4°C. Se siguió el mismo procedimiento descrito para ELISA con fago, la única variante fue la solución de lavado, en este caso se usó PBS-0.1% Tween-20.

En los ensayos de competencia el anticuerpo primario se pre-incubó con el competidor (5µg/mL), durante 30 min a 37°C, posteriormente la mezcla se adicionó a los pozos sensibilizados con fago y se continuó el ensayo conforme a lo descrito con anterioridad.

## **5.9 Inmunización de conejos y ratones con clonas de fago**

Se emplearon conejos hembra Nueva Zelanda con un peso promedio de 1.8-2.0 kg. Para la inmunización se administraron 400 µg de fago por conejo equivalente a  $1 \times 10^{13}$  ufp, cuantificadas por infección en *E. coli* (Zwick y cols., 2001b), por vía subcutánea en uno o dos sitios. Las sangrías se hicieron de las venas de las orejas.

En el caso de los ratones se trabajó con hembras de la cepa C57BL/6J de 4 a 6 semanas de edad. La inmunización se realizó con 100µg de fago/ratón ( $2.5 \times 10^{12}$  ufp), por vía intraperitoneal. Las sangrías se hicieron de la cola, previa dilatación de la vena con luz infrarroja.

En diversos estudios se ha documentado que el fago por sí solo tiene propiedades de adyuvante (Willis y cols., 1993; Galfré y cols., 1996) por lo que es suficiente inmunizar sólo con la dosis indicada, usando como vehículo PBS. Sin embargo, algunos autores han sugerido que, si bien se pueden obtener buenos estímulos sólo con fago, el uso del adyuvantes puede incrementar los niveles de linfocitos T cooperadores (di Marzo

Veronese y cols., 1994). Con base en la experiencia obtenida en nuestro grupo de trabajo (Gazarian y cols., 2000; Gazarian y cols., 2003) en todos los casos se decidió inmunizar sin adyuvante, excepto en algunos conejos en donde se administró adyuvante completo e incompleto de Freund (*DIFCO BD, Detroit Michigan, USA*).

Respecto al esquema de inmunización, se siguió el propuesto por Zwick y cols., (2001b), con algunas modificaciones tal como se indica a continuación:

Día 1	Inmunización
Día 21	Estímulo
Día 31	Sangría
Día 41	Estímulo
Día 51	Sangría
Día 61	Estímulo
Día 71	Sangría a blanco

La sangre recolectada se incubó durante 30 min a 37°C y se centrifugó a 3000 rpm, 4°C durante 10 min. Una vez obtenido el suero se conservó en alícuotas a -20°C.

Durante el trabajo con los animales se contó con el apoyo del personal del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, y se siguieron los lineamientos del Código ético para la investigación biomédica, específicamente su Capítulo II: lineamientos para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

### **5.10 Ensayos de fusión celular**

Los ensayos se realizaron con base en el modelo de fusión celular desarrollado por Huerta y cols., (2002), que permite el estudio y la cuantificación de la fusión celular por citometría de flujo (Huerta y cols., 2005; Huerta y cols., 2006; López-Balderas y cols., 2007).

### 5.11 Líneas celulares

- Jurkat HXBc2 (denominadas en lo sucesivo Env+): células linfocíticas Jurkat derivadas de células E6-1 transfectadas para la expresión inducible de los genes *env* y *rev* de la cepa HXBc2 del VIH-1. La expresión de los genes se logró mediante la transfección de un primer plásmido acoplado a un operador de tetraciclina y una secuencia de resistencia a higromicina. Un segundo plásmido codifica para el activador VP16 de citomegalovirus unido a un represor dependiente de tetraciclina y a una secuencia que confiere resistencia a geneticina. Por lo tanto, la ausencia de tetraciclina en el medio induce la expresión del complejo de envoltura del VIH-1 (gp120/gp41) (Cao y cols., 1996).
- Jurkat 522F/Y (denominadas en lo sucesivo 522): Se obtuvo de la misma manera que HXBc2. Expresa una mutante del complejo gp120/gp41 de HXBc2 en donde la fenilalanina 522 del precursor gp160 se sustituyó por tirosina, afectando la funcionalidad del péptido de fusión en el extremo amino terminal de la gp41 (Cao y cols., 1996).
- Jurkat E6-1 (denominadas en lo sucesivo CD4+): No transfectadas. Expresan constitutivamente la molécula CD4.

Las líneas HXBc2 y 522F/Y fueron donadas por el Dr. Joseph Sodroski (*Harvard Medical School, Boston, Mass.*); la línea E6-1 fue donada por el Dr. Robin Weiss. Las tres líneas fueron obtenidas por la Dra. Leonor Huerta del Inst. Invest. Biomédicas-UNAM, a través del *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, USA*.

### 5.12 Cultivo celular

Las células Env+, 522 y CD4+ se cultivaron en suspensión en botellas T-75 (*Cellstar, Greiner bio-one GMBH, Germany*) con medio RPMI 1640 (*Gibco Invitrogen Corp., USA*), suplementado al 10% con suero fetal

bovino (*Gibco Invitrogen Corp., USA*) inactivado a 56°C, durante 30 min; penicilina (50U/mL) y estreptomicina (50µg/mL) (*Gibco Invitrogen Corp., USA*). Únicamente las líneas Env+ y 522 fueron cultivadas en presencia de tetraciclina (1µg/mL), geneticina (200µg/mL) e higromicina (200µg/mL). Los cultivos se mantuvieron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **5.13 Inducción de la expresión las proteínas de envoltura (gp120/gp41)**

Para eliminar la tetraciclina, las células Env+ y 522 se centrifugaron durante 3 min a 1150 rpm y se lavaron dos veces con 40 mL de PBS (1mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 126mM NaCl, pH 7.2). Se resuspendieron en RPMI suplementado (1x10<sup>6</sup> células/mL) adicionando las cantidades correspondientes de geneticina e higromicina, sin tetraciclina. Se mantuvieron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante tres días para obtener un nivel máximo de la expresión de las proteínas gp120/gp41.

### **5.14 Colorantes y tinción de membranas celulares**

Se utilizaron dos colorantes fluorescentes lipofílicos tipo carbocianina: (a) DiO (perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina, *Molecular Probes*) fluorescencia verde-amarilla (Abs/Em 484/501); (b) DiI (perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina, *Molecular Probes*) fluorescencia roja-naranja (Abs/Em 549/565). Para su uso se prepararon soluciones concentradas disolviendo 3.5 mg de colorante/mL de DMSO estéril. A partir de éstas se hicieron las diluciones 1:30 para DiO y 1:10 para DiI, también en DMSO. Las soluciones se conservaron en oscuridad a temperatura ambiente.

Doce horas previas al ensayo de fusión, las células se centrifugaron 3 min a 1150 rpm para ajustarlas en el volumen correspondiente de medio que permitiera tenerlas a una concentración de 5-15x10<sup>6</sup> células/mL de RPMI. A las células Env+ y 522 se les adicionaron 15µL de DiO 1:30/mL de medio. Los tubos se colocaron en agitación inmediatamente, siempre

protegidos de la luz y a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente, se lavaron dos veces con 10 volúmenes de RPMI, se resuspendieron en el mismo medio adicionado de geneticina e higromicina. De esta manera se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta el ensayo de fusión. Las células CD4<sup>+</sup> se marcaron con 5µL de Dil 1:10/mL de medio y se siguió el procedimiento descrito. Las concentraciones de los colorantes se ajustaron evaluando las intensidades de fluorescencia en función del tiempo de conservación de las soluciones concentradas ya que la fluorescencia decae. Teniendo esto en cuenta, las concentraciones finales de los colorantes oscilaron entre 2.5 y 4.0 µM.

### **5.15 Ensayo de fusión celular**

Las células teñidas se centrifugaron y resuspendieron en medio libre de suero (AIM-V, Gibco *Invitrogen Corp., USA*), ajustadas a una concentración de 0.2x10<sup>6</sup>células/0.09 mL. La fusión se realizó en placas estériles de 96 pozos de fondo plano (*Costar, corning, USA*). En cada pozo se colocaron en co-cultivo 90µL de la suspensión de células Env<sup>+</sup> y el mismo volumen de las CD4<sup>+</sup> o bien 522/CD4<sup>+</sup>, siempre en proporción 1:1. Cada pozo se homogenizó perfectamente y la placa se incubó durante 5 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrida la incubación, el contenido de los pozos se transfirió a tubos de FACS con 2mL de PBS para lavar centrifugando a 1100rpm por 3 min. El sobrenadante se decantó y se resuspendió en un volumen final de 300 µL de *FacsFlow (Becton Dickinson, California, USA)*.

Para evaluar el efecto de anticuerpos monoclonales o sueros hiperinmunes de conejos y ratones sobre la fusión celular, éstos se incubaron con las células blanco (Env<sup>+</sup> ó CD4<sup>+</sup> de acuerdo a la molécula blanco de interés) durante 40 min a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente se adicionaron las células correspondientes para el co-cultivo y se siguió con el proceso descrito.



Los ensayos de competencia con péptidos sintéticos se realizaron preincubando en solución el péptido con el anticuerpo correspondiente, durante 40 min a 37°C. El conjugado péptido-anticuerpo se adicionó a las células blanco para el anticuerpo y se incubó nuevamente bajo las condiciones mencionadas. Transcurrido el tiempo se adicionaron las células correspondientes y se prosiguió con el ensayo de fusión.

### **5.16 Cuantificación de la fusión por citometría de flujo**

Las células se analizaron en un citómetro de flujo de Becton-Dickinson modelo *FACScan* usando los programas *Cell-Quest* y *WinMDI* 2.8. La adquisición fue de 10,000 eventos, en el análisis se excluyó la región de restos celulares. La compensación para obtener separaciones óptimas de las poblaciones se realizó con células marcadas no co-cultivadas. Paralelamente se analizaron células no marcadas como control de fluorescencia intrínseca. En cada caso se hicieron los registros de tamaño contra granularidad (FSC-H y SSC-H, respectivamente), fluorescencia verde (FL-1) y roja (FL-2). El porcentaje de fusión basal estuvo determinada con base en el co-cultivo Env<sup>+</sup>-CD4<sup>+</sup> y el control de fusión estuvo dado por el co-cultivo de 522-CD4<sup>+</sup>.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS MIMÉTICOS DEL EPÍTOPO INMUNODOMINANTE DE LA gp41 DEL VIH-1

#### 6.1.1 Antecedentes

El propósito de esta serie de experimentos fue definir las condiciones necesarias para tener una selección de alto rendimiento de péptidos relacionados a una región en particular del VIH-1: el epítipo inmunodominante (ID)  ${}_{603}\text{CSGKLIC}_{609}$  presentado como un asa estabilizada por puentes disulfuro, entre las cisteínas 603 y 609 en el ápice de la gp41. La importancia de esta región radica entre otras cosas en que estimula una fuerte respuesta humoral en aproximadamente el 98% de los sujetos infectados (Gnann y cols., 1987; Goudsmit y cols., 1990; Horal y cols., 1991) misma que no neutraliza al virus; por otro lado esta secuencia es ampliamente usada en reactivos para diagnóstico.

En un estudio previo en donde se aislaron péptidos VIH-1 específicos de bibliotecas *phage display* pVIII usando como blanco de selección sueros de dos sujetos VIH-1 positivo identificados como progresores lentos a sida (del inglés *long term nonprogressors*), con objeto de identificar los epítipos reconocidos por los anticuerpos de esos pacientes, el grupo reportó la obtención únicamente de un péptido asociado a la región ID, sin embargo, esta secuencia solamente presentaba una cisteína por lo que el péptido no podría adoptar la conformación en asa como ocurre en el epítipo nativo (Scala y cols., 1999). En un segundo estudio, usando también bibliotecas pVIII y como blanco de selección el suero de un solo paciente aún sin patología asociada a sida, el grupo reportó el aislamiento de tres péptidos relacionados a región ID. Fue interesante el hecho de que en este caso, las tres secuencias conservaron las dos cisteínas (Enshell-Seijffers y cols., 2001).

Dadas las características de la región ID, su importancia en la gp41, el papel que juega como inductora de respuesta humoral, su utilidad en diagnóstico y con la intención de mejorar la eficiencia de selección de los resultados reportados previamente, en este trabajo se desarrollaron una serie de experimentos usando distintas bibliotecas pIII con secuencias de péptidos al azar. Como blanco de selección se trabajó con sueros de sujetos mexicanos VIH(+) candidatos a iniciar terapia antirretroviral. Bajo la estrategia seguida, fue posible establecer las características de la biblioteca así como el título de anticuerpos en suero necesarios para obtener una selección en alto rendimiento de péptidos miméticos del epítipo ID de la gp41 del VIH-1.

### **6.1.2 Determinación del nivel de anticuerpos anti-CSGKLIC en sueros de pacientes**

Tal y como ocurre en la infección con otros patógenos, el VIH-1 induce una amplia respuesta humoral a los diferentes epítipos de las proteínas virales. Se ha estudiado la especificidad de estos anticuerpos y en términos generales, la mayor parte de la respuesta humoral está dirigida a epítipos de las proteínas de envoltura gp120 y gp41 (Dowbenko y cols., 1988; Goudsmit J., 1988; Burrer y cols., 2005), principalmente a las regiones inmunodominantes en ambas: el asa V3 en gp120 (Dominio Principal de Neutralización, DPN) y el epítipo inmunodominante (ID) en gp41. Respecto a este último, a pesar de que hay anticuerpos contra esta región en una alta proporción de los sujetos infectados, los títulos varían de forma significativa entre cada paciente.

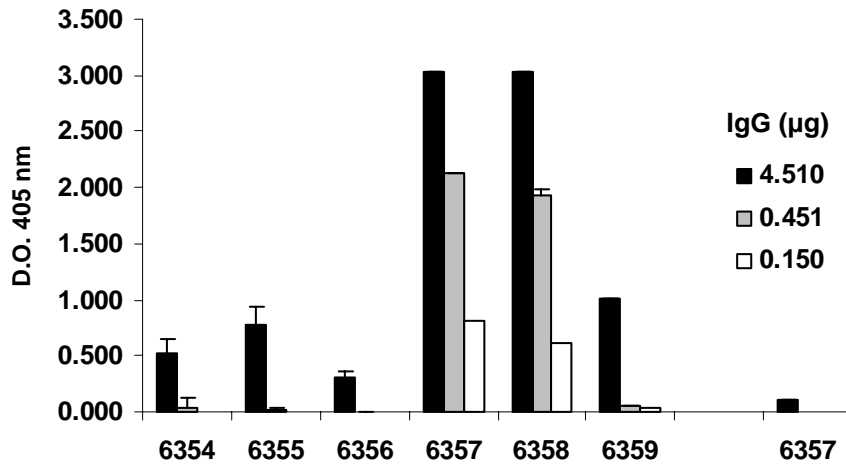
Para llevar a cabo la selección de péptidos relacionados al epítipo ID, empleando como blanco IgG proveniente de sujetos VIH-1 positivo candidatos a recibir terapia antirretroviral (TARV), se evaluó si dicha selección era dependiente del título de anticuerpos en los pacientes. La evaluación del nivel de anticuerpos se llevó a cabo definiendo en primer término la secuencia representativa de esta región, empleando para ello

péptidos sintéticos superpuestos para cubrir la región 585-619 de la gp41, en los que se representaba el asa  $_{603}\text{CSGKLIC}_{609}$  de manera parcial o completa (fig. 3A). De este análisis se pudo observar que con dos de los péptidos (6357 y 6358) se obtuvo la mayor reactividad. Es importante señalar que estas dos secuencias fueron las únicas en presentar el asa CSGKLIC completa. Para llevar a cabo los análisis de títulos de anticuerpos, se eligió el péptido 6357 con la secuencia LLGFWGCSGKLICTT. En esta evaluación se probaron nueve preparaciones de IgG, siete VIH-1 positivo y dos negativas. Dentro de las preparaciones VIH-1 positivo, cuatro de ellas provenían de diferentes pacientes, ninguno de ellos había recibido TARV (fig. 3B: IgG 1-1, 2-1, 3-1 y 4-1). Respecto a la evaluación de reactividad bajo el efecto de TARV, se usó IgG de los pacientes 1 y 3 después de 4 semanas de tratamiento, de éstos dos sólo el paciente 1 presentó reactividad (fig. 3B: IgG 1-2). El resto de preparaciones de IgG correspondió a los pacientes 1 y 3 con 12 y 15 semanas de tratamiento respectivamente y al paciente 3 con 24 semanas de tratamiento. El paciente 1 antes y con cuatro semanas de tratamiento fue el que presentó los niveles más altos de reactividad, seguido del paciente 3 antes de iniciar el tratamiento. Aunque los pacientes 2 y 4 reconocieron la secuencia, los niveles de anticuerpos fueron considerablemente más bajos respecto a los casos anteriores (fig 3B). Con este primer análisis comprobamos por un lado que si bien, los pacientes reconocen el ID en la gp41, este tipo de respuesta no es de la misma intensidad, por otra parte, fue claro que la administración de TARV disminuyó la respuesta hacia esta región, hecho identificado con anterioridad para el asa V3 en la gp120 (Morris y cols., 2001). De nuestro análisis observamos que el efecto del tratamiento fue más lento en el paciente 1, de hecho, aún con cuatro semanas presentó títulos más altos que el resto de los pacientes (fig. 3B).

A.

gp41  
 péptidos sintéticos

6354	585	VLAVERYLKDQQLLGF	603	WG	609	CSGKLI	619	CTTTVPWNASW
6355		ERYLKDQQLLGF		WG				
6356		KDQQLLGF		WG				
6357		LLGF		WG				
6358				WG				
6359								



B.

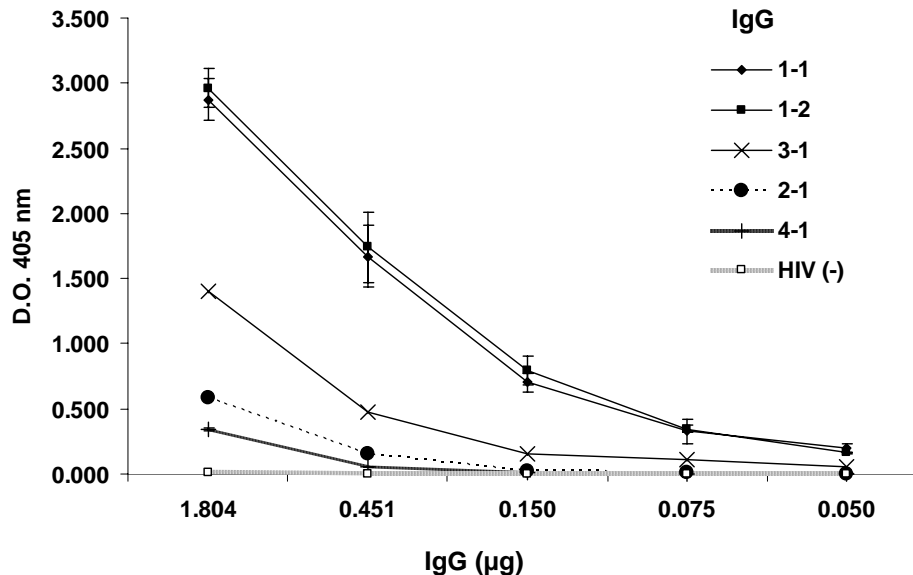


Figura 3. Evaluación del título de IgG de sueros de pacientes contra el epítipo ID en gp41. A) Arriba: secuencia de los péptidos sintéticos superpuestos, se incluyó la región inmunodominante de gp41 (DQQLLGFWGCSGKLI) y aminoácidos adyacentes hacia los extremos N- y C- terminal (aminoácidos 585-619). Los aminoácidos que conforman el asa 603-609 se presentan subrayados. Abajo: Reactividad de IgG pre-TARV del paciente 1 frente a los péptidos sintéticos. B) Titulación de IgG de los pacientes frente al péptido 6357 (LLGFWGCSGKLICTT). Las IgG 1-1, 2-1, 3-1 y 4-1 fueron obtenidas antes de iniciar TARV, la 1-2 corresponde a 4 semanas de TARV. Los ensayos por ELISA se desarrollaron bajo las condiciones descritas en materiales y métodos. El ensayo se desarrolló por duplicado, las barras representan la desviación estándar.

### 6.1.3 Selección de péptidos con IgG de pacientes

Para llevar a cabo la selección se usaron cuatro preparaciones de IgG pre-TARV provenientes de distintos pacientes y cinco preparaciones obtenidas en diferentes etapas de la administración de la TARV. De igual manera, se empleó IgG de los dos sujetos VIH negativo. En total se emplearon once preparaciones de IgG para llevar a cabo el tamizado de tres diferentes bibliotecas de péptidos en fago: lineales de 12 y 7 aminoácidos (12-mer y 7-mer, respectivamente) y en asa de 7 aminoácidos (C7C), dando un total de diez ensayos de tamizado con anticuerpos de pacientes VIH-1 positivo y cuatro con anticuerpos de sujetos VIH-1 negativo (tabla 1).

**Tabla 1. Bibliotecas y preparaciones de IgG usadas. Se presentan los diez ensayos independientes de tamizado con IgG de sujetos VIH-1 positivo y cuatro con IgG de sujetos VIH-1 negativo**

IgG (Paciente/TARV)	Biblioteca	Selección de mimótopos CxxKxxC
1-1 <sup>a</sup>	7 + C7C <sup>f</sup>	No
1-1 <sup>a</sup>	12	Sí
2-1 <sup>a</sup>	12	No
3-1 <sup>a</sup>	12	Sí
4-1 <sup>a</sup>	12	No
1-2 <sup>b</sup>	12	Sí
3-2 <sup>b</sup>	12	No
1-3 <sup>c</sup>	12	No
3-3 <sup>d</sup>	12	No
3-4 <sup>e</sup>	12	No
HIV (-) 1	12, C7C <sup>g</sup>	No
HIV (-) 2	12, C7C <sup>g</sup>	No

<sup>a</sup>: Sin TARV; <sup>b</sup>: 4 semanas de TARV; <sup>c</sup>: 12 semanas de TARV; <sup>d</sup>: 15 semanas de TARV; <sup>e</sup>: 24 semanas de TARV; <sup>f</sup>: mezcla de bibliotecas; <sup>g</sup>: tamizados independientes.

### 6.1.4 Tamizado de bibliotecas con IgG de pacientes

Después del análisis del título de anticuerpos, se decidió usar en primer lugar la IgG del paciente 1 pre-TARV, que presentó el título más alto frente a la secuencia CSGKLIC. A pesar de que el tamaño y la estructura de este epítipo hacían suponer que de las bibliotecas 7-mer

lineal y C7C en asa se podrían obtener péptidos relacionados, al llevar a cabo el análisis de la secuencias aisladas, no se encontró ninguna similitud hacia la secuencia CSGKLIC. Sin embargo, al realizar el tamizado de la biblioteca 12-mer lineal con las diferentes preparaciones de IgG (pre y post-TARV) se obtuvieron resultados positivos. En primer lugar, con IgG de los sujetos VIH negativo no se encontraron secuencias relacionadas al epítipo ni con algún patrón de aminoácidos, tampoco con IgG del paciente 1 después de 12 semanas de TARV. Lo mismo sucedió con el paciente 3 después de 4, 15 y 24 semanas de TARV. Respecto a los análisis pre-TARV, con los pacientes 2 y 4 también fue ineficiente la selección. Se debe recordar que los títulos de anticuerpos con estos dos últimos fueron muy bajos (fig. 3B). Por el contrario, con tres de las preparaciones de IgG dos correspondientes al paciente 1 antes y con 4 semanas de TARV, así como con la del paciente 3 antes del inicio de TARV, se seleccionaron péptidos con el motivo CxxKxxC cuyo patrón de aminoácidos presentó una relación con el epítipo en estudio: CSGKLIC (fig. 4 y tabla 2) donde “x” en los péptidos representa aminoácidos variables.

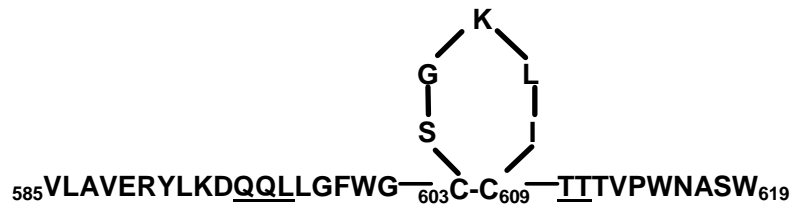
**Tabla 2. Relación de la selección de péptidos CxxKxxC con el título de anticuerpos (IgG) anti CSGKLIC**

Paciente	IgG	Semanas de TARV	Péptidos secuenciados de la 3a. ronda de tamizado			
			Número de péptidos en la muestra	CxxKxxC total (%)/sin repeticiones (%) <sup>a</sup>	Secuencias sin motivo CxxKxxC	IgG(µg)/D.O. 0.5 <sup>b</sup>
1	1-1	0	33	26(79)/13(39)	7	0.075
	1-2	4	30	13(43)/7(23)	17	0.075
3	3-1	0	61	16(26)/8(13)	45	0.45

<sup>a</sup>: número y porcentaje de péptidos con el motivo CxxKxxC en las muestras secuenciadas: total (incluye repeticiones/secuencias únicas).

<sup>b</sup>: Cantidad mínima de anticuerpos (IgG) epítipo-específicos necesaria para seleccionar péptidos con la secuencia CxxKxxC, expresado como µg de IgG que en ELISA frente al péptido sintético con la secuencia CSGKLIC da absorbancia de 0.5.

A.



B.



C.

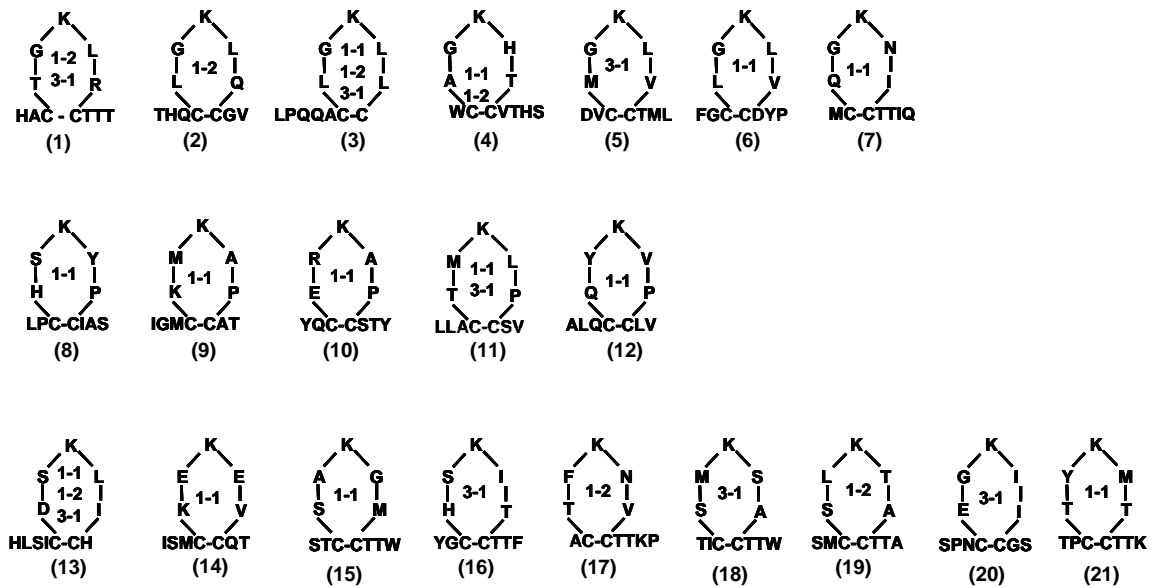


Figura 4. Representación esquemática del epítipo inmunodominante (ID) en gp41 y mimótopos aislados. A) Región ID en gp41 con la representación del asa formada por las cisteínas 603 y 609. Algunos autores han sugerido que los aminoácidos que se presentan subrayados pueden formar parte del epítipo (Xu y cols., 1991; Stiegler y cols., 1995). B) Mimótopo con el motivo CxxKxxC unido por la secuencia GGGs al extremo N-terminal del fago m13. En este caso “x” representa las posiciones de los aminoácidos SGLI, que en los mimótopos fueron ocupadas por otros aminoácidos. C) Mimótopos seleccionados en tres rondas independientes de tamizado con biblioteca lineal 12-mer. Entre paréntesis se indica la numeración consecutiva; en cada asa se especifica(n) la(s) preparación(es) de IgG con la(s) que se seleccionó cada secuencia (IgG 1-1, 1-2 y 1-3).



En la figura 4A se representa la secuencia del epítipo en la gp41 del VIH-1 que incluye el asa formada por las cisteínas 603 y 609. En la figura 4B se sugiere una representación de las secuencias CxxKxxC fusionadas a la proteína III del fago m13. Diversos estudios han evidenciado que es común la formación de asas mediadas por puentes disulfuro en péptidos que contienen dos cisteínas, debido por un lado a la estructura de la pIII del fago así como a la secuencia de unión entre ésta y el péptido (GGGS), ambos elementos brindan flexibilidad para tener distintas conformaciones en los péptidos expresados, entre ellos las asas (O'Neil y cols., 1992; Menendez y cols., 2004). Es así como en la figura 4B se representa la conformación de los péptidos aislados, en los que la presencia de las cisteínas y la lisina en la parte central de las secuencias, confieren un alto potencial para adquirir la misma conformación que en el epítipo original (fig. 4A). La figura 4C presenta la colección de las 21 estructuras aisladas, por su similitud, se trata de una amplia colección de mimótopos del epítipo CSGKLIC, aislados en tres experimentos independientes con IgG de pacientes (tablas 1 y 2).

La IgG pre-TARV obtenida del paciente 1 (designada en tablas y figuras como 1-1) fue la más eficiente, ya que el 79% de las clonas secuenciadas presentó el motivo CxxKxxC (en lo sucesivo CKC). Después de cuatro semanas de tratamiento en este paciente (IgG 1-2), sus anticuerpos fueron capaces de seleccionar nuevamente estructuras con el mismo patrón de aminoácidos aunque en una proporción más baja pues esta vez el rendimiento de mimótopos fue del 43%. Por otro lado, la eficiencia del paciente 3 (IgG pre-TARV 3-1) fue más baja respecto a los dos casos anteriores (IgG 1-1 y 1-2), pues sólo el 26% de las secuencias aisladas presentó relación con esta región. De los 21 péptidos seleccionados debe mencionarse que algunos de ellos se obtuvieron en más de una copia en el mismo experimento o bien, de manera independiente en dos o en los tres experimentos, tal como se indica en el interior de las asas de la figura 4C. La frecuencia de selección de cada uno

de los mimótopos se resume en la tabla 3. Respecto a este punto, es importante mencionar que la selección repetida de algunas secuencias puede ser reflejo de dos hechos: por un lado la alta afinidad de los anticuerpos para seleccionar determinada secuencia, ya que por ejemplo las clonas 3 y 13 fueron seleccionadas por las tres preparaciones de IgG (1-1,1-2,3-1) de estas clonas, la número 3 fue la que se aisló en más alta proporción (12 copias) (tabla 3). Sin embargo, existe por otro lado la posibilidad de que estos péptidos presenten alguna ventaja para la infección de *E.coli* durante la fase de amplificación, hecho que tendría como consecuencia la sobre-representación de algunas clonas en los eluatos.

**Tabla 3. Frecuencia de selección de cada mimótopo con IgG de pacientes**

Mimótopo <sup>a</sup>	Secuencia	IgG/Frecuencia <sup>b</sup>	Total de copias
1	HACTGKLRCTTT	1-2/4; 3-1/1	5
2	THQCLGKLCQGV	1-2/2	2
3	LPQQA <u>CLGKLLC</u>	1-1/3; 1-2/3; 3-1/6	12
4	WCAGKH <u>TC</u> VTHS	1-1/1; 1-2/1	2
5	DV <u>CMGKLV</u> CTML	3-1/2	2
6	FG <u>CLGKLV</u> CDPY	1-1/1	1
7	MCQGK <u>NI</u> CTTI	1-1/1	1
8	LPCHSKY <u>PC</u> IAS	1-1/1	1
9	IGMCKMKAP <u>C</u> AT	1-1/1	1
10	YQCERKAP <u>C</u> STY	1-1/1	1
11	LLACTMKL <u>PC</u> SV	1-1/2; 3-1/2	4
12	ALQCQYK <u>V</u> PCLV	1-1/1	1
13	HLSIC <u>D</u> SKLICH	1-1/1; 1-2/1; 3-1/1	3
14	ISMCKEKE <u>V</u> CQT	1-1/2	2
15	STCSAKGM <u>C</u> TTW	1-1/1	1
16	YGCHSKIT <u>C</u> TF	3-1/1	1
17	ACTFKN <u>V</u> CTTKP	1-2/1	1
18	TICSMKS <u>A</u> CTTW	3-1/2	2
19	SM <u>C</u> SLKTACTTA	1-2/1	1
20	SPNCEGK <u>I</u> ICGS	3-1/1	1
21	TP <u>C</u> TYKMT <u>C</u> TTK	1-1/4	4

<sup>a</sup>: De acuerdo al número asignado en la figura 4C

<sup>b</sup>: Frecuencia: representa el número de veces que se aisló de la tercera ronda de tamizado esa secuencia

### **6.1.5 Relación estructural de los mimótopos seleccionados frente al epítipo ID en la gp41**

El análisis de las secuencias obtenidas se realizó mediante el algoritmo *Pileup-Tudos*, desarrollado para alinear péptidos cortos de bibliotecas *phage display*, seleccionados por anticuerpos policlonales. El algoritmo agrupa con base en secuencia (algoritmo *Pileup*) y en propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos sustituidos (matriz *Tudos*) (Davies y cols., 1999; Gazarian y cols., 2001a). Para llevar a cabo la alineación, además de los 21 mimótopos, se incluyeron las secuencias consenso del epítipo ID correspondientes a los diferentes subtipos del VIH-1: secuencia CSGKLIC presente en los subtipos A, B, C y F; secuencia CSGKHIC subtipos D y G, y secuencia CSGKIIC del subtipo E ([www.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov), en *HIV sequence database*). Fueron incluidas también tres secuencias obtenidas en los dos reportes previos, se trata de las secuencias GTKLVC (Scala y cols., 1999) debido a que originalmente no presentó una de las cisteínas, ésta fue adicionada para el análisis de homología, y otras dos secuencias: CAGKLTC y CLGKMGC reportadas por Enshell-Seijffers y cols. (2001). Como control interno para la alineación, la secuencia original del epítipo fue incluida por duplicado, al igual que nuestro mimótopo CAGKHTC (fig. 5).

Como resultado de la alineación se obtuvo en primer lugar que todos los subtipos fueron alineados juntos (en el centro del dendograma, marcados en la figura 5 como “ep”). Alrededor de éstos se ubicaron las secuencias con mayor homología, conforme se alejaron del centro la homología disminuyó. Es interesante observar que todas las secuencias que contienen prolina (mimótopos 8-11) fueron alineados en los extremos del dendograma. Por otro lado, algunos de los mimótopos con más alta frecuencia de selección (1,3 y 13, tabla 3) resultaron cercanos al epítipo en la alineación, lo que sugiere una estrecha relación de estas variantes con el epítipo nativo.

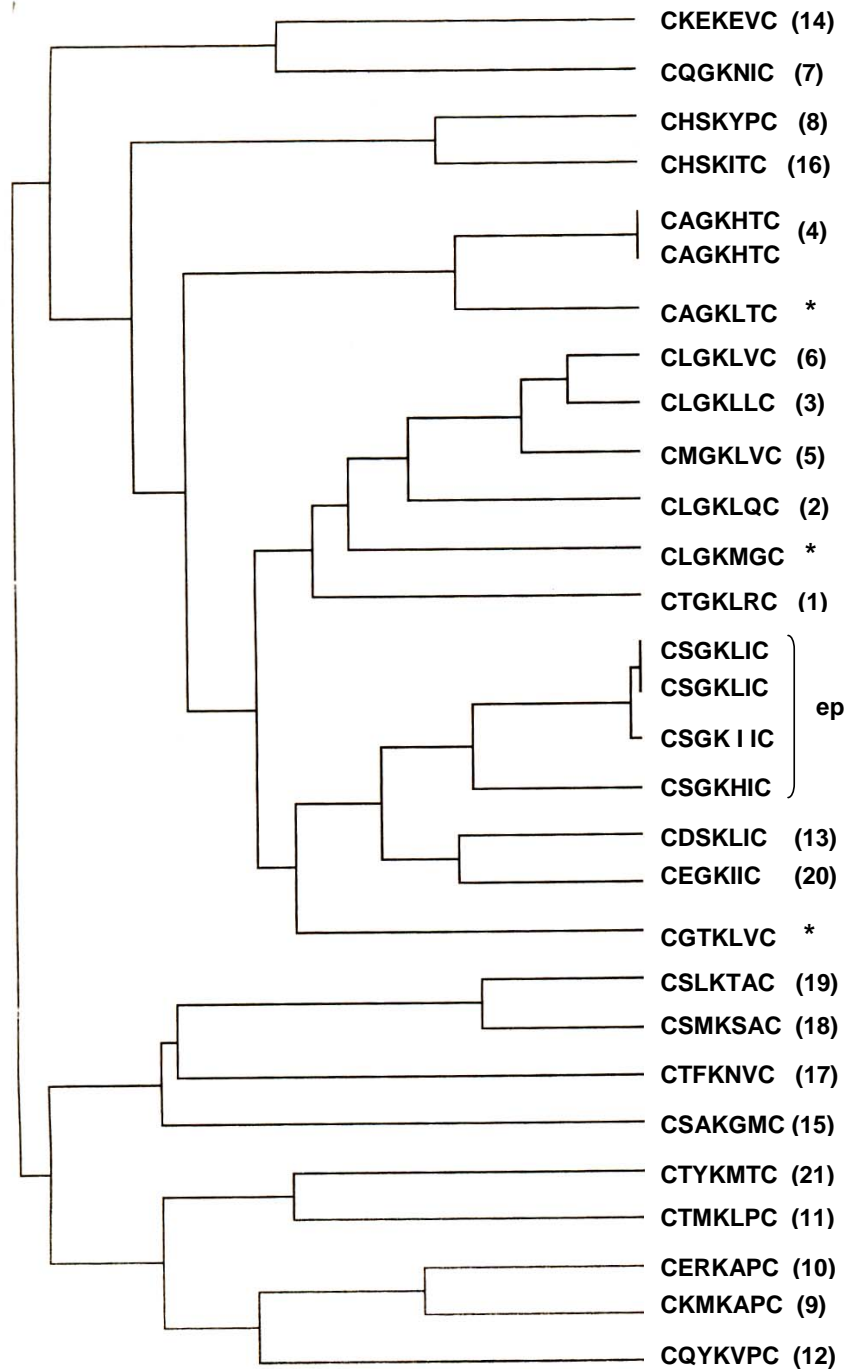


Figura 5. Alineación por homología entre los mimótopos y el epítipo ID en la gp41 de los diferentes subtipos virales. La alineación se realizó con el algoritmo *Pileup-todos* por la Dra. M. Rowley (*Monash University, Australia*). Se incluyeron las secuencias CSGKLIC (subtipos A,B,C y F), CSGKHIC (subtipos D y G), y CSGKIIC (subtipo E). Con (\*) se indican los mimótopos obtenidos en otros trabajos: GTKLVC seleccionado por Scala y cols., (1999), para efecto de este análisis se le adicionó la cisteína; CAGKLTC y CLGKMGC aislados por Enshell-Seijffers y cols., (2001). Entre paréntesis se especifican los números asignados a los 21 mimótopos tal y como se hizo en la figura 2C. El epítipo CSGKLIC y el mimótopo CAGKHTC se incluyeron por duplicado como control interno de alineación.

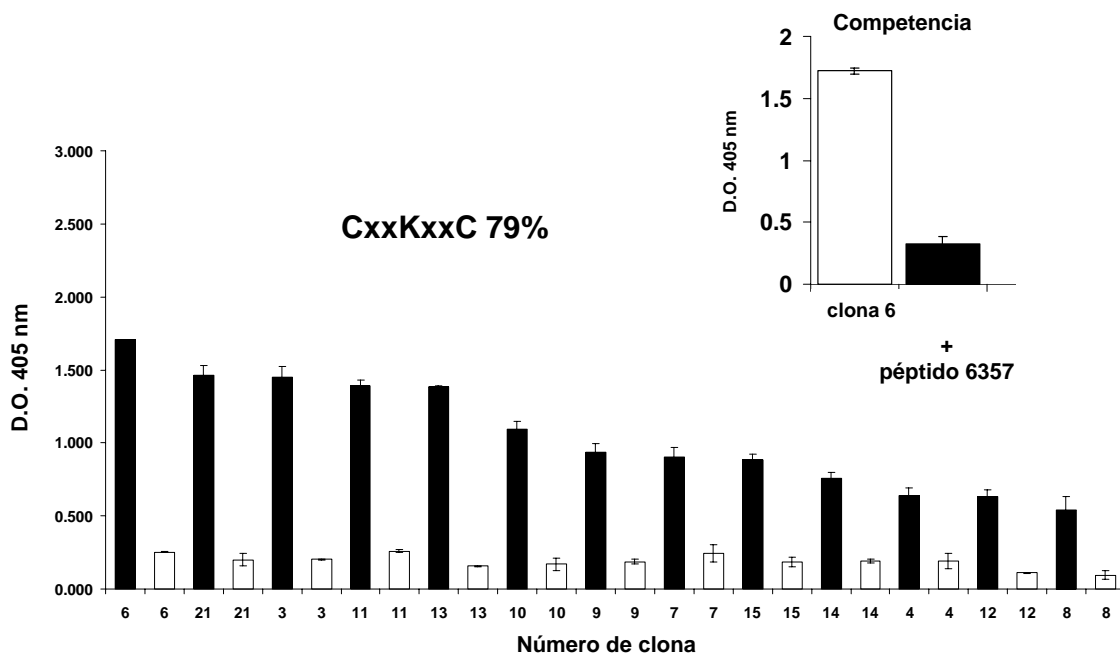
### **6.1.6 Relación antigénica e inmunogénica de los mimótopos respecto al epítipo ID en la gp41**

La antigenicidad de los mimótopos se determinó evaluando la capacidad de unión frente a una de las preparaciones de IgG con la que se hizo la selección (IgG 1-1). Como se observa en la figura 6A, los niveles de reconocimiento fueron altos, inclusive tres ó cuatro veces mayores respecto a los controles que para este ensayo fueron las mismas clonas frente a IgG VIH negativo. Es importante mencionar que con las IgG 1-2 y 3-1 se obtuvieron niveles de reactividad similares a la IgG 1-1 (resultado no presentado). Para confirmar que la interacción IgG-mimótopo estaba mediada por el motivo CxxKxxC, se llevó a cabo un ensayo de competencia representado por uno de los mejores mimótopos (no. 6) con el péptido sintético 6357 representativo del epítipo (fig. 6A, extremo superior derecho). En presencia del péptido sintético la reactividad frente al mimótopo disminuyó, con lo que se verifica que el reconocimiento hacia los mimótopos es específico para el motivo CxxKxxC.

Para evaluar las propiedades antigénicas de los mimótopos por diferentes pacientes, nuevamente se eligió el de mejor reconocimiento, número 6 FGCLGKLVCDPPY, para enfrentarlo a 22 preparaciones de IgG provenientes de pacientes seropositivos sin antecedentes de TARV (fig. 6B). En términos generales, el mimótopo presentó buenos niveles de reconocimiento por al menos 18 de las preparaciones de IgG, esto concuerda con los niveles de detección reportados para péptidos sintéticos (Pan Chan Du y cols., 2002).

Una de las propiedades que se ha explotado de los péptidos obtenidos de bibliotecas *phage display*, ha sido su capacidad para reproducir las propiedades inmunogénicas del epítipo al que están relacionados (Pincus y cols., 1998; Grothaus y cols., 2000; Gazarian y cols., 2001b; Beenhouwer y cols., 2002; Hernández y cols., 2002; Gazarian y cols., 2003; Hou y Gu, 2003; Melzer y cols., 2003; Prinz y cols., 2004).

A.



B.

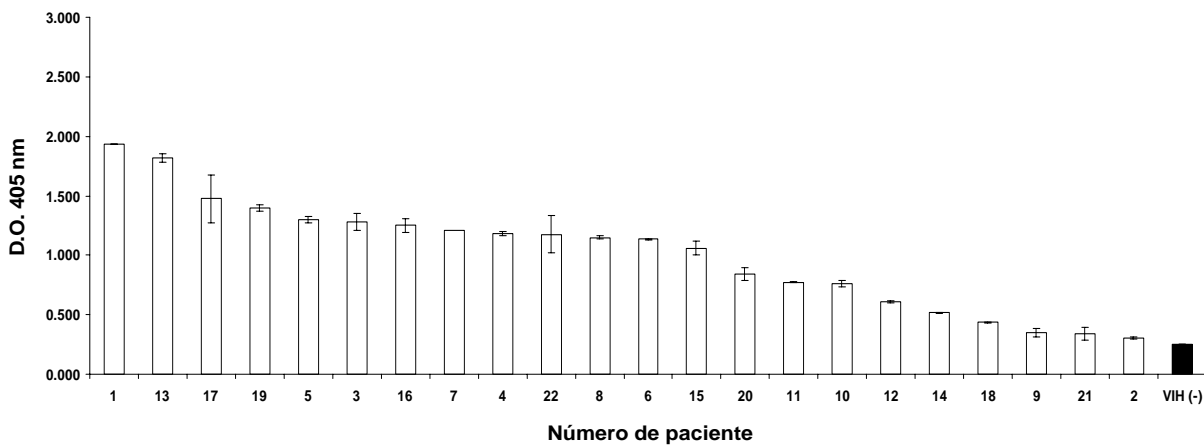


Figura 6. Evaluación de antigenicidad. A) Reactividad por ELISA de IgG 1-1 frente a los 21 mimótopos (barras negras). Como control, los mimótopos se enfrentaron a IgG VIH (-) (barras blancas). El número de clona corresponde al asignado en la figura 2C. En el extremo superior derecho se presenta el ensayo de competencia entre el péptido sintético 6357 LLGFWGCSGKLICTT y el mimótopo 6 (FGCLGKLVCDPPY). B) Mimótopo no. 6 usado como antígeno para inmunodetección frente a un panel de 22 IgG pre-TARV (barras blancas), como control IgG VIH(-) (barra negra). El ensayo se realizó por duplicado, las barras representan desviación estándar.

Lo anterior se ha evaluado incluso para tratar de generar anticuerpos neutralizantes contra VIH (Scala y cols., 1999). Tanto las características brindadas por la forma de expresión en el fago m13, así como sus relaciones estructurales han permitido el uso de los mimótopos como inmunógenos en animales de laboratorio, teniendo como resultado la generación de buenos títulos de anticuerpos (Dorgham y cols., 2005). Con este argumento y para comprobar las propiedades inmunogénicas de la colección de mimótopos se inmunizaron ratones para posteriormente enfrentar los sueros hiperinmunes al péptido 6357 representativo del epítipo. Se inmunizaron cuatro grupos de tres ratones cada uno, a dos de los grupos se les administraron clonas individuales (números 3 y 6), bajo las especificaciones señaladas en materiales y métodos. Por otro lado, debido a la alta representación de estas secuencias en los eluatos de la tercera ronda, se decidió incluir los eluatos amplificados de los pacientes 1 (eluato 1-1) y 3 (eluato 3-1), (fig. 7).

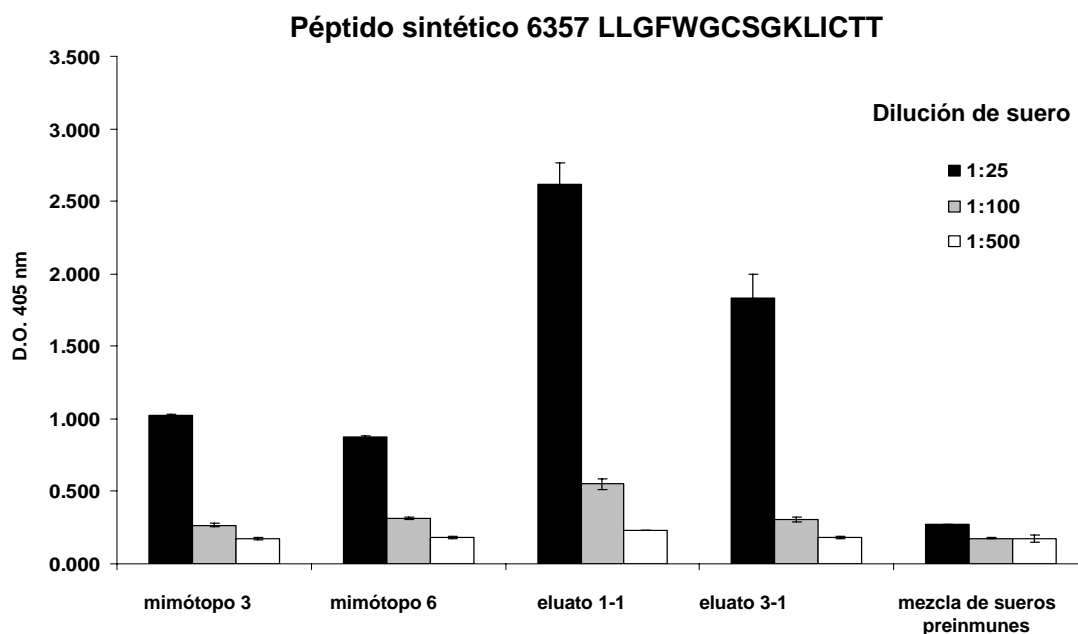


Figura 7. Evaluación de la inmunogenicidad de los mimótopos. Los sueros inmunes de ratones se enfrentaron al péptido 6357 representativo del epítipo. Los resultados representan el resultado de la mezcla de los sueros de los tres ratones de cada grupo en las diluciones indicadas. Los mimótopos usados para inmunizar fueron 3 y 6 y los eluatos de tercera ronda de tamizado de los pacientes 1 y 3 (IgG 1-1 y 3-3 respectivamente). Como control se usó una mezcla de sueros preinmunes.

Los dos mimótopos que se usaron de manera individual indujeron una cantidad de anticuerpos similar ya que prácticamente se obtuvo el mismo nivel de reactividad (fig. 7). Por el contrario, los eluatos amplificados indujeron niveles de anticuerpos más altos respecto a los dos casos anteriores. Más aún, la respuesta generada con el eluato del paciente 1 fue mayor respecto al paciente 3, hecho que concuerda con el porcentaje de clonas con el motivo CxxKxxC, ya que con el paciente 1 fue del 79% mientras que con el paciente 3 fue del 26% (tabla 2). Aún cuando los mimótopos individuales generaron una respuesta de menor intensidad respecto a los eluatos, debe mencionarse que las dos clonas elegidas presentaron alta reactividad al interaccionar con IgG del paciente 1 (fig. 6A), de igual manera, estas dos secuencias resultaron estrechamente relacionadas en la alineación (fig. 5). Con estos resultados es posible entonces sugerir que los mimótopos aislados son capaces de inducir en el modelo murino de inmunización, anticuerpos con especificidad similar a la que el epítipo ID de gp41 induce en los pacientes, es por ello que los sueros de los ratones reconocieron la secuencia  ${}_{597}\text{LLGFWGCSGKLICTT}_{611}$  tal como ocurrió con los pacientes (fig. 3), de esta manera, con los mimótopos se obtuvo una respuesta comparable a la que genera el epítipo nativo en los sujetos infectados. Cabe señalar que durante la inmunización con los mimótopos, se generaron títulos altos de anticuerpos dirigidos hacia el fago m13 (del orden de 1:100,000, determinado por ELISA frente al fago completo, resultado no presentado). Es importante tener en mente este comportamiento pues al usar la estructura fago más péptido, la mayor parte de la respuesta está dirigida hacia las proteínas del fago y en menor proporción se generan anticuerpos hacia el péptido. De hecho, esta propiedad le confiere características de adyuvante, por lo que en los esquemas de inmunización no se incluye el uso de éste.

Considerando de forma global los resultados, en primer lugar es interesante haber aislado secuencias del tipo CxxKxxC de una biblioteca



de péptidos lineales porque ya se ha comentado el hecho de que en estas bibliotecas el contenido de cisteínas es menor respecto a otros aminoácidos, por lo que su selección es consecuencia de una interacción con el anticuerpo que exige la conformación en asa. En segundo lugar, la eficiencia de selección en todos los casos fue proporcional al título de anticuerpos en los pacientes, es decir, la mayor proporción de mimótopos (79%) se obtuvo con el paciente 1 (IgG 1-1) cuyo nivel de anticuerpos fue el más alto, seguido de IgG 1-2 (43%) y finalmente IgG 3-1 (26%) (fig. 3B, tabla 2). Con estos datos se puede sugerir que la falla en la selección con el resto de pacientes se debió a un bajo título de anticuerpos.

Con base en los estudios publicados para este epítipo en la gp41 (Gallaher y cols., 1989; Oldstone y cols., 1991; Stigler y cols., 1995; Pan Chan Du y cols., 2002), los mimótopos descritos reproducen de manera eficiente la secuencia y estructura del epítipo nativo, en los que resultan críticos tres aminoácidos para la unión con los anticuerpos: las dos cisteínas que permiten la conformación en asa y la lisina en la parte central. Desde luego, una comparación estructural entre la conformación de estas secuencias y el epítipo será de gran valor para reforzar estas observaciones.

## 6.2 ESTUDIO DEL EPÍTOPO RECONOCIDO POR 2F5, ANTICUERPO MONOCLONAL NEUTRALIZANTE DEL VIH-1

### 6.2.1 Antecedentes

El mAb 2F5, se obtuvo de un paciente VIH-1 positivo, asintomático, del cual no se reportaron más datos clínicos. 2F5 es uno de los pocos anticuerpos que presenta una potente y amplia actividad neutralizante frente a cepas de laboratorio y virus asilados de pacientes (Muster y cols., 1993; Conley y cols., 1994b; Muster y cols., 1994; Purtscher y cols., 1994, Trkola y cols., 1995; Purtscher y cols., 1996). La investigación con anticuerpos neutralizantes para el control del VIH-1 ha recobrado fuerza en los últimos años, entre otras cosas debido a que se ha demostrado que pueden conferir protección con esquemas de inmunización pasiva y con uso de cocteles (Trkola y cols. 1995., Conley y cols., 1996; Mascola y cols., 1999, Hofman-Lehmann y cols., 2001; Zwick y cols., 2001c; Stiegler y cols., 2002, Nakowitsch y cols., 2005), pero sus niveles son muy bajos en sujetos infectados (Calarota y cols., 1996; Haynes y cols., 2006; Stiegler y Katinger 2003).

El mAb 2F5 reconoce el epítipo  ${}_{662}\text{ELDKWA}_{667}$ , una secuencia presente en la gp41, denominada también región externa cercana a la membrana (MPER por sus siglas en inglés de *membrane-proximal external region*) (Muster y cols., 1993; Purtscher y cols., 1994, Purtscher y cols., 1996). Sin embargo, en estudios desarrollados con diversas técnicas entre las que se incluyen mapeo con péptidos sintéticos (Biron y cols., 2002; Joyce y cols., 2002; Tian y cols., 2002; Barbato y cols., 2003), *phage display* (Zwick y cols., 2001d; Menendez y cols., 2004) y protección frente a la degradación por proteasa (Parker y cols., 2001), se ha sugerido que el epítipo podría estar conformado por una secuencia más larga comprendida entre los aminoácidos 656-671 NEQELLELDKWASLWN. Como resultado de los análisis del epítipo y mediante la definición del cristal del complejo anticuerpo (Fab)-péptido ( ${}_{657}\text{EQELLELDKWASLW}_{670}$ ),

se han definido otros aspectos importantes. En primer lugar, el epítopo presenta dos giros  $\beta$  tipo I entre los residuos D<sub>664</sub> y A<sub>667</sub> y entre W<sub>666</sub> y L<sub>669</sub>. En segundo lugar, la secuencia se encuentra estabilizada por tres puentes de hidrógeno entre D<sub>664</sub>-W<sub>666</sub>, D<sub>664</sub>-A<sub>667</sub> y W<sub>666</sub>-L<sub>669</sub> (Ofek y cols., 2004). También ha quedado establecido y prácticamente aceptado por diversos grupos de investigación, que la secuencia mínima requerida para la interacción epítopo-parátipo es DKW en donde la K<sub>665</sub> puede ser sustituida por R; más aún, se ha propuesto que el parátipo de 2F5 está formado por dos regiones funcionalmente distintas, una específica para DKW y otra multiespecífica es decir, reconoce múltiples secuencias alrededor de la triada DKW (Menendez y cols., 2004). Adicionalmente, se ha reportado que el efecto neutralizante de 2F5 reside en estos tres aminoácidos (Zwick y cols., 2005).

La principal controversia ante la definición del epítopo reconocido por 2F5, radica en el hecho de que ninguna de las secuencias propuestas ha resultado un buen inmunógeno, es decir, bajo ninguna estrategia la secuencia ELDKWA con las diversas variantes identificadas ha funcionado para generar anticuerpos que reproduzcan la actividad neutralizante de 2F5 (Muster y cols., 1994; Buchacher y cols., 1994; Eckhart y cols., 1996; Lu y cols., 2000; Dong y cols., 2001). Aún cuando es indiscutible la propiedad de 2F5 como anticuerpo neutralizante, hay aspectos del epítopo que lo hacen atractivo para continuar con su estudio, por ejemplo: se trata de un epítopo continuo, es altamente conservado y su cercanía a la membrana le imparte características particulares. Es por ello que en este trabajo se empleó el mAb 2F5 para el análisis con bibliotecas *phage display* (de tipo pIII) que no fueron usadas anteriormente.

### **6.2.2 Reactividad del anticuerpo 2F5 frente a péptidos sintéticos**

Con objeto de definir los requerimientos para obtener un reconocimiento óptimo de 2F5 frente a péptidos sintéticos lineales alrededor de la secuencia ELDKWA, se evaluó la reactividad de 2F5 frente

a péptidos de 15 aminoácidos con secuencias superpuestas para cubrir la región 652-682 de la gp41 (fig. 8). El péptido más reactivo fue el 6373 con la secuencia NEQELLELDKWASLW que incluye ELDKWA en la región central y cuya secuencia completa representa el epítipo definido por Parker y cols., (2001). Una reactividad menor pero significativa se obtuvo con el péptido 6374 que también contiene ELDKWA pero integra más aminoácidos hacia la región C-terminal. En este mismo ensayo es interesante observar que aunque los péptidos 6372 y 6375 presentan de manera parcial ELDKWA, es decir ELDKW para el primero y DKWA en el segundo caso, prácticamente no hubo reconocimiento. El mismo comportamiento se obtuvo frente a la secuencia 6376 que representa una región rica en triptofano reconocida por otro anticuerpo neutralizante: 4E10 (Stiegler y cols., 2001). Es probable que los aminoácidos que rodean al motivo ELDKWA influyan en la interacción con 2F5 y que por ello se presenten las diferencias de reactividad.

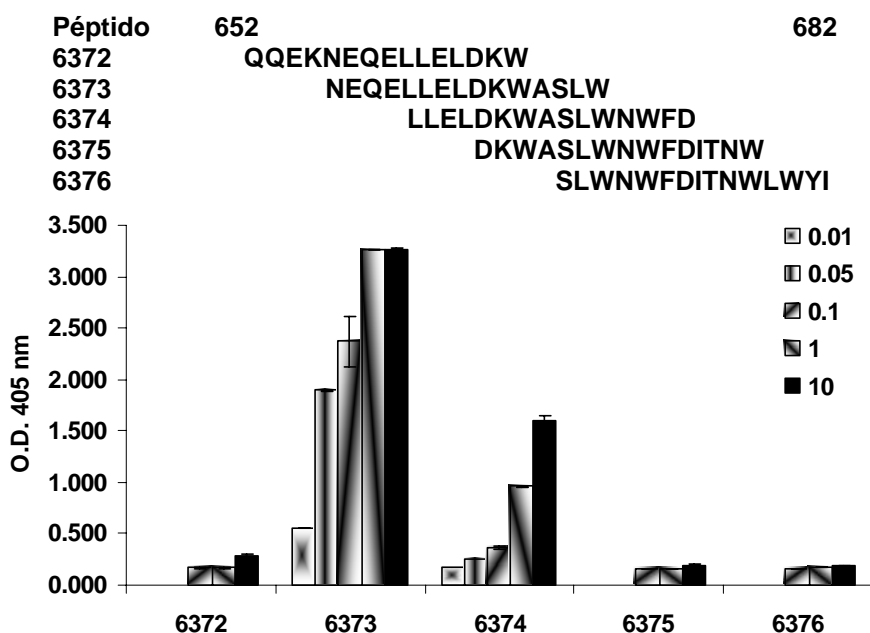


Figura 8. Determinación de las fronteras de la secuencia reconocida por el mAb 2F5. La figura muestra la reactividad del mAb 2F5 frente a péptidos sintéticos con secuencias superpuestas que rodean a la región ELDKWA. Arriba: Secuencias de los péptidos sintéticos que abarcan la región externa y próxima a la membrana viral (aminoácidos 652-682) en la gp41. Abajo: reactividad por ensayo de ELISA. Los péptidos se usaron a una concentración de 20µg/mL por pozo frente a las concentraciones indicadas de 2F5. El ensayo se realizó bajo las condiciones descritas en materiales y métodos.

### **6.2.3 Tamizado de bibliotecas con 2F5**

Se eligieron tres bibliotecas de péptidos expresados en la pIII del fago m13: lineales de 12 y 7 aminoácidos y en asa de 7 aminoácidos. La complejidad de las bibliotecas usadas fue del orden de  $10^9$  diferentes secuencias. Es importante señalar que estudios con bibliotecas de estas características (complejidad, formato de péptidos y proteína del fago sobre la que están expresados) para el estudio de 2F5 no se han reportado con anterioridad (Zwick y cols., 2001d; Menendez y cols., 2004).

Con la biblioteca lineal de 12 residuos se obtuvo una eficiente selección de variantes de ELDKWA, de hecho, la eficiencia con 2F5 es una de las más altas comparada por ejemplo, con otras bibliotecas y con anticuerpos policlonales en este mismo trabajo. En la primera ronda de tamizado, el 20% de las secuencias presentó alguna variante del motivo, para la segunda ronda el 92% de las secuencias tuvo esta característica mientras que en la tercera ronda el enriquecimiento fue del 100%. Las secuencias aisladas se presentan en la figura 9A, los motivos permiten clasificar las secuencias en grupos, con base en las diferentes partes o variaciones de la secuencia ELDKWAS. De esta manera, los motivos obtenidos fueron: LDKWAS, LDKWA, LDKW, DKWAS, DKWA, DKW, LDRWA, LDRW, DRWAS, DRWA, DRW y DPWA. En ningún caso se obtuvo E (glu), mientras que D (asp) y W (trp) estuvieron presentes en el 100% de las secuencias, además, algunas de las secuencias incluyeron S (ser). Respecto a los aminoácidos que flanquean los motivos no se identificó alguna homología en términos de secuencia. Tal y como se había reportado en otros trabajos, la mínima secuencia reconocida por 2F5 fue DK(R)W, sin embargo, lo anterior no está relacionado con la preferencia de selección del anticuerpo, es decir, como se especificará más adelante, la eficiencia de selección estuvo asociada a los motivos más grandes.

Cuando se usó la mezcla de dos bibliotecas lineales de 7 y 12 aminoácidos, fue interesante observar que las secuencias que presentaron el motivo correspondieron únicamente a las de 12 aminoácidos (tabla 4).

Este hecho es interesante ya que el motivo ELDKWAS o bien, alguna de las variantes obtenidas con la biblioteca 12, teóricamente podrían ser aisladas a partir de la biblioteca de 7 aminoácidos ya que cubre los requerimientos de longitud de la secuencia, pero aparentemente esta presentación de péptido lineal corto no cubrió los requerimientos de unión del anticuerpo. Las condiciones bajo las que se realizó el ensayo establecieron una competencia entre los dos formatos de péptidos, de esta manera, quedó evidenciado que en péptidos lineales 2F5 reconoce variantes de ELDKWAS cuando hay más de siete aminoácidos, probablemente porque una secuencia más larga permita tener mayor estabilidad para la unión con el anticuerpo.

**Tabla 4. Secuencias aisladas en la segunda ronda de tamizado con 2F5 usando la mezcla de dos bibliotecas de péptidos lineales (12+7 aminoácidos)**

A. Mimótopos aislados de 12 aminoácidos															
	A	S	M	A	V	D	R	W	A	S	L	H			
		K	P	L	Y	D	R	W	A	V	L	P	V		
R	S	H	F	G	S	Y	D	K	W	A	G				
				Y	M	D	K	W	A	N	I	V	A	L	Q
			S	T	H	L	D	K	W	S	A	P	L	K	
A	L	T	G	A	E	D	N	W	V	N	F				
				N	H	Q	D	R	W	S	R	L	G	D	P
				T	L	Q	Y	D	K	W	T	H	P	V	Q

B. Secuencias irrelevantes* de 7 aminoácidos															
	G	P	D	L	T	T	Q								
	K	L	G	Y	F	N	F								
	L	Q	Y	A	H	N	P								
	H	T	A	I	T	P	A								

C. Secuencias irrelevantes* de 12 aminoácidos												
	A	A	Q	T	H	H	Y	T	P	L	H	R
	H	D	S	P	E	G	W	V	R	L	H	P
	D	I	F	T	A	T	K	S	R	V	S	P
	S	K	A	D	S	G	P	P	S	R	Y	A
	W	H	R	V	T	W	A	N	W	P	L	Y

\*Irrelevantes con base en la alineación frente a la secuencia ELDKWA, y a la búsqueda de motivos continuos y discontinuos usando el programa RELIC, desarrollado para el análisis de péptidos obtenidos por *phage display* (Mandava y cols., 2004).

Tomando en cuenta lo anterior, es interesante observar que en el tamizado únicamente de la biblioteca 12mer (fig. 9A) los motivos siempre se encontraron en la parte central de la secuencia excepto el caso DPWA. Es posible entonces, que los péptidos cortos no facilitaran este formato de presentación que puede ser un factor que facilite la interacción con el anticuerpo.

La variación tanto de motivos como de aminoácidos no estuvo presente en la selección de los péptidos en asa (fig. 9B). En este caso, después de tres rondas de tamizado sólo el 74% de las secuencias presentó el motivo. El enriquecimiento fue menor conforme se avanzó en los tamizados, en la primera ronda sólo el 8% de las secuencias presentó el motivo mientras que en la segunda ronda fue el 11%, valores más lejanos respecto a la segunda y tercera ronda con la biblioteca 12mer. En cuanto a los motivos encontrados éstos fueron solamente dos LDKWA y DKWA cada uno con una posición específica en el asa, es decir, LDKWA sólo se presentó en el extremo C-terminal y DKWA en N-terminal. Dos hechos son importantes en esta selección: (1) El anticuerpo en este caso no toleró ninguna variación de aminoácidos y (2) Siempre se seleccionaron motivos que incluyeron A(ala). Las características de esta selección no permitieron por ejemplo, aislar secuencias con solo tres aminoácidos (DKW); en términos generales, toda la gama de variaciones obtenida con la biblioteca 12 fue completamente eliminada con la biblioteca en asa. Otro hecho particular en esta selección fue que en los dos formatos de secuencia LDKWA y DKWA nunca hubo sustitución de R(arg) por K(lys). Un comportamiento adicional es la posición que el motivo ocupó en el asa, esto fue también restringido y acotado a los extremos, la diferencia estuvo marcada por un aminoácido, es decir, cuando el motivo se encontró en C-terminal estuvo incluida la L(leu) mientras que en N-terminal este aminoácido no se presentó. Una representación de esto se muestra en la figura 9C.

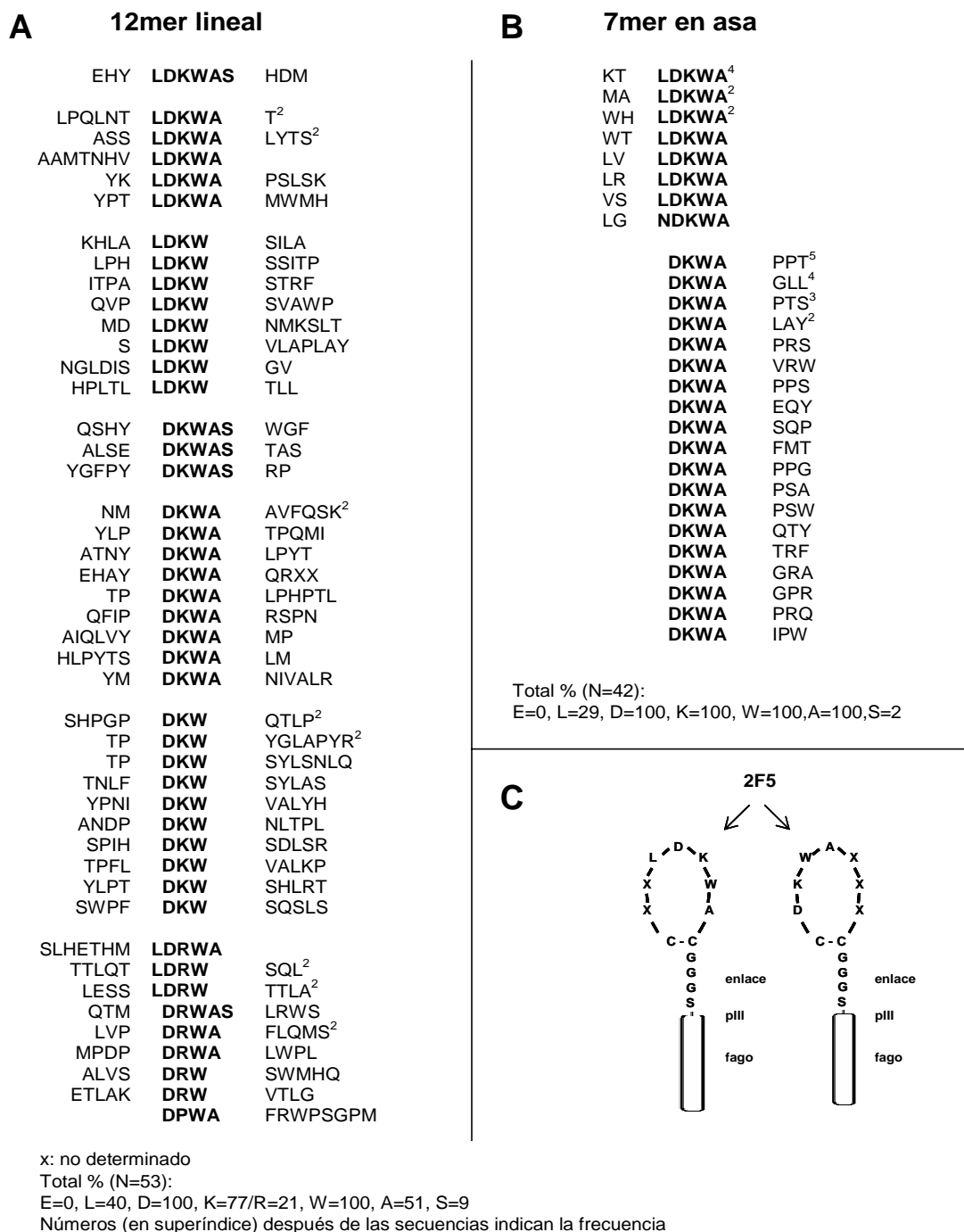


Figura 9. Secuencias de péptidos seleccionados por 2F5 de dos bibliotecas de péptidos al azar. A) Secuencias seleccionadas de la biblioteca de péptidos lineales de 12 aminoácidos, el 100% de los péptidos en la colección presentó alguna variante de la secuencia ELDKWA. B) Secuencias seleccionados de la biblioteca de péptidos en asa, 74% de los péptidos analizados presentaron DKWA ó LDKWA en dos posiciones diferentes. C) Representación esquemática de los motivos DKWA y LDKWA en el asa expuesta sobre la pIII del fago m13 a través de la secuencia de unión GGGS.



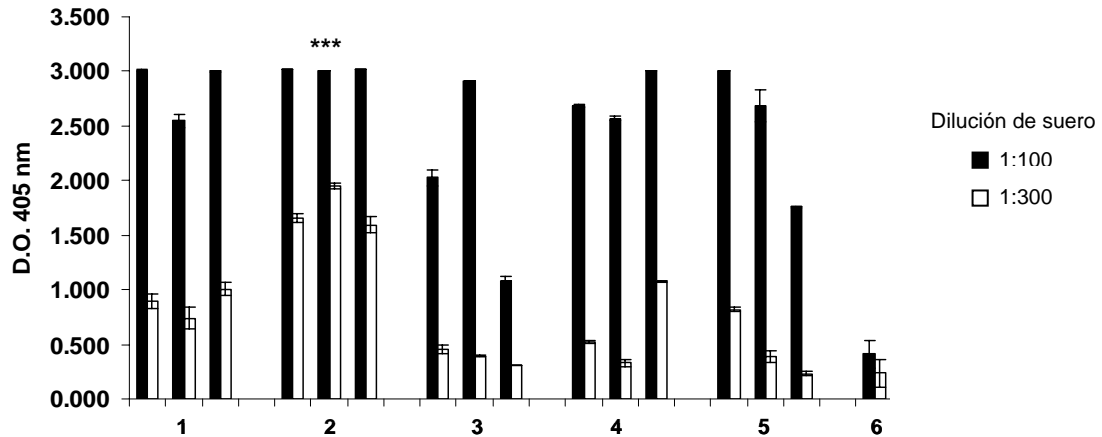
Bajo las condiciones descritas, con la biblioteca de péptidos de 7 aminoácidos en asa, la variabilidad tolerada por el anticuerpo en los péptidos lineales fue restringida, hecho que sugiere que con la forma de presentación del motivo en asa se adquiere una conformación adecuada para la interacción con el anticuerpo, en donde participan al menos cuatro aminoácidos invariables (DKWA) y no tres como se había afirmado (Menendez y cols., 2004).

#### **6.2.4 Inmunización de ratones con mimótopos seleccionados por 2F5**

Las secuencias obtenidas de ambos tipos de bibliotecas se usaron como inmunógenos en grupos de tres ratones; cinco grupos para las clonas de la biblioteca 12 y tres para la de 7 aminoácidos en asa. En ambos casos se eligió inmunizar con eluatos de la tercera ronda. Para los péptidos lineales se usaron clonas individuales, en el caso de los péptidos en asa se inmunizó con una mezcla de tres clonas para cada grupo, es decir, una de las mezclas fue representativa del motivo en el extremo C-terminal (LDKWA) y la otra en N-terminal (DKWA). En todos los ensayos se probaron los sueros preinmunes como control.

En las figuras 10A y 10B se presentan los niveles de reactividad obtenidos con los sueros hiperinmunes, la evaluación se hizo frente al péptido sintético que fue mejor reconocido por el mAb 2F5 (fig. 8), es decir, el 6373 con la secuencia NEQELLELDKWASLW. Con ambos formatos de péptidos en fago (lineal y en asa) se logró estimular una buena respuesta humoral con diferencia significativa respecto a los sueros pre-inmunes ( $p < 0.001$ ). Sin embargo, fue posible identificar menor reactividad con los sueros de los ratones inmunizados con los péptidos en asa pues únicamente hubo resultados significativos con la dilución de suero 1:50 (fig. 10B), mientras que con los lineales se obtuvo un resultado significativo con la dilución 1:300 ( $p < 0.001$ ) (fig. 10A).

A.



B.

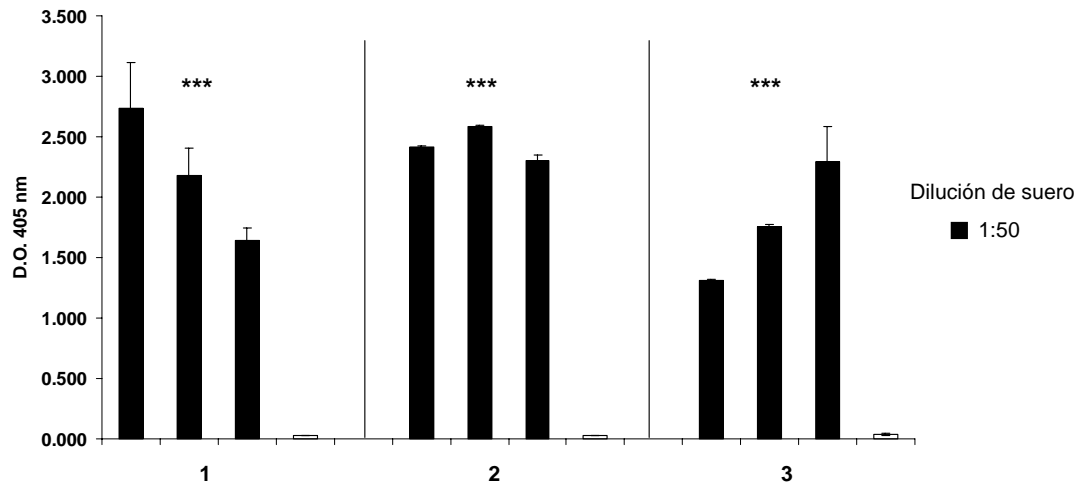


Figura 10. Inmunogenicidad de mimótopos. Reactividad por ELISA de sueros inmunes de ratón frente al péptido sintético 6373 NEQELLELDKWASLW (5 $\mu$ g/mL). Se inmunizaron grupos de tres ratones con clonas de las bibliotecas 12mer lineal y 7mer en asa como se describe en materiales y métodos. A) Ratones inmunizados con clonas de la biblioteca 12mer. Grupos: (1) anti eluato de la tercera ronda; (2) anti-ALSEDKWASTAS; (3) anti-ASSLDKWALYTS; (4) anti-SLDKWVLAPLAY; (5) anti-QTMDRWASLRWS (6) resultado representativo de reactividad con sueros pre-inmunes, en este caso se muestra el suero de un solo ratón. Con todos los formatos de inmunización se obtuvo una respuesta significativa comparada con los sueros preinmunes, dilución 1:100, (\*\*\*),  $p < 0.001$ . Sin embargo, la clona ALSEDKWASTAS fue el mejor inmunógeno al estimular una respuesta más alta, dilución 1:300, (\*\*\*),  $p < 0.001$ . B) Ratones inmunizados con clonas de la biblioteca 7mer en asa. Grupos: (1) anti eluato de la tercera ronda; (2) inmunización con mezcla de tres clonas presentando el motivo LDKWA en el extremo C-terminal: CLVLDKWAC, CMALDKWAC, CKTLDKWAC; (3) inmunización con mezcla de tres clonas presentando el motivo DKWA en el extremo N-terminal: CDKWAGLLC, CDKWAPPTC, CDKWALAYC; las barras blancas corresponden a los sueros pre-inmunes de cada grupo. Los tres formatos de inmunógeno estimularon una buena respuesta con diferencia estadísticamente significativa respecto a los sueros preinmunes, en este caso no se identificó diferencia significativa entre grupos. Análisis estadístico con ANOVA y prueba de comparación múltiple Tukey, programa *GraphPad Prism*®.

Un hecho adicional para los péptidos lineales es que la clona ALSEDKWASTAS fue el mejor inmunógeno del grupo ( $p < 0.001$ ) mientras que para los péptidos en asa no hubo diferencia significativa entre los grupos establecidos. En el caso de la inmunización usando los eluatos amplificados de la tercera ronda de cada tamizado, podría ser comprensible que se haya obtenido una respuesta más baja con el de la biblioteca C7C debido a que la proporción de clonas con alguna variante del motivo fue del 74%, menor, comparado con el 100% de la biblioteca 12.

Respecto a la estrategia de inmunización se debe considerar que en el caso de los mimótopos en asa no se usaron clonas individuales, sino mezcla de tres lo que pudo haber originado competencia en lugar de una actividad sinérgica. Lo anterior sólo podría ser confirmado inmunizando con clonas individuales. Teniendo en cuenta la estrategia de inmunización seguida y con base en el análisis estadístico, se puede establecer que el péptido en formato lineal ALSEDKWASTAS fue el mejor inmunógeno.

#### **6.2.5 Actividad biológica de los sueros hiperinmunes**

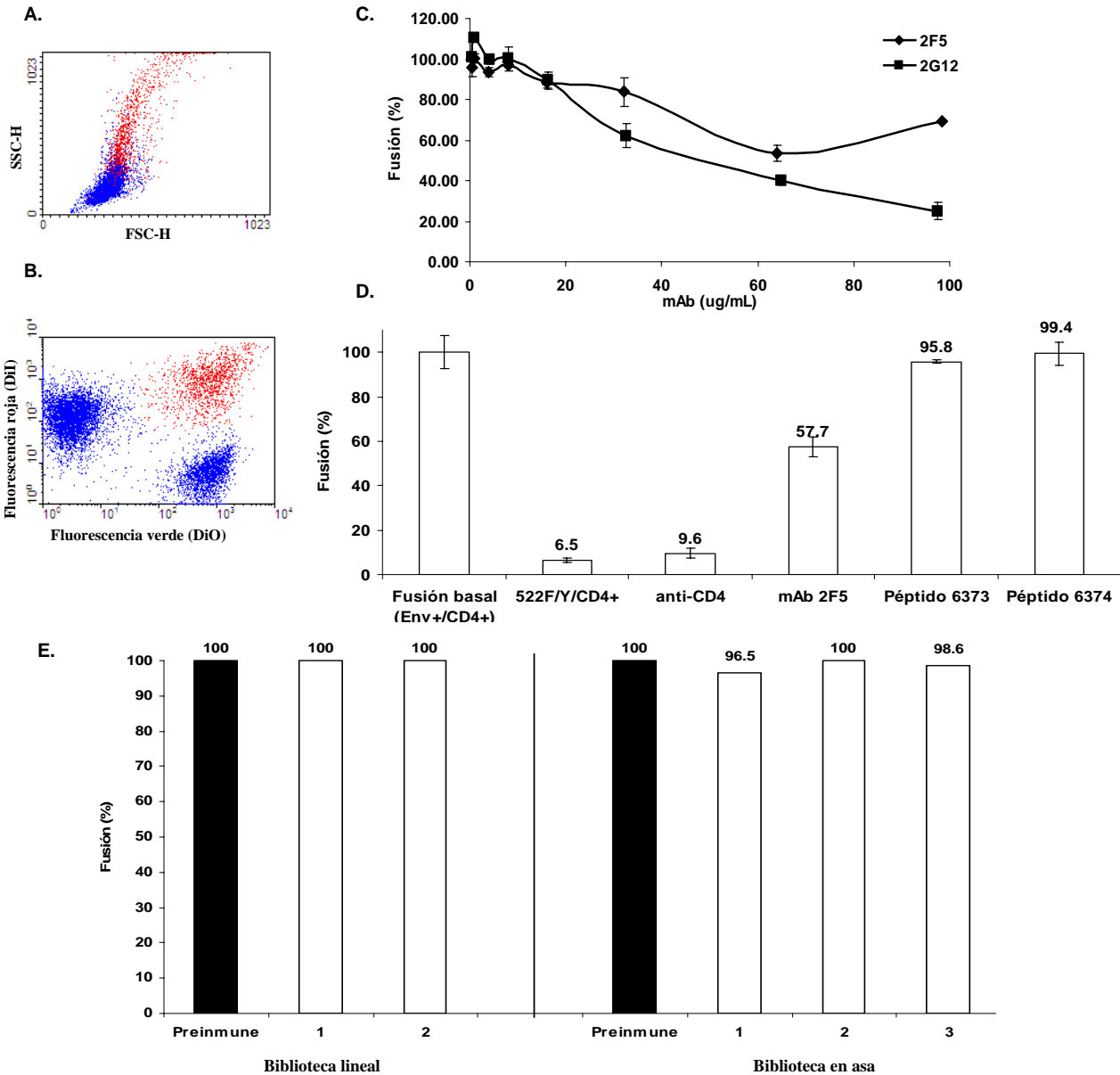
En términos generales, con los dos protocolos de inmunización se obtuvo un buen título de anticuerpos, sin embargo, las características de secuencia y conformación de los péptidos provenientes de las dos bibliotecas podría reflejarse en términos de la funcionalidad de los anticuerpos obtenidos en los animales. Es por ello que se decidió evaluar la actividad biológica que estos anticuerpos pudieran llevar a cabo como inhibidores virales, simulando la actividad de 2F5. Para esta prueba se usó como modelo el sistema de fusión celular desarrollado por Huerta y cols., (2002). El ensayo involucra interacciones célula-célula lo cual puede diferir en algunos aspectos respecto a la interacción virus-célula, sin embargo, representa una metodología útil y confiable para evaluar el efecto de anticuerpos sobre el complejo *env* del VIH-1, pues el mecanismo de fusión es específico, es decir, está mediado por la interacción de las proteínas de envoltura gp120/gp41 con el receptor y co-receptor del virus (CD4 y

CXCR4 respectivamente, para linfocitos T). Por otro lado, esta forma de evaluación ha sido elegida por otros grupos de trabajo como una aproximación a la actividad antiviral que algunos anticuerpos neutralizantes pueden presentar (Allaway y cols., 1993; Blanco y cols., 2003; Sánchez-Martínez y cols., 2006). Aunado a lo anterior, el mecanismo de neutralización de 2F5 es interfiriendo con los cambios conformacionales de la gp41 precisamente durante el proceso de fusión de membranas (Barbato y cols., 2003).

El sistema ofrece varias ventajas, entre ellas el método de cuantificación de las fusiones celulares por citometría de flujo. Dado que los procedimientos seguidos en estos ensayos se detallaron en materiales y métodos, en este apartado únicamente se presenta una breve descripción de la caracterización que se llevó a cabo, lo cual tiene como objetivo respaldar la especificidad de la fusión celular mediada por las proteínas de envoltura del VIH-1. Por otro lado, la participación de la molécula CD4 y el receptor de quimiocina CXCR4 ha quedado demostrada en trabajos previos (Huerta y cols., 2002; Huerta y cols., 2005; Huerta y cols., 2006; López-Balderas y cols., 2007). Es importante señalar que hasta este momento, el ensayo de fusión celular no puede ser considerado equivalente a los ensayos de neutralización viral porque intervienen distintos mecanismos y participan diferentes moléculas entre las interacciones célula-célula respecto a las interacciones virus-célula. Sin embargo, representa un modelo útil pues las fusiones celulares son eventos que ocurren in-vivo en los sujetos infectados y pueden ser inhibidas por anticuerpos neutralizantes (Huerta y cols., 2005). Teniendo en mente lo anterior, se llevaron a cabo ensayos de caracterización del sistema para confirmar que en efecto, el proceso era sensible a la inhibición por anticuerpos monoclonales neutralizantes para VIH-1, entre ellos 2F5.

La figura 11 integra los resultados obtenidos en la caracterización del sistema y la evaluación de los sueros. En primer lugar se presentan los diagramas de puntos obtenidos para la cuantificación por citometría de

flujo (fig. 11 A y 11B). En la figura 11C se presenta la caracterización del sistema de fusión con dos anticuerpos neutralizantes del VIH, uno anti-gp120 (2G12) y otro anti-gp41 (2F5), el resultado para ambos casos confirma que el sistema es sensible y específico a dos de los anticuerpos neutralizantes más potentes para VIH. Más aún, en la figura 11D se presenta que la inhibición de la fusión por 2F5 puede ser revertida cuando se usan los péptidos sintéticos mejor reconocidos por 2F5 como competidores, 6373 y 6374 (ver fig. 8). Lo anterior confirma que el efecto de 2F5 como inhibidor de la fusión celular es por reconocimiento específico al epítipo en gp41. Una vez demostradas la especificidad y sensibilidad del sistema, se evaluaron los sueros de ratones inmunizados con las clonas de ambas bibliotecas. En estos casos, la comparación directa se hizo frente al efecto de los sueros pre-inmunes por lo que estos valores se consideraron como basales. Bajo estas condiciones, los sueros hiperinmunes de mimótopos de 2F5 no tuvieron efecto de inhibición sobre la fusión celular (fig. 11E). Este resultado es importante desde varios aspectos, por un lado coincide con lo reportado para el epítipo reconocido por 2F5 ya que bajo diferentes construcciones, nunca se ha logrado obtener un inmunógeno inductor de anticuerpos que reproduzcan la actividad neutralizante, en este caso, con las clonas de fago sucedió lo mismo. Sin embargo un dato importante es que a pesar de que ya se había mapeado el epítipo usando otras bibliotecas de péptidos en fago no se había probado el potencial de los mimótopos como inmunógenos para generar anticuerpos específicos hacia la región ELDKWA en el virus. Aún con el resultado negativo, no se debe descartar la posibilidad de llevar a cabo ensayos de neutralización viral, ello permitiría aclarar dos aspectos importantes: en primer lugar, asegurar que los sueros obtenidos por inmunización con mimótopos de 2F5 no ejercen un efecto neutralizante sobre el VIH-1, en segundo lugar, definir si existe una equivalencia entre el modelo de fusión celular y los ensayos de neutralización viral. Otros aspectos que podrían influir en la inhibición de la fusión celular se comentarán más adelante.



**Figura 11.** Evaluación de actividad biológica de sueros inmunes de ratones en la fusión celular mediada por las proteínas de envoltura del VIH-1. **A)** Diagrama de tamaño (FSC-H) contra granularidad (SSC-H), la región en rojo representa las fusiones celulares. **B)** Análisis por fluorescencia de las fusiones entre células Jurkat Env+ y CD4+ marcadas con colorantes lipofílicos. La región de doble fluorescencia (en rojo) corresponde a las fusiones y es la misma población (en rojo) representada en la figura A. **C)** Efecto de dos anticuerpos neutralizantes del VIH-1 en el sistema de fusión celular: mAb 2G12 (anti-gp120) y mAb 2F5 (anti-gp41). **D)** Representación de la cuantificación de fusión en: estado basal; presencia de una mutante de Env+ (522F/Y); presencia de anti-CD4 (22.2  $\mu\text{g/mL}$ ); presencia de 2F5 (63.9  $\mu\text{g/mL}$ ); inhibición del efecto de 2F5 bajo la presencia de los péptidos sintéticos (27.2  $\mu\text{g/mL}$ ) mejor reconocidos por 2F5 (6373 NEQELLELDKWASLW, 6374 LLELDKWASLWNWFD) como competidores. **E)** Efecto de sueros inmunes de ratón. A la izquierda se presentan los resultados obtenidos de los ratones inmunizados con mimótopos de la biblioteca lineal (1. anti-eluato de la tercera ronda, 2. anti-ALSEDKWASTAS). A la derecha se presenta el efecto de los sueros inmunes obtenidos con mimótopos de la biblioteca en asa (1. anti-eluato de la tercera ronda, 2. anti-LDKWA, anti-DKWA). En ambos casos la barra negra corresponde al efecto de suero preimmune respecto a los cuales se hizo la comparación. Dilución de sueros 1:10. El valor de fusión (%) representado en C, D, E, corresponde a: fusión obtenida en presencia de anticuerpo o anti-suero  $\times 100$ /fusión basal. La fusión basal está dada por el cocultivo de las dos líneas celulares solas o en presencia de sueros preinmunes. Los ensayos se realizaron bajo las condiciones descritas en materiales y métodos.

Adicionalmente, sería importante probar si los formatos de presentación de los péptidos (lineal o asa), implicaron alguna diferencia en términos de afinidad de los anticuerpos obtenidos.

#### **6.2.6 Estructura: implicaciones antigénicas e inmunogénicas**

La aparente simplicidad estructural que fue propuesta inicialmente para la secuencia ELDKWA, su localización en la gp41 y sobre todo, la posibilidad de obtener inmunógenos que estimulen la producción de anticuerpos neutralizantes, son hechos que han desencadenado un gran número de investigaciones sobre la MPER que en los últimos tres años han integrado nuevas consideraciones acerca del por qué se ha dificultado la obtención de un buen inmunógeno, cuando uno de los principales obstáculos en el VIH que es la variabilidad, es muy baja en esta región (Zwick y cols., 2005).

Los resultados presentados, permiten integrar al análisis algunos elementos que no habían sido reportados, específicamente la selección de las clonas con la biblioteca de péptidos en asa. En primer lugar, es claro que la selección de los dos grupos de secuencias (LDKWA ó DKWA) estuvo definida por los parámetros de la biblioteca, es decir, complejidad, conformación y tamaño del asa. Tanto la ausencia de otras longitudes de la secuencia (pues con 7 aminoácidos podría haberse seleccionado por ejemplo ELDKWAS), como la nula variabilidad de aminoácidos en los péptidos seleccionados, permiten proponer que bajo este formato de asa, el anticuerpo (2F5) logra una selección de secuencias en las que la interacción mimótopo-parátipo es específica, siendo capaz de rechazar cualquier variación de la secuencia del epítipo nativo. Tampoco ocurrió el caso de selección de motivos más cortos, es decir, secuencias únicamente con tres aminoácidos como DKW. Este hecho es particular, pues significaría entonces que la secuencia mínima del epítipo que permite formar una conformación natural para la interacción específica con el anticuerpo es DKWA, bajo el contexto de péptido en asa de 7 residuos.

Debe mencionarse que algunas hipótesis acerca de la necesidad de contar con análogos de ELDKWA presentados en asas, fueron esbozadas por Tian y cols., (2002) y Ofek y cols., (2004), bajo la suposición de que esto mejora las propiedades antigénicas de la secuencia (incrementando la afinidad) y que esto como consecuencia, podría repercutir en las propiedades inmunogénicas. En el presente trabajo se está confirmando que la antigenicidad de 2F5 es óptima con asas de siete aminoácidos en las que únicamente es indispensable la presencia de un epítipo mínimo de cuatro aminoácidos: DKWA. Además, el residuo adicional “L” en el caso de LDKWA puede contribuir a la interacción. Por otro lado, estas estructuras son inmunogénicas en ratones, pero aparentemente aún están ausentes los elementos que permiten que estas secuencias generen anticuerpos con actividad neutralizante.

En este mismo trabajo se ha enfatizado la importancia de las bibliotecas *phage display* que se eligen para la investigación, por lo que no se debe dejar la lado la influencia que algunos parámetros pudieron tener tanto en la selección como en la inmunización. Por ejemplo, la presentación de los péptidos sobre la pIII del fago y la secuencia de unión al péptido (Gly-Gly-Gly-Ser, marcado como *enlace* en la fig. 9C) para dar flexibilidad, quizás sean elementos determinantes para una adecuada interacción con el anticuerpo. Por otro lado, se encuentra la manera en que estas bibliotecas están construidas. Dado que se trata de péptidos con secuencias al azar, es importante tomar en cuenta de qué manera están representadas las secuencias, para confirmar por ejemplo que la ausencia de algún motivo fue debido a que no lo seleccionó el anticuerpo y no porque este no estuvo representado en la biblioteca.

Por lo anterior, en la tabla 5, se presentan los cálculos de probabilidad para encontrar diferentes motivos en las bibliotecas usadas.



**Tabla 5. Parámetros estadísticos de las bibliotecas usadas antes y después del tamizado con 2F5**

A. Biblioteca 12mer						
Motivo	Probabilidad (P) <sup>1</sup>	Biblioteca		Selección		
		PxComplejidad de la biblioteca <sup>2</sup>	%P	Frecuencia <sup>3</sup>	%	Enriquecimiento <sup>4</sup>
LDKWAS	6.74E-08	1.82E+02	6.74E-06	1	1.9	2.80E+05
LDKWA	7.70E-07	2.08E+03	7.70E-05	7	13.2	1.72E+05
LDKW	1.44E-05	3.89E+04	1.44E-03	8	15.1	1.05E+04
DKWAS	8.30E-07	2.24E+03	8.30E-05	3	5.7	6.82E+04
DKWA	9.31E-06	2.51E+04	9.31E-04	10	18.9	2.03E+04
DKW	1.72E-04	4.64E+05	1.72E-02	12	22.6	1.32E+03
LDRW	2.42E-05	6.53E+04	2.42E-03	4	7.5	3.12E+03
LDRWA	1.29E-06	3.48E+03	1.29E-04	1	1.9	1.46E+04
DRWA	1.60E-05	4.32E+04	1.60E-03	4	7.5	4.72E+03
DRW	2.90E-04	7.83E+05	2.90E-02	2	3.8	1.30E+02
DPWA	4.10E-05	1.11E+05	4.10E-03	1	1.9	4.60E+02
Total				53	100	
B. Biblioteca en asa 7mer						
ELDKWA	1.14E-08	1.37E+01	1.14E-06	ns	--	--
LDKWA	5.54E-07	6.65E+02	5.54E-05	12	28.6	5.16E+05
DKWA	7.69E-06	9.23E+03	7.69E-04	30	71.4	9.29E+04
LDRWA	6.27E-07	7.52E+02	6.27E-05	ns	--	--
LDKW	1.14E-05	1.37E+04	1.14E-03	ns	--	--
DKW	1.48E-04	1.78E+05	1.48E-02	ns	--	--
Total				42	100	

<sup>1</sup>Probabilidad absoluta (P) de obtener esa secuencia con base en la frecuencia de cada aminoácido en la biblioteca (la frecuencia de cada aminoácido fue un dato proporcionado por el fabricante *N.E. BioLabs*).

<sup>2</sup>La complejidad de la biblioteca representa el número de clonas independientes que expresan el motivo. El resultado se obtuvo multiplicando P x la complejidad que para la biblioteca 12mer fue de  $2.7 \times 10^9$  y para C7Cmer de  $1.2 \times 10^9$ , secuencias distintas.

<sup>3</sup>Número de veces que se obtuvo esa secuencia, incluye todas las rondas de tamizado.

<sup>4</sup>Representación en porcentaje de cada secuencia con base en el total de clonas secuenciadas

<sup>5</sup>Relación entre los porcentajes de la biblioteca original y la selección

ns: no seleccionado

Teóricamente todas las secuencias, incluida ELDKWA, estaban presentes en ambas bibliotecas. Se debe notar por ejemplo que en la biblioteca C7C el total de clonas que podrían contener solamente DKW era mayor ( $1.78E+05$ ) comparado con las que presentaron LDKWA ó DKWA ( $6.65E+02$  y  $9.23E+03$  respectivamente), preferidas por 2F5. Otro dato interesante está en la selección con la biblioteca 12, pues el enriquecimiento también se dio principalmente con clonas que presentaron motivos de más de tres aminoácidos, como DKWA y LDKWA ( $1.72E+05$  y  $2.8E+05$ , respectivamente). Los cálculos de la tabla 5 respaldan la propuesta de que la selección fue consecuencia de interacciones específicas entre 2F5 y los motivos en las clonas.

Es importante comprender las implicaciones estructurales en las secuencias DKWxxx y xxLDKWA (donde x representa un aminoácido variable) bajo el formato de asa pequeña. Para contar con datos mejor respaldados, es necesario llevar a cabo análisis de modelado molecular, sin embargo, tanto los antecedentes cristalográficos como los estudios de cambios conformacionales de la gp41 durante el proceso de fusión, apoyan la idea de que en las asas aisladas se conserva el giro  $\beta$  tipo I y que se estabiliza por puentes de hidrógeno. En primer lugar, con base en los cristales y parámetros reportados por Tian y cols., (2002) y ampliados por Ofek y cols., (2004), es posible suponer que en los dos motivos en asa, se conserven las características estructurales identificadas para esta región, es decir, el giro  $\beta$  tipo I y dos puentes de hidrógeno, uno entre D(asp)<sub>664</sub>-W(trp)<sub>666</sub> y otro en D(asp)<sub>664</sub>-A(ala)<sub>667</sub> (fig. 12).

Por otro lado, se ha propuesto que el epítipo en el virus puede adoptar dos estructuras, el giro  $\beta$  tipo I en estado pre-fusogénico y hélice cuando inician los cambios conformacionales en la gp41 para llevar a cabo el proceso de fusión de membranas (Gorny y cols., 2000; Schibli y cols., 2001; Barbato y cols., 2003; Zwick y cols., 2005), en esta segunda conformación participa toda la secuencia MPER lo cual incluye ELDKWAS.

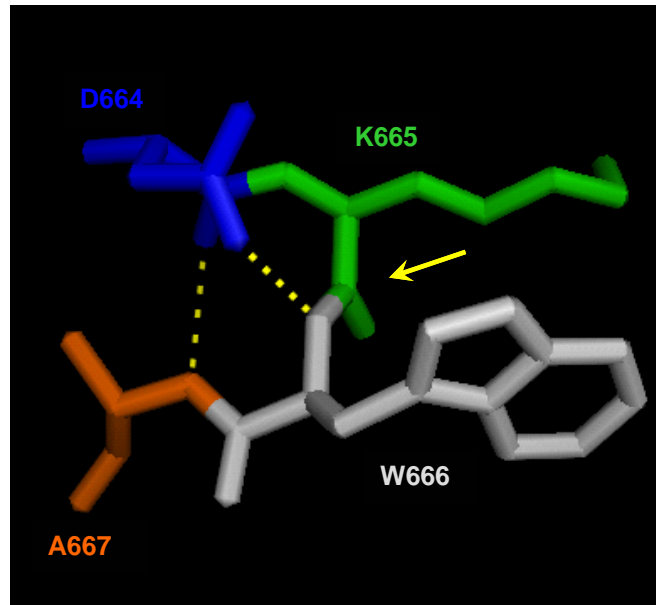


Figura 12. Representación estérica de la secuencia DKWA. El esquema se obtuvo a partir de uno de los cristales obtenidos por Ofek y cols., (2004) en donde se reporta la estructura del anticuerpo 2F5 acoplado al péptido. Tomado del *Protein Data Bank* (PDB) con el código de acceso 1TJG. La representación se obtuvo con el programa PyMol. Las líneas punteadas representan los puentes de hidrógeno y la flecha señala el giro  $\beta$  tipo I.

La unión de 2F5 puede llevarse a cabo en ambas conformaciones (fig. 13), aunque la interacción es de mayor afinidad en la forma nativa (giro  $\beta$ ), además, es la única conformación que prevalece si la secuencia ELDKWASL como péptido sintético se presenta en el contexto de asas formadas por puentes disulfuro (McGaughey y cols., 2003). Para el caso de la estructura en hélice, la unión del anticuerpo sólo se lleva a cabo durante los primeros cambios conformacionales en la gp41 durante el proceso de fusión ya que precisamente, 2F5 interfiere con la fusión de membranas (fig. 13). De esta forma, aunque 2F5 puede reconocer el epítipo en dos conformaciones, los datos apoyan la hipótesis de que bajo el formato de péptidos en asa, es probable que se adquiriera una conformación de giro  $\beta$  estabilizada por puentes de hidrógeno.

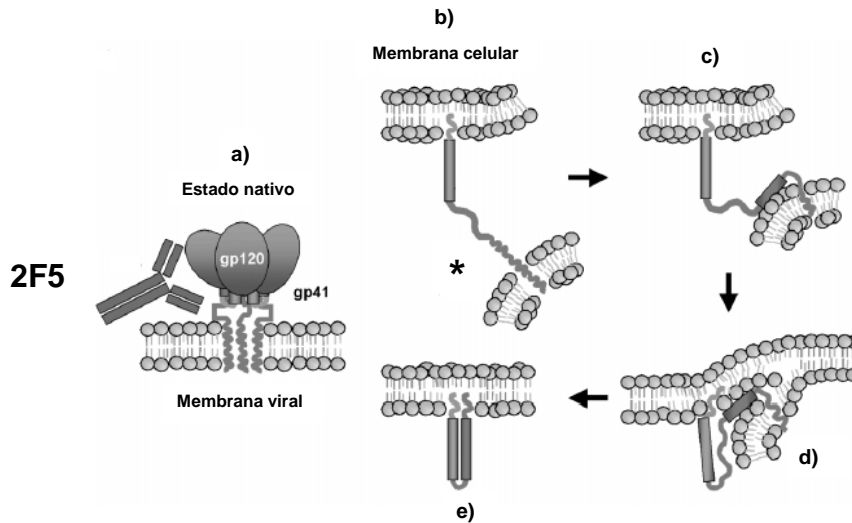


Figura 13. Mecanismo de neutralización viral por 2F5. La figura muestra el modelo de unión de 2F5 en las dos conformaciones que se han propuesto: a) estado nativo del epítipo (giro  $\beta$ ) y b) primeras fases del proceso de fusión de membranas (\* hélice), si esta última unión se lleva a cabo los eventos c), d) y e) son interrumpidos. Tomado de Barbato y cols., (2003).

### 6.2.7 Consideraciones adicionales

En investigaciones recientes, se identificó que tanto 2F5 como 4E10 otro anticuerpo neutralizante, cuyo epítipo  $_{671}\text{NWFDT}_{676}$  próximo al reconocido por 2F5 que también forma parte de la MPER, son anticuerpos reactivos a antígenos propios, en particular a los fosfolípidos cardiolipina y fosfatidilserina, componentes de la membrana celular (Douvas y cols., 1996; Gugliemone y cols., 2001; Palacios y Santos, 2004; Haynes y cols., 2005; Sánchez-Martínez y cols., 2006; Alam y cols., 2007). Por otro lado, a partir de la definición de los cristales Fab-epítipo por Ofek y cols., (2004) se propuso que la membrana podría estar formando parte de los epítipos reconocidos por estos anticuerpos. Esta idea ha ido cobrando fuerza sobre todo a raíz de la publicación de Haynes y cols., (2005), en donde gradualmente se ha identificado que 2F5 tiene reactividad específica a fosfolípidos. El comportamiento aún no es comprendido completamente pero en todo caso, parece evidente que el ambiente hidrofóbico impuesto por la membrana influye en la actividad neutralizante de 2F5. Esto debe tomarse en cuenta para lograr inmunógenos efectivos que recreen el

ambiente molecular del epítipo reconocido por 2F5, además de la mejoría en el diseño de estructuras para que representen la conformación adecuada del mismo. Ante ello, los péptidos reportados aquí pueden ser buenos candidatos siempre que se confirme que tengan propiedades inmunogénicas capaces de estimular anticuerpos inhibidores de la interacción virus-célula.

## **6.3 ESTUDIO DEL DOMINIO PRINCIPAL DE NEUTRALIZACIÓN EN EL ASA V3 DE LA gp120**

### **6.3.1 Antecedentes**

Tres importantes anticuerpos con potente actividad neutralizante sobre el VIH-1 reconocen epítomos con características particulares en la gp120 (Zolla-Pazner 2004a; Pantophlet y Burton., 2006). Se trata del mAb b12 que bloquea el sitio de unión con la molécula CD4 (Ho y cols., 1991; Barbas CF 3rd. y cols., 1992; Roben y cols., 1994); el mAb 2G12 que interacciona con residuos de manosa (Trkola y cols., 1996; Sanders y cols., 2002; Scanlan y cols., 2002); el tercer mAb 447-52D que reconoce un epítomo dentro del asa V3 y cuya complejidad radica en que es una secuencia muy variable entre los distintos subtipos y aislados virales (Dong y cols., 2005). El epítomo reconocido por el mAb 447-52D involucra cuatro aminoácidos situados en el ápice del asa (GPGR) definidos como dominio principal de neutralización (PND por sus designación en inglés) (Gorny y cols., 1991; Gorny y cols., 1992; Gorny y cols., 1993; Zolla-Pazner y cols., 2004a). Durante la infección por VIH-1, sobre todo en las primeras etapas, se genera un buen título de anticuerpos contra esta región, sin embargo, la alta tasa de mutación viral impide que la actividad neutralizante de éstos sea efectiva frente a las poblaciones virales que van surgiendo, aún cuando se ha confirmado que tanto el mAb 447-52D como los anticuerpos de los pacientes presentan reactividad cruzada ante las diferentes variantes del epítomo (Gorny y cols., 2004; Zolla-Pazner y cols., 2004a). Por otro lado, se ha identificado que un buen pronóstico durante el primer año de la administración de TARV está asociado a altos títulos de anticuerpos neutralizantes y de reconocimiento específico al asa V3 (Morris y cols., 2001). Por su parte, Huerta y cols., (2005), identificaron que el efecto de sueros de pacientes sobre la fusión celular mediada por las proteínas de envoltura del VIH-1 y CD4/CXCR4, recae principalmente en anticuerpos (IgG e IgM). Más aún, el efecto de los sueros estuvo

relacionado con la evolución de la enfermedad, de esta manera, los sueros inhibidores de la fusión celular correspondieron a pacientes con un buen progreso clínico, es decir, con carga viral baja y aumento en los niveles de CD4.

### **6.3.2 Reactividad a péptidos sintéticos y evaluación de actividad biológica**

Dentro del grupo de pacientes incluidos en el presente trabajo, se identificó al 17 que presentó un buen apego al tratamiento durante el primer año (Anexo II). Se realizó un monitoreo de reactividad de IgG purificada del suero del paciente frente a péptidos sintéticos de V3. En general, hubo buenos niveles de reconocimiento antes del inicio de TARV, sin embargo, se obtuvieron reactividades más altas con tres semanas de TARV, por ello se decidió trabajar con suero de esta etapa. Este resultado se muestra en la figura 14C. Se identificó que el suero del paciente reconoció la región ya que hubo buena reactividad hacia todas las secuencias evaluadas, las cuales incluyeron péptidos sobrepuestos cubriendo la región 263-297 del asa V3, subtipo B del VIH-1, así como secuencias de otras variantes, en formato lineal y en asa (fig. 14A). Bajo el formato de los ensayos de ELISA, el nivel de reconocimiento con IgG de este paciente fue más amplio que el presentado por el mAb 447-52D (fig. 14B) aunque debe señalarse que hubo diferencias en las concentraciones usadas de anticuerpos, pues para el paciente fue mayor. Lo anterior se definió así con base en la experiencia previa en ensayos con IgG de pacientes (epítipo CSGKLIC) y por las recomendaciones de uso del mAb 447-52D (*NIH AIDS RRRP-USA*) para ensayos de ELISA, aún con esto, no se puede descartar que este factor que pudo influir en el resultado.

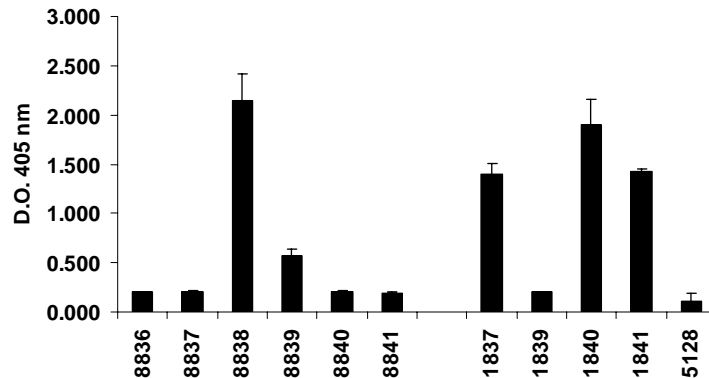
A.

```

                263                               297
8836  EINCTRPNNNTRKSI
8837  TRPNNNTRKSIHIGP
8838  NNTRKSIHIGPGRAF
8839  KSIHIGPGRAFYTTG
8840  IGPGRAFYTTGEIIG
8841  RAFYTTGEIIGDIRQ

1837  CKSIHIGPGRAFYTTGC
1839  CKGIRIGPGRAYAEC
1840  TRPNYNKRKRIHIGPGRAFYTTKNIIGTIRQAH
1841  CTRPNYNKRKRIHIGPGRAFYTTKNIIGTIRQAHC
  
```

B.



C.

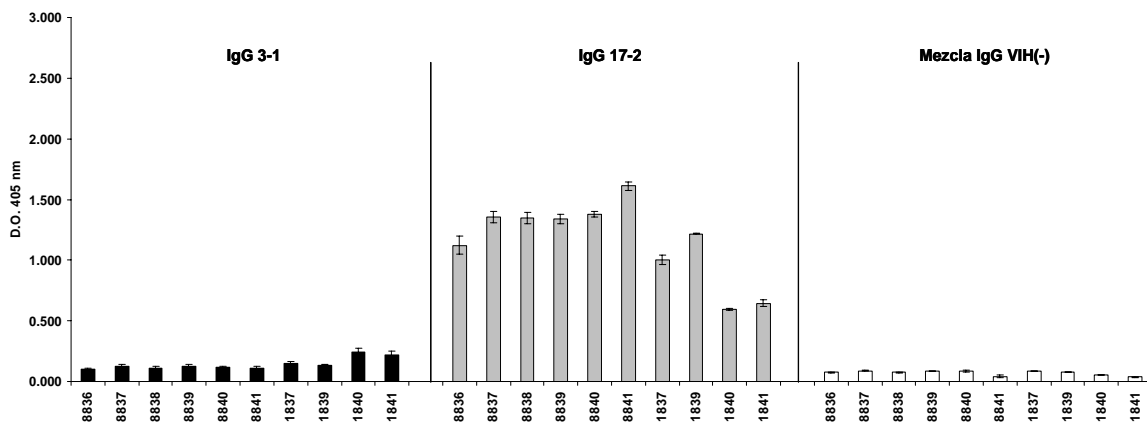


Figura 14. Mapeo frente a péptidos sintéticos de V3. A) Secuencias de los péptidos sintéticos. Los péptidos 8836 a 8841 representan la región 263-297 del asa V3 en la gp120 del VIH-1, consenso del subtipo B. El péptido 1837 representa la secuencia consenso NA en formato de asa; el péptido 1839 representa la secuencia consenso del subtipo B en formato de asa; los péptidos 1840 y 1841 corresponden al subtipo MN el primero en formato lineal y el segundo en asa. B) Mapeo por ensayo de ELISA con el mAb 447-52D (1µg/mL), los péptidos se usaron a una concentración de 5µg/mL, se incluyó el péptido 5128 con la secuencia DSQTHQVLSKQPAS de la proteína Tat como control negativo. C) Reactividad en ELISA con anticuerpos de pacientes (50µg/mL). Las barras negras corresponden a IgG del paciente 3 sin tratamiento (3-1); las barras grises a IgG del paciente 17 con cuatro semanas de tratamiento (17-2); las barras blancas representan la reactividad de la mezcla de IgG de dos sujetos sanos como control. Los ensayos se hicieron por duplicado bajo las condiciones indicadas en materiales y métodos.



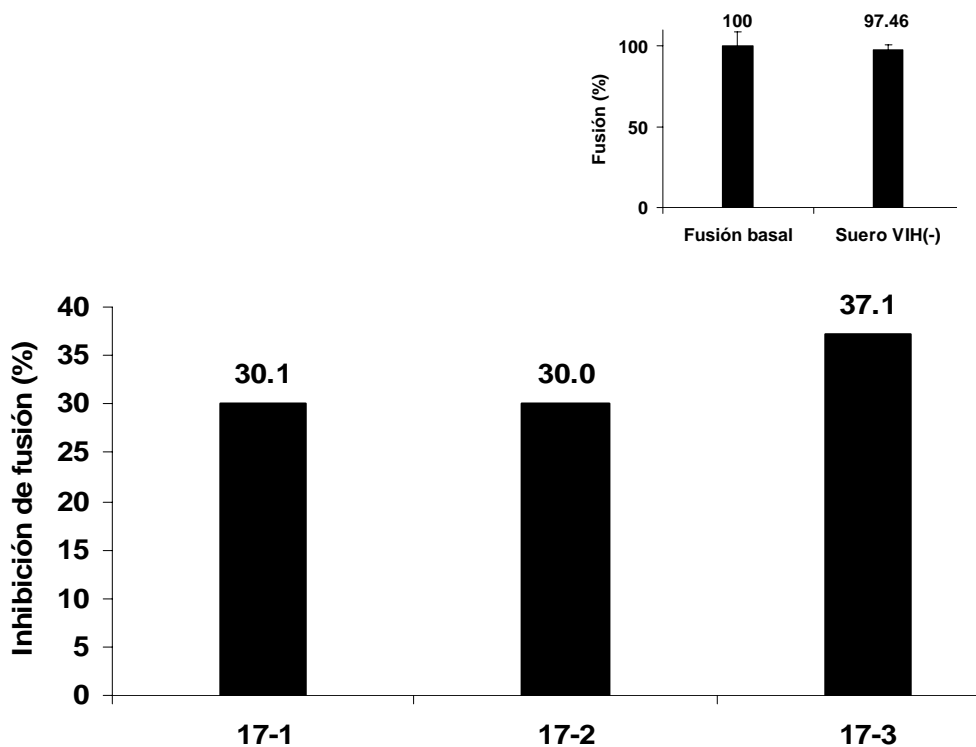


Figura 15. Efecto del suero del paciente 17 VIH positivo sobre la fusión celular determinado por citometría de flujo. Arriba: resultado de fusión celular es ausencia de otros factores (fusión basal) y en presencia de suero de sujeto VIH negativo. Abajo: Los sueros de cada etapa del paciente se usaron a una dilución 1:50. El suero 17-1 correspondió a la toma de muestra antes de iniciar TARV, 17-2 a tres semanas de TARV y 17-3 a doce semanas de TARV. El resultado corresponde a la relación obtenida del efecto sobre la fusión del suero del sujeto VIH(-)(Ef1) y que se tomó como el 100% de fusión celular. Con el efecto de los sueros del paciente (Ef2) se obtuvo su valor de fusión celular correspondiente, por lo tanto, para calcular el *porcentaje de fusión celular* obtenido con cada suero se aplicó la siguiente fórmula:  $Ef2 \times 100 / Ef1$ . En donde Ef1 y Ef2 fueron los datos obtenidos directamente del citómetro de flujo. Entonces, la *inhibición de la fusión* estuvo dada por:  $100 - \text{porcentaje de fusión celular}$ .

Para determinar si los anticuerpos en suero de este paciente podrían tener alguna implicación en actividad antiviral, se evaluó el efecto de éstos sobre la fusión celular bajo el método descrito con anterioridad (descripción y caracterización en resultados con 2F5), reportado previamente por Huerta y cols., (2002). El suero presentó un efecto como inhibidor de la fusión desde antes de que el paciente iniciara el tratamiento (suero 17-1), se mantuvo con tres semanas de TARV (suero 17-2) y aumentó ligeramente con doce semanas de TARV (suero 17-3), (fig. 15). Simultáneamente se analizaron otros pacientes como el no.1 (dato no presentado) que

seleccionó los mimótopos CxxKxxC, pero únicamente el paciente 17 presentó actividad inhibidora de la fusión celular. Una consideración importante frente a este resultado es que únicamente se puede afirmar que hay elementos en el suero con capacidad de inhibir la fusión celular y que probablemente, en este paciente, dichos elementos mejoran su acción con el tratamiento. Con base en estudios de otros autores (Morris y cols., 2001; Huerta y cols., 2005), es probable que el efecto observado se deba a la actividad de anticuerpos, sin embargo, no se debe descartar la posible presencia de otros factores en el suero que puedan estar interviniendo en la inhibición de la fusión. Con objeto de tener un control de esta variación, en el mismo ensayo se incorporó el efecto del suero de un sujeto VIH negativo, siendo este resultado el valor considerado como basal pues resultó prácticamente el mismo que el de la fusión es ausencia de cualquier otro factor (es decir, sólo células Env+/CD4+, fig.15). Fue precisamente frente al valor de fusión en presencia de suero VIH negativo que se hizo la relación directa para determinar el porcentaje de inhibición de la fusión reportado en el paciente (fig.15).

Con los resultados de reactividad y de fusión celular resultaba interesante evaluar si con *phage display* se podrían identificar los epítomos reconocidos por los anticuerpos de este paciente, además, con el resultado de reactividad (fig. 14C) existía una fuerte sugerencia de que éstos podrían estar asociados a V3.

### **6.3.3 Selección de péptidos con IgG de pacientes**

En esta selección se obtuvieron dieciocho secuencias distintas provenientes del tamizado de dos bibliotecas, lineal de 12 aminoácidos y en asa de 7 aminoácidos, todas asociadas a la región central del asa V3 en la gp120 del VIH-1 (tabla 6). Esta asociación se hizo con base en la alineación de las secuencias aisladas frente a la gp120 del VIH-1, usando el programa *HETEROalign* (como parte del paquete RELIC para *phage-display*, Mandava y cols., 2004). De las dieciocho secuencias aisladas,

dieciseis de ellas (a-p de la tabla 6) se obtuvieron con la IgG 17-2, mientras que las dos restantes (q y r) se seleccionaron con IgG del paciente 3 (IgG 3-1), de hecho, estas secuencias se aislaron del mismo tamizado en el que se obtuvieron las clonas CKC descritas anteriormente. De manera interesante, el paciente 3 presentó baja reactividad frente a los péptidos de V3 comparado con el paciente 17 (fig. 14C), en este caso, sólo se observó un ligero reconocimiento a los péptidos más largos en formato lineal y en asa (1840 y 1841), sin embargo se seleccionaron dos mimótopos de V3.

Dadas las características de los motivos fue posible integrar las secuencias en un solo grupo para describir sus particularidades. Las primeras once secuencias (a-k, tabla 1) provinieron de la biblioteca en asa de siete aminoácidos, las secuencias restantes (l-r, tabla 6) se aislaron de la biblioteca lineal de 12 aminoácidos. Centrando una primera descripción de la secuencias de la biblioteca en asa, pude mencionarse que todas presentaron P(pro) en la posición 1, en la siguiente posición predominó R(arg), en la posición 3 el residuo fue variable, en la posición 4 hubo L(leu) de manera predominante y M(met) como única variante. Las posiciones 5,6 y 7 fueron consenso para el motivo GPG, excepto para la secuencia "e" en la que la G(gly)<sub>7</sub> fue sustituida por A(ala). Otro elemento importante fue el hecho de que la triada GPG además de ser muy conservada, siempre estuvo desplazada hacia el extremo C-terminal del asa.

Por lo que respecta al patrón de motivos de las secuencias lineales, éste no varía mucho del descrito anteriormente: dos de ellas (l y m, tabla 6) conservaron la P(pro) en la posición 1 al igual que los péptidos en asa, los aminoácidos de las posiciones 2 y 3 fueron muy variables, en la posición 4 se repitió la predominancia de L(leu) y M(met) en cinco de las clonas. Todas conservaron constante la G(gly) en la posición 5, seguida de P(pro) en 6, salvo dos excepciones en donde hubo L(leu) y Q(gln), finalmente, la G(gly) en 7 fue constante.

**Tabla 6. Selección de mimótopos V3 de dos bibliotecas *phage display* usando como blanco anticuerpos de dos pacientes**

Posición Secuencia	1	2	3	4	5	6	7
a	P	T	R	M	G	P	G
b	P	T	R	L	G	P	G
c	P	L	R	M	G	P	G
d	P	R	I	L	G	P	G
e	P	R	I	L	G	P	A
f	P	R	Q	L	G	P	G
g	P	R	M	L	G	P	G
h	P	R	L	L	G	P	G
i	P	R	V	L	G	P	G
j	P	R	I	M	G	P	G
k	P	K	L	L	G	P	G
l	T H L P	V	T	L	G	P	G T L
m	H P	A	Y	L	G	P	G D M R R
n	H S	L	R	L	G	P	G V L A S
o	K S	I	S	M	G	P	G Y T L Y
p	Q T	L	Y	L	G	L	G H M M L
q	A G	T	V	S	G	P	G P H H P
r				H	G	Q	G P F W D P T L P

Este es un caso en el que las secuencias de ambas bibliotecas (lineal y en asa) presentaron comportamientos similares, aunque es evidente que la conformación en asa imprimió mayores restricciones como es el caso de la P(pro) en la posición 1 y la triada GPG en el extremo C-terminal. La evaluación global de los motivos permite sugerir que la secuencia consenso está constituida por PRXL/MGPG.

Además del hecho de que esta selección se hizo con anticuerpos policlonales, otra particularidad radica en que la conformación requerida para la interacción con el anticuerpo puede ser cubierta con los dos formatos de péptido (lineal y asa).

Con la definición del epítipo para el mAb 447-52D desarrollada por mapeo con péptidos sintéticos (Gorny y cols., 1992) y *phage display* (Keller y cols., 1993), se reportó que la secuencia reconocida por el mAb 447-52D específico para esta región en V3, está constituida fundamentalmente por

cuatro aminoácidos: GPXR, en donde "X" representa la sustitución de la G(gly) -característica del subtipo B- por diferentes aminoácidos. Sin embargo, es interesante resaltar que en las secuencias obtenidas por *phage display*, aún cuando los autores reportaron aminoácidos variables en la posición designada "X", en el 52% de sus clonas sí se conservó la G(gly) (Keller y cols., 1993). Este hecho es importante, ya que entonces, es claro que el mAb interacciona mejor cuando este aminoácido está presente en la secuencia. Respecto a esta misma posición, los anticuerpos policlonales prácticamente no permitieron sustituciones de este aminoácido.

Otro aspecto para analizar dentro del mismo trabajo de Keller y cols., (1993) es que no se estableció de manera clara una implicación de los aminoácidos que rodeaban al motivo GPXR, sin embargo, la agrupación de las secuencias que hicieron sí consideró la presencia de algunos aminoácidos en el extremo N-terminal. Desde los trabajos de Gorny y cols., (1993), se observó que la Kd para el mAb 447-52D era 50 veces más alta para epítopos en la variante HXBc2 que para MN aunque ambas presentaban la secuencia GPGR, fue entonces que se comenzó a plantear la idea de que la unión del anticuerpo podría requerir o estar influida por aminoácidos alrededor de esta secuencia, en particular en segmento N-terminal del asa V3 (Gorny y cols., 1993; Rosen y cols., 2005).

Una comparación entre los dos epítopos GPXR (mAb) y PRXL/MGPG (policlonal) permite identificar que con la última es evidente la participación del ambiente que rodea a la triada GPG desde el extremo N-terminal. Sin embargo, es necesario definir qué papel estructural desempeñan estos residuos, en particular la P(pro) en posición 1 (tabla 6).

Dentro de las implicaciones que estos resultados pueden tener una interrogante inmediata es si estas variaciones de aminoácidos son un reflejo de lo que ocurre en el virus. En un análisis para determinar la capacidad neutralizante del mAb 447-52D, Zolla-Pazner y cols., (2004a) encontraron que el anticuerpo neutraliza principalmente variantes virales

que presentan GPGR, lo que no ocurre con aquellas que expresan GPGQ. Este comportamiento es crítico, ya que si bien, GPGR está presente en la mayoría de los virus del subtipo B, la variante que sustituye Q(gln) por R(arg) es más abundante en otros subtipos (Gaschen y cols., 1999; Osmanov y cols., 2002; Zolla-Pazner y cols., 2004a). En un análisis más reciente comparando secuencias de V3 obtenidas de bases de datos (Dong y cols., 2005), algunas de las variantes encontradas fueron: GPGQ (más abundante); GPGR; GPMA, GPLA, GPMS, GPLS (últimas cuatro para el subtipo O); GVGR (subtipo F); GIGK (subtipo C); GWGR (subtipo B); GRGR (subtipos B y G), (últimas cuatro identificadas por Nájera y cols. (2002). Aunque no se trata de un comportamiento generalizado, en la mayoría de las variantes se conservan las glicinas. Las implicaciones funcionales que el segmento GPG tiene en esta región son importantes para el virus pues se ha confirmado que estos tres aminoácidos son indispensables en la conformación del asa (giro  $\beta$  tipo *hairpin*; Sharon y cols, 2003; Stanfield y cols., 2004).

#### **6.3.4 Inmunogenicidad de mimótopos y evaluación de actividad biológica**

Algunos de los de los mimótopos aislados fueron elegidos para inmunizar conejos y ratones. Al igual que en los casos anteriores (CKC y ELDKWA) así como en reportes previos (Di Marzo Veronese y cols., 1994), estas secuencias fueron buenos inmunógenos tanto en conejos (figs. 16A y 16B) como en ratones (figs. 17A y 17B), sólo que en este caso, la respuesta humoral generada fue reactiva no sólo con todos los péptidos de V3 sino con secuencias representativas de otras proteínas en el virus como tat y env (Anexo III).

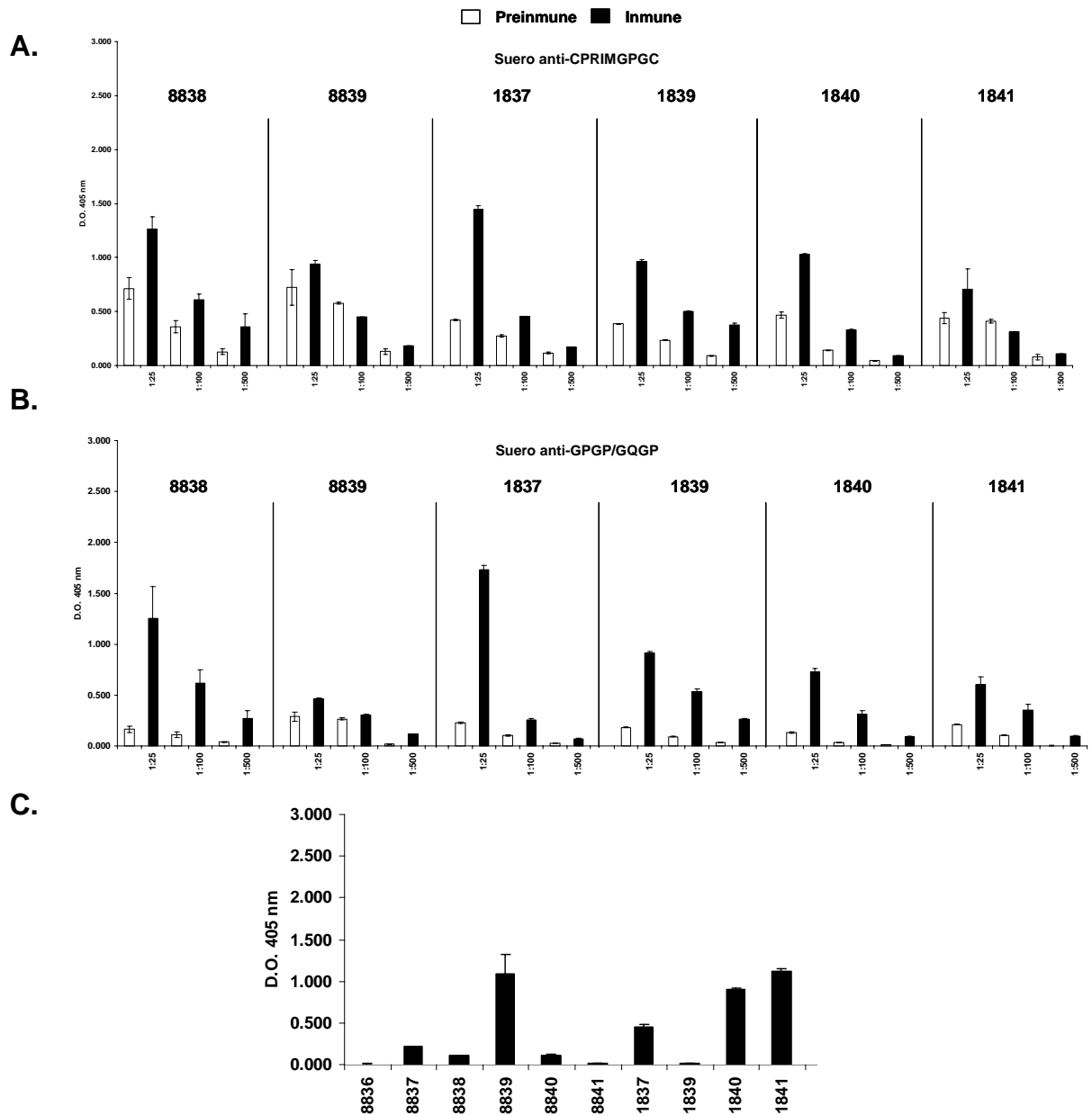


Figura 16. Evaluación de sueros inmunes de conejos frente a péptidos de V3 en ensayo de ELISA. A) Conejo inmunizado con la clona CPRIMGPGC. B) Conejo inmunizado con mezcla de dos clonas GPGP/GQGP. Estas inmunizaciones se hicieron bajo los procedimientos descritos en materiales y métodos, la única variante fue el uso de adyuvante completo e incompleto de Freund. La comparación de reactividad (barras negras) se hizo con los respectivos sueros preinmunes (barras blancas). Los péptidos elegidos se usaron a una concentración de 5µg/mL. C) Reactividad del suero de conejo de referencia WO-07 anti-KRIHIGPGRAFYTTKC obtenido a través del NIH-RRRP. Se presenta únicamente para confirmar que la inmunización con un péptido sintético de V3 no genera una respuesta tan amplia como la obtenida con los mimótopos en A y B. Las diluciones usadas de suero fueron 1:25, 1:100 y 1:500.

Secuencias de los péptidos: 8838 NNTRKSIHIGPGRAF; 8839 KSIHIGPGRAFYTTG, 1837 CKSIHIGPGRAFYTTGC, 1839 CKGIRIGPGRAVYAAEC, 1840 TRPNYNKRKRIHIGPGRAFYTTKNIIGTIRQAH, 1841 CTRPNYNKRKRIHIGPGRAFYTTKNIIGTIRQAH.

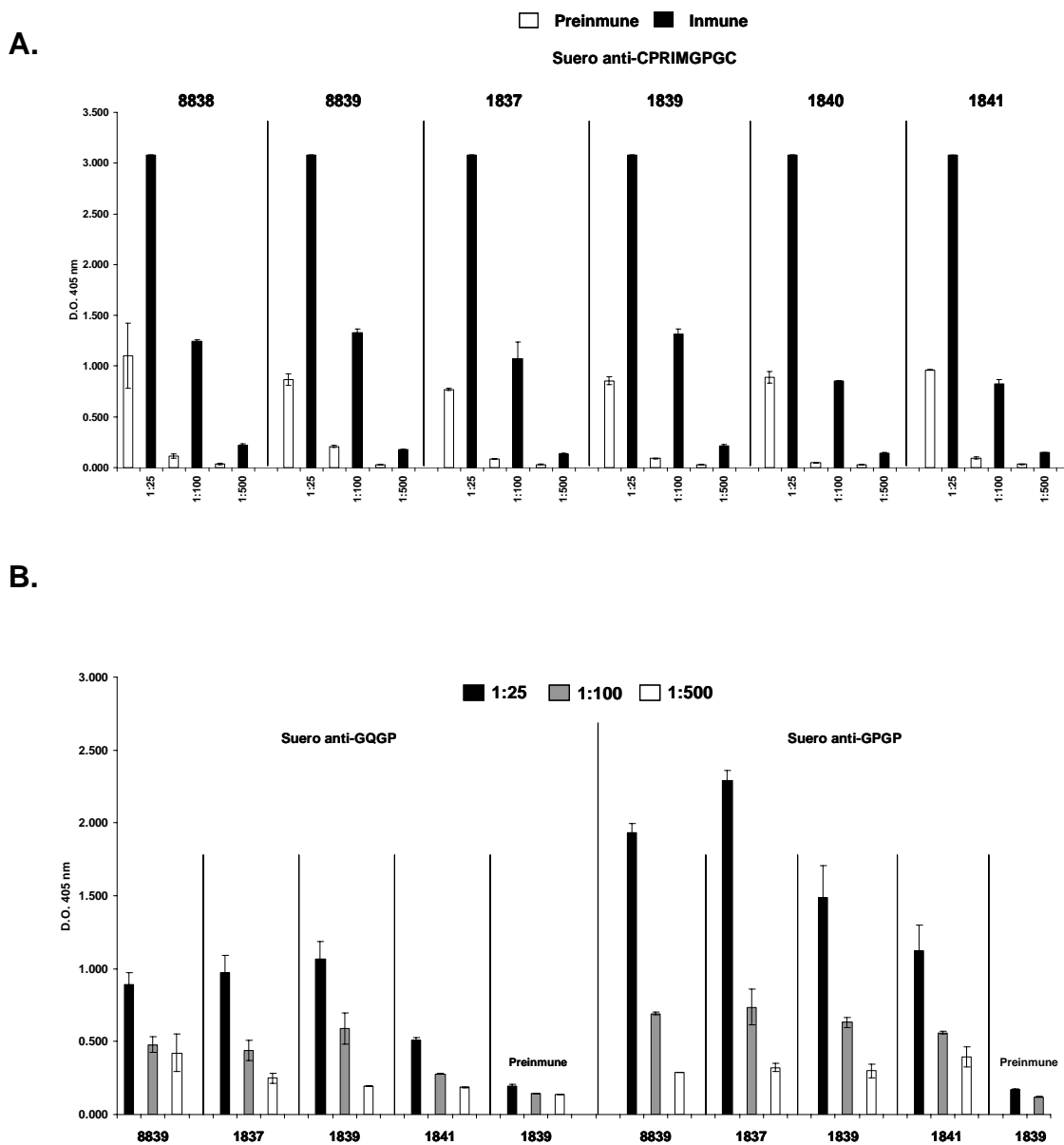


Figura 17. Evaluación de sueros inmunes de ratón frente a péptidos de V3 en ensayo de ELISA. A) Ratones inmunizados con la clona CPRIMGPGC (barras negras), en cada caso se incluyó el suero preinmune (barras blancas) como control. B) Dos grupos de ratones inmunizados con la clona GQGP (izq.) y GPGP (der.), en estos casos la mezcla de sueros preinmunes se evaluó únicamente frente al péptido 1839. Ambos ensayos se hicieron con una mezcla de suero de tres ratones, y se probaron tres diluciones: 1:25, 1:100 y 1:500. Los péptidos sintéticos se usaron a una concentración de  $5\mu\text{g}/\text{mL}$ . Secuencias: 8838 NNTRKSIHIGPGRAF; 8839 KSIHIGPGRAFYYTG; 1837 CKSIHIGPGRAFYYTTC, 1839 CKGIRIGPGRAVYAAEC; 1841 CTRPNYNKRKRIHIGPGRAFYYTKNIIGTIRQAHC.



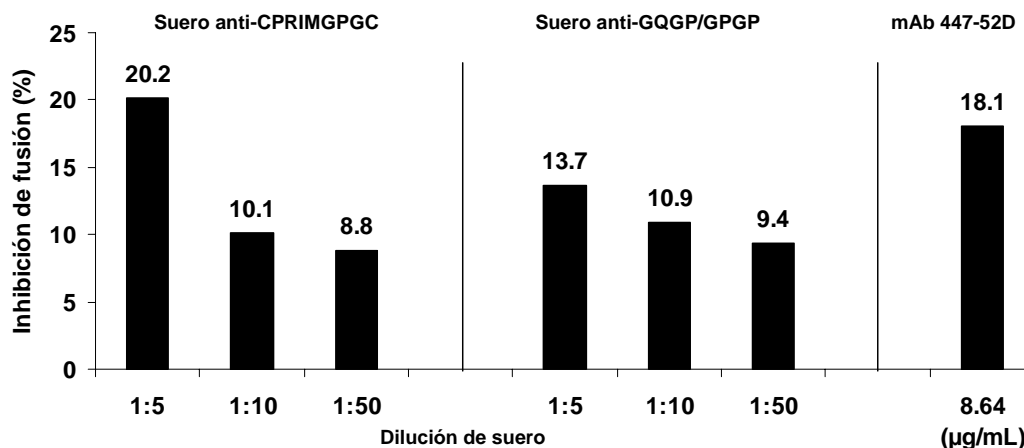


Figura 18. Evaluación de actividad biológica de sueros inmunes de conejos en la fusión celular mediada por las proteínas de envoltura del VIH-1. Los resultados son representativos de tres ensayos independientes, cada uno por triplicado. El resultado representa el porcentaje de inhibición de la fusión que se obtuvo con cada dilución de suero (valor en cada barra), tomando como basal el efecto de los sueros preinmunes a la misma dilución. Este último efecto fue semejante al obtenido en el sistema Env+/CD4 sólo. La última barra corresponde al efecto del mAb 447-52D a una concentración de 8.64µg/mL.

Esta reactividad cruzada tan amplia pudo ser resultado de la combinación particular entre secuencia de péptido acoplada al fago ya que el mAb 447-52D (fig. 14B) no lo presentó así como tampoco el suero inmune de conejo de referencia WO-07 correspondiente a la inmunización con el péptido sintético KRIHIGPGRAFYTTC (fig. 16C) por lo que la reactividad tan amplia no es consecuencia únicamente de la secuencia sino la combinación péptido-fago. Una especulación adicional que debe ser tomada con reserva hasta contar con mayores datos que lo confirmen, es que probablemente la combinación de aminoácidos que integran estos mimótopos, tiene la capacidad de estimular una amplia respuesta humoral. Sin embargo, otro resultado particular con los sueros inmunes de mimótopos de V3 fue el hecho de que dos de ellos inhibieron la fusión celular mediada por las proteínas de envoltura del VIH-1 (fig. 18). El resultado sugiere una actividad específica ya que fueron probados un total de seis sueros de conejo inmunizados con diferentes mimótopos o bien, eluatos de tercera ronda y sólo dos de los sueros inhibieron la fusión

celular en un 20 y 13 %. Si bien, el nivel de inhibición es bajo, es digno de consideración porque se trata de una actividad no observada con sueros hiperinmunes obtenidos con otros mimótopos, incluidos los de 2F5. Se podría suponer que la mayoría de las fusiones (80%) se siguen llevando a cabo exitosamente, pero ello tampoco puede asegurarse con los ensayos que aquí se están reportando ya que en este tipo de eventos, se ha observado tanto *in vivo* como *in vitro* que las células que circundan a las que se están fusionando pueden afectarse en diversos mecanismos como activación, apoptosis, etc., (efecto de células espectadoras o *bystander cells*) (Douek, 2003). En ese sentido, es necesario evaluar si el efecto inhibitorio de los sueros podría afectar a las células que se siguen fusionando. Otro factor que debe ser considerado es que se requiere una concentración más alta de anticuerpos neutralizantes para inhibir la fusión célula-célula respecto a la fusión virus-célula (Allaway y cols., 1993; Zwick y cols., 2001c). Lo anterior debido a que tanto en células infectadas como en las transfectadas hay una mayor expresión del complejo env gp120/gp41 respecto al expresado en la membrana viral (Connor y Ho, 1994). Por otro lado, la interacción de membranas entre células supone una mayor superficie de contacto que permite más interacciones efectivas entre el complejo viral, potenciada a su vez por otras moléculas asociadas a la membrana (Hioe y cols., 1998; Tardif y Tremblay, 2005). Estos factores pudieron contribuir a los bajos niveles de inhibición de la fusión obtenidos bajo el efecto de los sueros hiperinmunes. Más aún, es claro que para el caso del control positivo utilizado (mAb 447-52D, fig. 18) sí era necesario emplear una concentración mayor, pues con 8.64 µg/mL apenas se tuvo el 18% de inhibición de la fusión cuando se ha reportado que esa cantidad es suficiente para neutralizar virus al menos en un 50% (Gorny y cols., 1993). La búsqueda de respuestas para algunas de las interrogantes que surgen a partir de los resultados de inhibición de la fusión celular obtenida puede abrir nuevos campos de investigación, no obstante, debe enfatizarse que tanto las fusiones célula-célula como las virus-célula son

importantes por que conllevan efectos que contribuyen a la patogénesis del sida (Huerta y cols., 2005).

Con esta serie de resultados se identificaron diversos aspectos acerca del asa V3 y la aplicación de *phage display* para el análisis del epítipo central GPGR. En primer lugar fue posible realizar una selección de mimótopos con el uso del suero de un paciente con actividad como inhibidor de fusión celular (fig. 15) y con reactividad frente a péptidos sintéticos de V3 (fig. 14C). La selección de péptidos con los dos formatos de bibliotecas evidencia requerimientos de aminoácidos particulares para la interacción con los anticuerpos lo cual supone implicaciones conformacionales que deben ser comprobadas a través del modelado molecular de estos péptidos. Sin embargo, queda claro que con la selección de anticuerpos de pacientes los aminoácidos esenciales para la interacción fueron distintos respecto al mAb neutralizante 447-52D. En el primer caso fue evidente que el motivo GPG fue fundamental y prácticamente invariable, sólo en dos de los mimótopos la P(pro) fue sustituida por otro aminoácido L(leu) o Q(gln), pero las dos glicinas siempre estuvieron conservadas. Este hecho concuerda con lo reportado para las principales variantes del epítipo en el virus y además para la conformación determinada por cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear (Sharon y cols, 2003; Stanfield y cols., 2003).

Aunado a lo anterior, estuvo el comportamiento inmunogénico de los mimótopos, fue interesante la respuesta humoral con un amplio grado de reconocimiento a diferentes péptidos sintéticos, obtenida tanto en conejos como en ratones. Este resultado requiere un análisis más profundo que ayude a consolidar las propuestas de emplear los péptidos en fago como inmunógenos (Di Marzo Veronese y cols, 1994; van Houten y cols., 2006). Por otro lado, el efecto de los sueros hiperinmunes como inhibidores de la fusión celular sugiere que los anticuerpos obtenidos por esta vía pueden presentar una actividad biológica específica en epítopos del VIH-1.

La continuidad del trabajo permitirá contribuir al entendimiento de la especificidad y estructura de los anticuerpos generados y el epítipo que reconocen, encaminado principalmente al diseño racional de inmunógenos que induzcan una respuesta humoral neutralizante en el control del VIH-1. Por otro lado, es necesario entender las funciones biológicas de la variación de aminoácidos en epítopos del virus (como mejores partículas virales infectivas o bien, en la evasión de la respuesta humoral) sumado a los efectos que estas variaciones pueden tener en la unión epítipo-parátipo.

### **6.3.5 Anticuerpos neutralizantes en el control del VIH-1**

Durante muchos años, las opiniones respecto al tipo de respuesta que debía estimularse con una vacuna para VIH-1 estuvieron polarizadas entre la respuesta humoral y la celular (Zolla-Pazner, 2004). Actualmente, el consenso de opiniones apunta hacia el estímulo de ambas respuestas para obtener un máximo de protección, como vacuna o control vía inmunización pasiva (Zolla-Pazner, 2004; McMichael 2006). Sin embargo, la identificación de epítopos que induzcan anticuerpos neutralizantes (NAb's) potentes ha sido uno de los principales retos para los cuales existen pocas propuestas. La importancia de estos anticuerpos en el control del virus ha quedado evidenciada en varios estudios, por ejemplo, se sabe que individuos con bajos títulos de NAb's progresan más rápido a sida (Robert-Guroff y cols., 1988); en algunos de los sujetos infectados de progreso lento a sida se identificó que tenían altos títulos de NAb's de amplia especificidad, es decir, neutralizaban cepas de laboratorio y aislados virales (Burton y Montefiori, 1997; Pilgrim y cols., 1997; Li y cols., 2006); la transmisión de VIH-1 materno-fetal se correlaciona inversamente con los títulos anticuerpos encontrados en la madre (Ungen y cols., 1992); los títulos de NAb's correlacionan positivamente con la eficiencia del TARV (Morris y cols., 2001). Por otro lado, está la presencia de cuatro anticuerpos monoclonales de potente actividad neutralizante: b12, 2G12,

2F5 y 4E10, los dos primeros dirigidos a epítomos en gp120 y los dos últimos a gp41. El estudio con éstos ha permitido determinar que existen sitios vulnerables en el complejo de envoltura viral, por ejemplo, recientemente se definió que el epítomo reconocido por el mAb b12 se sobrepone parcialmente con el sitio de interacción con la molécula CD4 y que es una región conformacionalmente invariable a diferencia del sitio de interacción con CD4 (Zhou y cols., 2007). La unión de b12 con su epítomo impide que el virus interaccione adecuadamente con la molécula CD4 y de esta manera se bloquea el mecanismo de infección. Para 2F5 y 4E10 aún no está claro porqué reconocen epítomos muy conservados pero en estos casos su cercanía a la membrana juega un papel muy importante (Haynes y Montefiori, 2006). Tanto la existencia de NAb's como las evidencias clínicas respaldan la importancia de continuar con estudios que permitan proponer epítomos capaces de estimular una respuesta humoral neutralizante amplia y potente, en la medida en que se logre, podrán ser considerados como componentes de vacunas. La tarea no es fácil ya que en el caso de b12, 2F5 y 4E10 que reconocen epítomos conservados, éstas secuencias no son inmunogénicas, por otro lado, el epítomo de 2G12 involucra interacción con carbohidratos hecho que ha dificultado su estudio (Zolla-Pazner, 2004; Pantophlet y Burton, 2006).

Otro aspecto para tomar en cuenta además de la estructura primaria, es la conformación y el contexto en que estos epítomos deben ser presentados, es por ello que identificar únicamente secuencias de aminoácidos no ha sido suficiente. Paralelamente, se busca también el adyuvante idóneo para estas propuestas.

Los mimótopos aislados en este trabajo aún distan de ser componentes de una vacuna, pero son relevantes no sólo por las secuencias de aminoácidos y los patrones encontrados, sino por la forma en que están presentados (péptido+fago, lineal o en asa) y que en todos los casos fueron estructuras inmunogénicas.

## 7. DISCUSIÓN

En este trabajo se han estudiado tres epítomos, todos ellos con características, funciones y propiedades peculiares en el VIH-1. Con sus respectivas variantes, en todos los casos se obtuvieron colecciones de péptidos con una clara relación al epítomo en estudio. Algunas de las implicaciones que estos grupos de péptidos tienen como parte de la investigación en VIH-1, han sido comentadas en cada apartado de resultados. Es por ello que en esta sección, la discusión se centrará en el potencial de la metodología *phage display* como herramienta para el estudio del VIH-1.

En primer lugar, se identificaron puntos críticos a definir cuando se plantea una estrategia de selección. Como uno de los aspectos relevantes destaca la selección del tipo de biblioteca de péptidos en fago. Con la experiencia en el estudio de los tres epítomos, fue evidente que la relación aparente que pueda existir entre los péptidos expresados (lineal o asa, así como su tamaño) y el epítomo que desea estudiarse no es un hecho que debe considerarse como definitivo para elegir una sola biblioteca. En realidad, conviene el análisis simultáneo con diferentes bibliotecas. Lo anterior quedó evidenciado por ejemplo al obtener mimótopos del epítomo CSGKLIC únicamente con la biblioteca de péptidos lineales de 12 aminoácidos, pese a que dada la conformación nativa del epítomo en asa, las expectativas estaban orientadas hacia la obtención de secuencias con la biblioteca de siete aminoácidos en asa.

En el caso de 2F5, aún cuando con ambos formatos (lineal y asa) se obtuvieron mimótopos de ELDKWA, las selecciones brindaron información distinta, en el formato lineal (biblioteca 12), la variabilidad de las secuencias fue mayor, mientras que con la biblioteca en asa (C7C) la variabilidad no fue tolerada y la posición del epítomo fue restringida a los

dos extremos en el asa, hecho determinado por un solo aminoácido (L(leu)) que mejoró la capacidad de unión con el anticuerpo.

De esta forma, a partir del tamizado de tres bibliotecas se identificó una con la cual proponer un nuevo modelo peptídico de epítipo mínimo para el anticuerpo monoclonal neutralizante 2F5, en donde la secuencia DKWA fue invariable y no permitió ningún tipo de reactividad cruzada en estos aminoácidos como se había reportado anteriormente (Purtscher y cols., 1999; Menendez y cols., 2004).

Respecto a la selección de péptidos miméticos del DPN en el asa V3, en este caso fue interesante identificar patrones de selección similares con las dos bibliotecas (lineal y en asa), aunque hubo también claras restricciones en la secuencia de aminoácidos impuestas por el formato en asa ya que la posición de la triada GPG se limitó al extremo N-terminal y fue imprescindible la presencia de P(pro) en el extremo C-terminal de la secuencia.

Además del análisis simultáneo de distintas bibliotecas, otro aspecto que caracterizó este trabajo fue el tipo de bibliotecas elegidas, es decir, con secuencias de péptidos al azar y de gran complejidad (aproximadamente del orden de  $10^9$  secuencias de péptidos diferentes en cada una). Por la experiencia de diversos grupos de trabajo (Sidhu y cols., 2000; Irving y cols., 2001; Gazarian 2005), se opta por la elección de este tipo de bibliotecas primarias (o al azar) cuando no hay un conocimiento previo del epítipo. Para los tres epítopos estudiados, las bibliotecas comerciales elegidas fueron una excelente herramienta.

Con base en las características de las secuencias aisladas, ahora se cuenta con otras herramientas para llevar a cabo estudios más detallados de este tipo de interacciones epítipo-parátipo. Por ejemplo, en el caso de los mimótopos CxxKxxC, podría plantearse la generación de una nueva biblioteca (de segunda generación o secundaria) en la que se fijen los aminoácidos que fueron invariables, es decir cisteínas y lisinas en CxxKxxC, para que de esta manera se trate de identificar si en efecto

cualquier aminoácido puede presentarse en las posiciones variables o bien, si el espectro es más restringido respecto a lo que ahora pensamos. Por lo tanto, en términos generales, la elección de biblioteca dependerá del tipo de estudio que se pretenda realizar, como en este caso, uno de los intereses radicó en identificar las preferencias de selección de cada tipo de anticuerpo usado, las bibliotecas primarias fueron una excelente fuente de péptidos.

El segundo aspecto importante a definir en los tamizados de bibliotecas primarias *phage display* es el blanco para la selección. Una de las principales aportaciones de este trabajo fue el uso de anticuerpos policlonales de sujetos infectados con VIH-1. En distintas investigaciones ya se había explorado este campo usando anticuerpos monoclonales como 447-52D (Keller y cols, 1993) y 2F5 (Conley y cols., 1994b; Menendez y cols., 2004). Con la estrategia planteada en este trabajo, se comprobó que los anticuerpos policlonales anti VIH-1 pueden ser tan eficientes en la selección como lo son los monoclonales, entendiendo eficiencia como la obtención de poblaciones enriquecidas de mimótopos. Anteriormente sólo existía el reporte de dos trabajos en los que usaron sueros de pacientes infectados con VIH-1, para llevar a cabo la selección frente a este tipo de bibliotecas (Scala y cols, 1999; Enshell-Seijffers y cols., 2001), aunque fueron trabajos pioneros en el área, en ambos casos no se logró obtener colecciones de péptidos que permitieran identificar las características descritas en el presente trabajo. Como una de las principales aportaciones, identificamos que es necesario contar con una cantidad mínima de anticuerpos en suero (caso específico epítipo CSGKLIC) para tener una selección exitosa, o bien, identificar además una actividad biológica mediada por anticuerpos (caso específico V3 y el efecto del suero del paciente sobre la fusión celular).

Tomando en conjunto los dos aspectos, tanto la selección de bibliotecas a tamizar como el título de anticuerpos en suero, se



identificaron como los principales parámetros encaminados a mejorar la eficiencia, el pronóstico y la reproducibilidad de las selecciones llevadas a cabo con *phage display*.

Ahora bien, respecto a la importancia de la selección de mimótopos del VIH-1 a continuación se presentan tres aplicaciones potenciales. La intención es destacar para qué pueden ser útiles estas colecciones de mimótopos con las que ahora se cuenta, con base en los resultados obtenidos y enfocados a problemas específicos del estudio con VIH-1.

1. Investigación de interacciones gp120-gp41. Se ha sugerido que el epítipo ID en la gp41 interacciona con el dominio C5 de la gp120, a manera de inserción (Helseth y cols., 1991; Schulz y cols., 1992). Con las versiones de esta región representadas a través de los mimótopos CxxKxxC, es posible desarrollar estrategias para estudiar a fondo la naturaleza de esta interacción y analizar por ejemplo qué aminoácidos participan en ambas proteínas. La importancia de esta aplicación abre oportunidades para comprender con mayor detalle los cambios conformacionales que ocurren en el complejo *env* durante los diferentes estadios del virus.

Dentro del mismo campo, otro aspecto de reciente explotación es la generación de nuevos péptidos y moléculas de tamaño pequeño como inhibidores en diferentes etapas de la infección viral (Kazmierski y cols., 2006), por ejemplo: a) Inhibición de la interacción entre las glicoproteínas de envoltura (complejo *env* gp120/gp41) y receptor y co-receptor en la célula blanco (CD4/receptor de quimiocina CXCR4 ó CCR5) (Kazmierski y cols., 1996; Yamazaki y cols., 2003); en este caso los mimótopos de V3 podrían ser de utilidad pues es una región primordial para llevar a cabo estas interacciones; b) Inhibición de la fusión de membranas; c) Inhibición de cambios conformacionales en gp41 (Jin y cols., 2005). La eficacia de péptidos como inhibidores ha sido comprobada, un ejemplo es el péptido

sintético T-20 (*Enfuvirtide*, De Clercq, 2002), un inhibidor de la fusión de membranas viral y celular impidiendo la transición de gp41 al estado fusogénico (Furuta y cols., 1998), producto comercial que se ha incluido en los cuadros de TARV de algunos países. Sin embargo, aunque representa una nueva generación de antirretrovirales de gran potencial, es imperativo obtener nuevos péptidos que generen menos daños en el sitio de administración, que tengan efectos terapéuticos eficientes y que sean accesibles para todo tipo de público. Se trata de un campo de investigación enfocado al desarrollo y obtención de nuevos péptidos (Al-Olbeidi y cols., 1998; Hartley y cols., 2004) con excelentes perspectivas en desarrollo farmacéutico (Kazmierski y cols., 2006). Los péptidos obtenidos por *phage display* podrían ser una buena fuente para este tipo de estudios ya que es posible obtener simultáneamente distintas versiones de una secuencia en particular, esto a diferencia de los péptidos sintéticos, además, las clonas de fago se replican y purifican con métodos sencillos.

2. Herramientas de diagnóstico. Un interés para estas colecciones de mimótopos es evaluar su potencial como métodos de diagnóstico, ya sea para complementar las existentes o para obtener nuevos, dada la fácil y relativamente económica manera de replicar el fago.

Tal y como se describió en la sección de resultados 6.1.6 uno de los mimótopos CxxKxxC (FGCLGKLVCDPPY) fue enfrentado a 22 preparaciones de IgG (fig. 6B) de las que aproximadamente el 82% presentó niveles óptimos de reactividad. Este resultado respalda las propiedades antigénicas de esta secuencia como representativa del epítipo nativo en el virus. Por otro lado, un aspecto fundamental en el desarrollo de métodos de diagnóstico es la obtención de herramientas con mayor sensibilidad.

Para analizar este aspecto y teniendo el antecedente de la reactividad por ELISA comentada en el párrafo anterior, como parte de un estudio desarrollado en colaboración con la Universidad de Nantes, Francia, se

desarrolló un trabajo en donde bajo un formato de análisis simultáneo para proteínas (*protein-array*), con un sistema de detección por fluorescencia, fue posible evaluar la reactividad de cinco preparaciones de IgG de nuestro mismo grupo de pacientes (anexo II) frente a dieciocho de los mimótopos CxxKxxC. En términos generales, este formato de análisis fue de alta sensibilidad, requirió del uso de menos muestras, 1000 veces menos antígeno (fago) y 100 veces menos anticuerpo, además de permitir analizar simultáneamente los dieciocho mimótopos frente a varias preparaciones de IgG (Arnaud y cols. 2004; incluido en publicaciones). El reporte representa por lo tanto, una buena aproximación para la propuesta del uso de mimótopos como herramientas de diagnóstico, en donde una de las principales ventajas es la fácil obtención de los mismos ya que el fago se replica y purifica de manera sencilla.

3. Nuevos inmunógenos. Tradicionalmente los péptidos sintéticos han sido usados ampliamente como inmunógenos para estimular la respuesta inmune humoral, una vez que se ha realizado el mapeo y definición del epítipo de interés. El procedimiento de mapeo es fundamental pues se asume que la inmunización con el epítipo preciso, llevará a la obtención de anticuerpos neutralizantes efectivos (Gershoni y cols., 2007). La meta con estos estudios es identificar las secuencias mínimas capaces de reproducir las características inmunogénicas que eviten el uso del antígeno completo. Estos requerimientos se han abordado con el uso de péptidos sintéticos, sin embargo existen limitaciones para las cuales la forma de selección y expresión de los péptidos de *phage-display* ofrecen otras propiedades. En primer lugar con los mimótopos, se logra imitar epítopos con distintas funciones en el virus (*epitope mimic*), pero además, dadas sus propiedades para caracterizarlos se pueden identificar secuencias con propiedades que rebasen la mera imitación funcional (*functional mimic*) o unión epítipo-parátipo (antigenicidad). El requisito para un buen candidato como inmunógeno (*immunogenic peptide mimic*),

es reproducir también las características estructurales (*structural mimic*) lo cual conlleva a identificar los aminoácidos críticos para la unión (Irving y cols., 2001; Wang y cols., 2004). Con las colecciones de mimótopos para los tres epítomos estudiados fue posible identificar y caracterizar todos estos aspectos: unión o antigenicidad, imitaciones estructurales e inmunogénicas. Además, en el caso de V3, se logró obtener sueros capaces de inhibir la fusión celular. Sin embargo, la controversia en este resultado radica en la forma de evaluar la especificidad de los anticuerpos obtenidos, pues también se encontró que algunos de los mimótopos de V3 generaron anticuerpos con una amplia reactividad cruzada para otras secuencias en el VIH-1, este comportamiento no ha sido reportado con anterioridad para los péptidos en fago por lo que se requiere de un estudio más detallado para comprender estas propiedades.

Bajo el formato péptido-fago se cubre adicionalmente otro requerimiento para inmunizar pues el fago funge como adyuvante (Greenwood y cols., 1991; Demangel y cols., 1998) y acarreador al mismo tiempo (van Houten y cols., 2006). Aunque la FDA no ha aprobado ninguna vacuna con fagos filamentosos muchas investigaciones para diversos agentes infecciosos están enfocadas en consolidar esta aplicación de *phage display* (van Houten y cols., 2006; Mullen y cols., 2006).

Otro aspecto de importancia que se suma a los anteriores, son las implicaciones estructurales que pueden conllevar las variaciones de aminoácidos identificadas. Las características estructurales que se han discutido con base en el análisis de secuencias en los mimótopos se realizaron tomando como referencia los datos de cristalografía de rayos X de los epítomos nativos en el virus así como por la presencia de aminoácidos específicos en cada grupo de secuencias: CxxKxxC para el epítomo ID, LDKWA ó DKWA para el epítomo reconocido por 2F5 y GPG para el DPN de V3. Sin embargo, hay elementos que no pudieron ser aclarados con los análisis llevados a cabo. Por ejemplo, hasta que punto

pueden variar los aminoácidos designados “x” en los mimótopos CxxKxxC, o bien, cuál es la estructura que impone el asa de siete aminoácidos para que el mAb 2F5 sea capaz de rechazar cualquier variante del epítipo, cual es el papel que juegan las prolinas que anteceden a la secuencia GPG y finalmente, porqué en ninguno de los mimótopos CxxKxxC se obtuvo la secuencia del epítipo nativo. Evidentemente, el ambiente generado por la suma de los aminoácidos que integran a los motivos y los que los rodean, así como el formato de los péptidos lineales o en asa son elementos que tienen una implicación en la estructura de los mimótopos, misma que se refleja en la interacción con los anticuerpos. Es por ello que dentro de la vasta colección de secuencias en cada biblioteca, solamente se seleccionan algunas en particular. No obstante, es necesario desarrollar métodos de modelado molecular de estas secuencias en donde se refleje su expresión en el contexto del fago, la pIII del mismo y la secuencia de unión (GGGS) con el péptido, ya que la conformación adoptada por los péptidos seguramente es consecuencia de la suma de todos estos elementos. El objetivo será en todo caso poder identificar las implicaciones estructurales que tiene cada variante del epítipo. Como una primera aproximación, Jelinek y cols., (1997) propusieron mediante análisis por resonancia magnética nuclear (NMR) que el péptido GPGRAF expresado en el fago fd, era capaz de adoptar una conformación similar a la que presenta la misma secuencia como péptido sintético acoplado a un Fab y determinado por cristalografía de rayos X. En la medida en que se integren técnicas para el análisis de la estructura de péptidos en fago, se podrá avanzar en la generación de inmunógenos que recreen el ambiente molecular de los epítopos nativos y que permitan mejorar sus propiedades antigénicas e inmunogénicas para que sean usadas como métodos de diagnóstico, agentes terapéuticos y como componentes de vacunas.

*Consideración final.* Desde una perspectiva particular, una de las principales dificultades en las investigaciones con el VIH-1 ha sido la limitación en los modelos de estudio propuestos. Evidentemente, los mecanismos de infección y de evasión de la respuesta inmune, aunados la variabilidad que presenta el virus no son hechos sencillos de abordar, sobre todo porque rebasan los métodos tradicionales de análisis y pensamiento en inmunología. En este trabajo hemos propuesto que *phage display* puede ser una herramienta útil que contribuya al estudio del VIH-1, específicamente a epítomos del complejo de envoltura que están relacionados con la respuesta humoral en los sujetos infectados. La estrategia experimental seguida permitió obtener resultados relevantes no reportados con anterioridad. Sin embargo, queda claro que derivado de lo anterior surgen interrogantes que requieren el desarrollo de nuevas líneas de investigación. Esta tesis se ha centrado en el estudio de tres epítomos del VIH-1 tomando como eje la aplicación de *phage display*, pero debe aclararse que la experiencia obtenida aquí, así como en grupos de investigación a nivel mundial deja claro que *phage display* es una metodología de estudio que como tal, requiere de la integración de otros métodos de análisis que permitan comprender de manera integrada los resultados que se obtienen. En ese sentido, en cada apartado de ese trabajo se resaltaron los datos relevantes pero también se señalaron los aspectos limitantes de la estrategia que deberán ser considerados en futuros análisis.

Finalmente, a manera de integración, el esquema de la figura 19 presenta los puntos relevantes identificados en cada uno de los epítomos que se estudiaron.

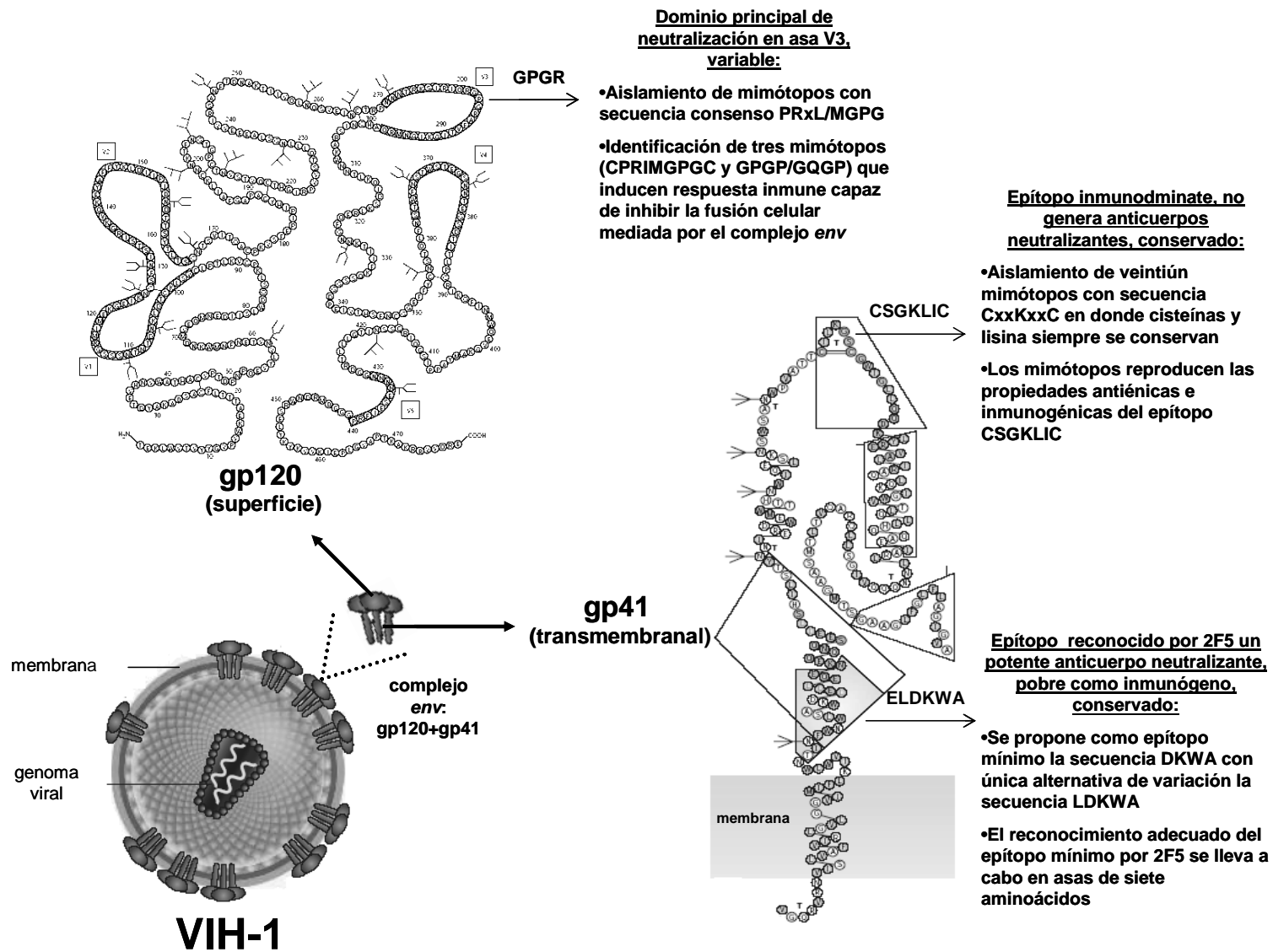


Figura 19. Aspectos relevantes del trabajo en el estudio de tres epítipos de envoltura del VIH-1.

## 8. CONCLUSIONES

1. Teniendo como sistema de estudio el VIH-1, el uso de *phage display* permite la selección de grandes colecciones de péptidos que pueden contribuir de manera significativa a la elucidación de la estructura de epítomos en términos de composición de aminoácidos, conformación y comportamiento antigénico e inmunogénico.

Para los tres epítomos estudiados se puede establecer lo siguiente:

- Bajo las condiciones definidas, tres rondas de tamizado permitieron convertir una biblioteca 12mer lineal de  $10^9$  secuencias en una población en la que el 79% de los fagos representan una familia de mimótopos del epítomo ID en la gp41 del VIH-1. Los mimótopos tuvieron la secuencia CxxKxxC en donde “x” representa aminoácidos variables. Los mimótopos reproducen la estructura (conformación), antigenicidad e inmunogenicidad del epítomo nativo.
- Péptidos en asa de siete aminoácidos fusionados a la pIII del fago m13 brindan una conformación adecuada para la interacción con el mAb neutralizante 2F5. Con este formato, el anticuerpo no tolera ninguna variación de aminoácidos siendo la secuencia mínima para la interacción DKWA mientras que la adición de leucina (LDKWA) mejora la unión.
- Los mimótopos asociados al asa V3 presentaron una secuencia consenso PRxL/MGPG en la que la triada GPG es invariable. Como inmunógenos, estas secuencias estimularon una respuesta de amplia especificidad en



animales, pero tres secuencias en particular: CPRIMGPGC y GPGR/GPGR generaron sueros hiperinmunes capaces de inhibir la fusión celular mediada por las proteínas de envoltura del VIH-1.

2. Se pueden llevar a cabo tamizados exitosos con anticuerpos policlonales anti VIH-1 provenientes de pacientes, siempre que se establezca un umbral de anticuerpos para un epítipo en particular.
3. Es recomendable el tamizado de varias bibliotecas primarias para identificar las preferencias de unión de anticuerpos cuando éstos se usan como blancos de selección.

## Perspectivas

1. El modelado molecular de los mimótopos podría brindar mayor conocimiento acerca de la estructura terciaria de las asas CxxKxxC, xxLDKWA y DKWAxx. En este sentido es interesante comprender hasta que grado son variables los aminoácidos representados como “x” y cual es su función como soporte de los aminoácidos invariables.
2. En el caso de los péptidos de 12 aminoácidos, suponemos que los residuos que rodean al motivo identificado deben desempeñar un papel que quizás no sea una interacción directa con el anticuerpo, pero sí una contribución al ambiente molecular en el cual el motivo está presentado. Por lo tanto, eso podría favorecer su selección de las bibliotecas. Eso debe ser confirmado también con modelado molecular.
3. Los estudios acerca del carácter inmunogénico de los mimótopos (como péptidos en fago), han estado restringidos a la determinación de anticuerpos. Este campo requiere análisis más detallados que permitan entender cómo evoluciona la respuesta inmune en su conjunto, es decir, generación de respuesta celular y humoral.

## Anexo I

### Estructura del Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1)

El VIH-1 es un retrovirus que pertenece a la familia de los lentivirus. Se trata de retrovirus esférico de entre 100-120nm de diámetro. Esta forma viene determinada por tres capas concéntricas: una bicapa lipídica externa derivada de la célula del hospedero. En ella se encuentra el complejo de glicoproteínas (gp) de envoltura (env) constituido por trímeros de gp120 (en la superficie) y gp41 (transmembranal). La siguiente estructura es una matriz esférica formada por la polimerización de monómeros de la proteína 17 (p17) y finalmente, una última capa que es la cápside, constituida por la proteína 24 (p24) que rodea la nucleocápside, la cual contiene dos cadenas de ARN, la transcriptasa reversa la proteasa viral y la integrasa (fig. AI-1).

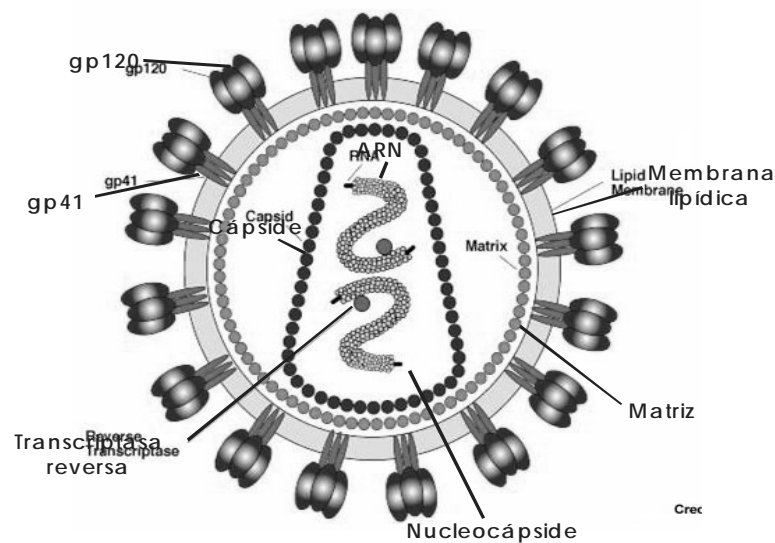


Figura AI-1. Estructura del VIH. La bicapa lipídica es de origen celular e incluye el complejo de envoltura (env) constituido por trímeros de gp41 y gp120. Las proteínas estructurales que forman el core son la matriz (p17), la cápside (p24) y la nucleocápside (p7) que contiene el ARN y la transcriptasa reversa.

Respecto a la organización de su genoma, el VIH-1 tiene genes encargados de codificar los componentes de la partícula viral (genes estructurales) y de regular la expresión de los mismos (genes reguladores). Los tres genes principales, que codifican las proteínas respectivas correspondientes a los antígenos internos, son comunes a todos los retrovirus y se denominan *gag* (antígeno de grupo), *pol* (polimerasa) y *env* (envoltura). El esquema clásico de la estructura de un genoma

retroviral contiene: 5'LTR-*gag-pol-env*-LTR 3' (fig. AI-2). Las regiones LTR (*long terminal repeat*), están implicados con la replicación viral. El LTR 5' está involucrado en los procesos de inicio y regulación de la transcripción viral, mientras que el LTR 3' participa en procesos post-transcripcionales, tales como la poliadenilación y producción de transcritos virales. De los genes estructurales, el gen *gag* codifica las proteínas de la cápside, matriz y nucleocápside; las cuales son derivadas de la degradación proteolítica de la proteína Gag. El gen *pol* codifica la transcriptasa reversa (RT), proteasa (PR) e integrasa (IN). El gen *env* codifica las proteínas de la envoltura viral (gp 120 de superficie y gp41 transmembranal), estas son producidas por la degradación de su proteína precursora: gp160. En Golgi, la gp160 es glicosilada, proceso que es requerido para el plegado de la proteína y la obtención de una conformación estable. Posteriormente en Golgi-trans la proteína se escinde por endoproteasas como furina para dar las dos glicoproteínas asociadas por interacciones no covalentes. El complejo *env* se expresa inicialmente en la superficie de la célula infectada (fig. AI-3) (Morrow y cols., 1994; Wyatt y Sodroski, 1998).

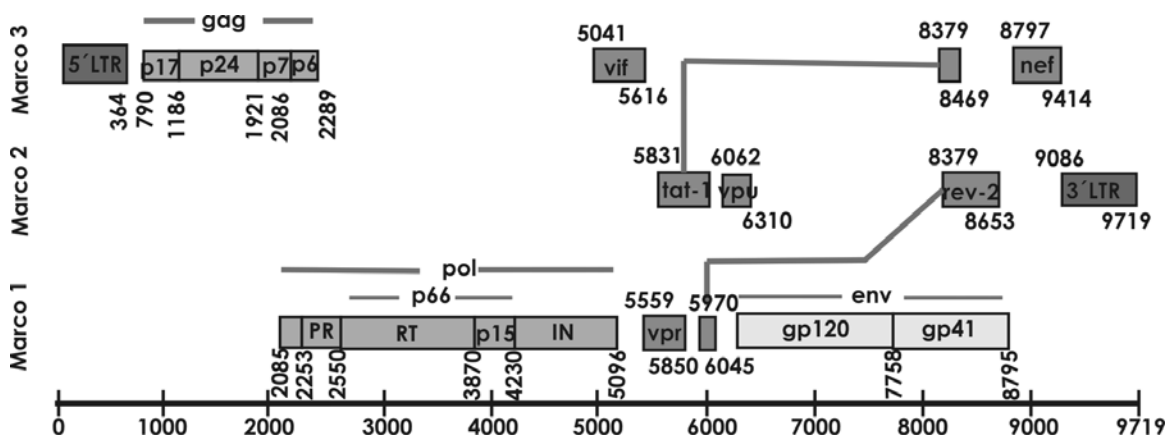


Figura AI-2. Organización del genoma del VIH-1. Se muestran los tres marcos de lectura y pueden distinguirse cuatro regiones del genoma: (1) LTR; regiones reguladoras localizadas en ambos extremos de las moléculas de ARN. (2) El gen *gag-pol* que codifica dos precursores de poliproteínas. La poliproteína Gag incluye las proteínas de la nucleocápside, y la poliproteína Gag-Pol comprende proteínas estructurales y tres enzimas virales: PR, RT e IN. (3) El gen *env* que codifica la gp160 precursora de gp41 y gp120. (4) Genes accesorios del VIH-1: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu* (modificado de Sierra y cols., 2005).

Además, el VIH-1 contiene en su ARN de 9.2 kB, seis genes accesorios (*vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* y *nef*) que contribuyen a su complejidad genética. Tat y Rev son proteínas reguladoras que se acumulan dentro del núcleo y se unen a regiones definidas del ARN viral. La proteína Tat es un potente activador transcripcional de la región promotora de LTR y es esencial para la replicación viral (Gatignol y Jeang, 2000). Rev activa la expresión de genes estructurales y enzimáticos e inhibe la producción de proteínas reguladoras, por lo tanto promueve la formación de partículas virales maduras (Cullen, 1998). El producto del gen *nef* interviene en las señales apoptóticas para promover la producción del virus, contribuye a disminuir la función inmune de las células infectadas mediante regulación negativa de la expresión de moléculas CD4, promueve el escape de las células infectadas de los linfocitos T citotóxicos (CTLs) por regulación negativa de la expresión de moléculas del MHC clase I y de las células NK por regulación positiva del MHC-I-like. El producto del gen *vpr* detiene el ciclo celular de las células infectadas en la fase G2, actúa como un promotor principal en la infección en macrófagos (Gallo, 2002). Vpu es importante en el proceso de liberación de los viriones; además está involucrada en el momento en que se degradan los complejos CD4-gp160 dentro del retículo endoplásmico y por lo tanto permite reciclar gp160 para la formación de nuevos viriones (Bour y cols., 1995). Vif participa en los mecanismos de transporte intracelular de los componentes virales (Cullen, 1998).

**Proteínas de envoltura.** El complejo de envoltura está formado por trímeros de gp120 y gp41 (fig. AI-3). La gp120 media la unión del virus a su célula blanco a través de la interacción con la molécula CD4 y un receptor de quimiocina (CXCR4 ó CCR5). La gp120 se divide en cinco regiones conservadas (C1-C5) que son los sitios de contacto con gp41, y cinco segmentos variables (V1-V5) expuestos en la superficie de la molécula (fig. AI-4A) (Modrow y cols., 1987; Willey y cols., 1986; Burton y Pantophlet, 2006). Por su parte, la gp41 es transmembranal y participa en la fusión de las membranas viral y celular, entre sus dominios principales está la secuencia conocida como péptido o dominio de fusión una región hidrofóbica rica en glicinas, dos regiones alfa hélice cada una en los extremos amino y

carboxilo terminal entre las que se encuentra la región inmunodominante (fig. AI-4B).

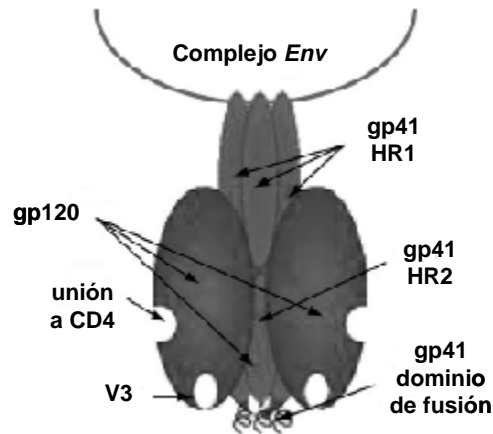


Figura AI-3. Complejo gp120/gp41 del VIH-1. Se señalan algunos de los dominios importante en ambas proteínas (Sierra y cols., 2005).

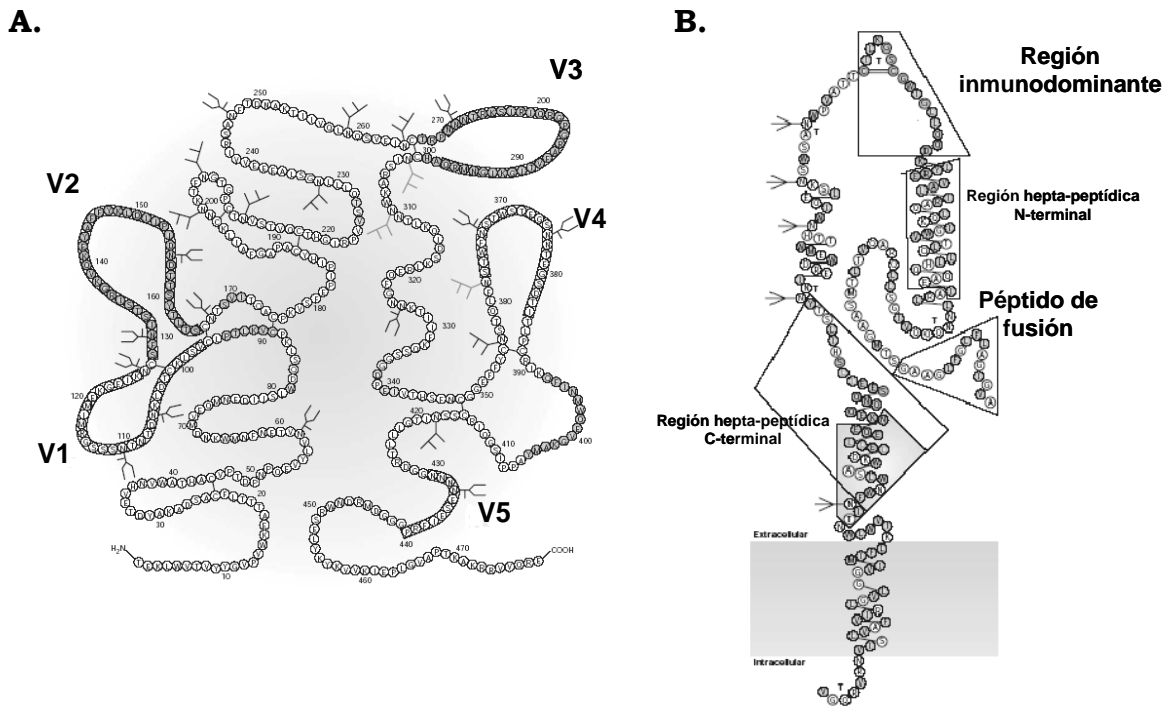


Figura AI-4. Representación esquemática de A) gp120 y B) gp41. En cada caso se indican algunos de los sitios más importantes (modificado de Zolla-Pazner, 2004b).

Durante el proceso de infección, una vez que el dominio externo de la gp120 se une con la molécula CD4 se inducen cambios conformacionales en la gp120, de

tal forma que se expone el sitio de unión al co-receptor (presumiblemente el asa V3). La unión al co-receptor induce cambios conformacionales adicionales en la gp41 que incluyen la exposición de su péptido de fusión hidrofóbico en el extremo N-terminal que se desplaza a la membrana de la célula y después se inserta en ella. Este proceso parece estar mediado en parte por la formación de una estructura trimérica helicoidal del dominio HR1 (*N-terminal heptad region*) de cada uno de los tres dominios de la gp41. La subunidad de la gp41 sufre cambios conformacionales permitiendo que una segunda región: HR2 (*C-terminal heptad region*) se empaquete en la superficie de la estructura trimérica helicoidal formando así una horquilla (*6-helix bundle*) que comprende tres dominios de HR1 en el centro con tres dominios HR2 en la superficie en forma antiparalela (Moore y Doms, 2003, Sierra y cols., 2005).

**Anexo II**  
**Datos clínicos de los pacientes estudiados**

Paciente	Pre-TARV		TARV	Pos-TARV*		Comentarios adicionales
	CV	CD4		CV	CD4	
1	30,400	277	ZDV+ddC+EFV	51,600	315	
2	24,700	267	ZDV+ddC+EFV	20,300	239	
3	116,000	26	ZDV+ddC+NFV	5840	136	
4	750,000	42	ZDV+ddC+NFV	119,000	169	
5	494,000	108	ZDV+ddC+EFV	--		
6	361,000	25	ZDV+ddC+EFV	--		
8	256,000	nd	ZDV+ddC+EFV	--		
9	45,500	299	ZDV+ddC+NFV	--		
10	450,000	45	ZDV+ddC+EFV	--		
11	97,600	9	ZDV+ddC+NFV	--		
12	366,000	58	ZDV+ddC+NFV	--		
13	267,000	31	ZDV+ddC+NFV	--		
14	80,400	88	ZDV+ddC+NFV	--		
15	200,000	99	ZDV+ddC+NFV	--		
16	770,000	137	ZDV+ddC+EFV	--		
17	353,000	138	ZDV+ddl+EFV	indetectable	298	Excelente apego al tratamiento durante los primeros dos años cinco meses, en este período su evolución fue a la mejoría.
18	3680	232	ZDV+ddC+EFV	--		
19	522,000	25	ZDV+ddC+EFV	--		
20	750,000	188	ZDV+ddC+NFV	--		
21	7070	133	ZDV+ddC+NFV	--		
22	202,000	57	ZDV+ddC+NFV	--		

\* Paciente 1 al 4 valores determinados en las semanas 12-15 de TARV. Paciente 17 valor determinado en la semana 24 de TARV. Se reportan únicamente los datos de los pacientes que fueron estudiados después de la administración de TARV.



### **Anexo III**

#### **Reactividad cruzada de sueros inmunes de conejo**

Las figuras AIII-1 y AIII-2 representan la evaluación de reactividad cruzada en ensayo de ELISA que tuvieron los sueros de conejos inmunizados con mimótopos de V3. Los péptidos sintéticos usados para esta evaluación fueron:

5125 HIV-1 subtipo B consenso *tat* RKKRRQRRRAPQDSQ

5128 HIV-1 subtipo B consenso *tat* DSQTHQVSLSKQPAS

5134 HIV-1 subtipo B consenso *tat* KESKKKVERETETDP

8777 HIV-1 subtipo B consenso *env* AKAYDTEVHNVWATH

8786 HIV-1 subtipo B consenso *env* NMWKNNMVEQMHEDI

El ensayo se realizó paralelamente al representado en las figuras 16 y 17, bajo las condiciones descritas en materiales y métodos.

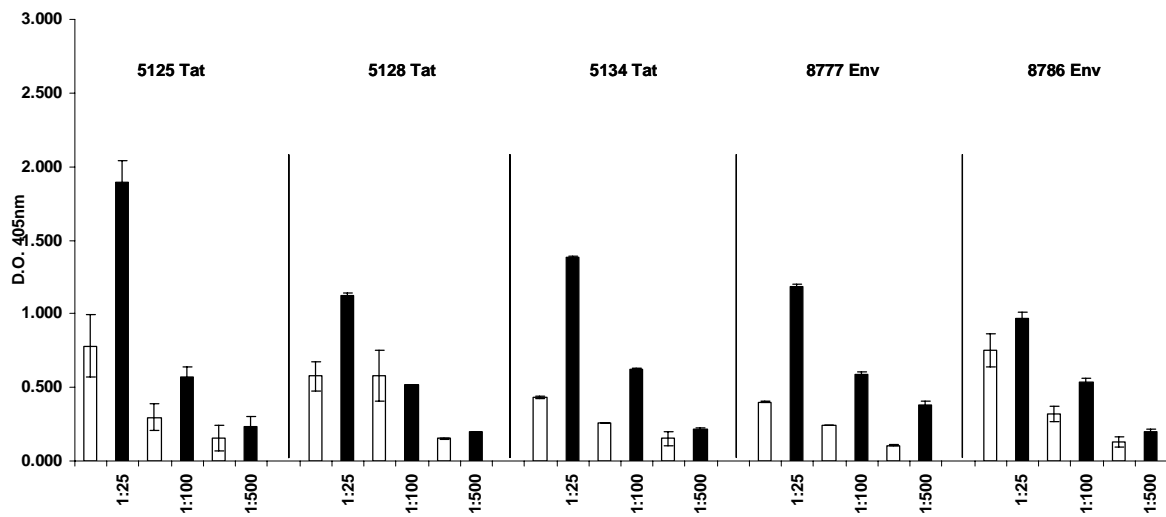


Figura AIII-1. Evaluación de suero de conejo inmunizado con el mimótopo CPRIMGPGC. Las diluciones de suero usadas fueron 1:25, 1:100, 1:500.

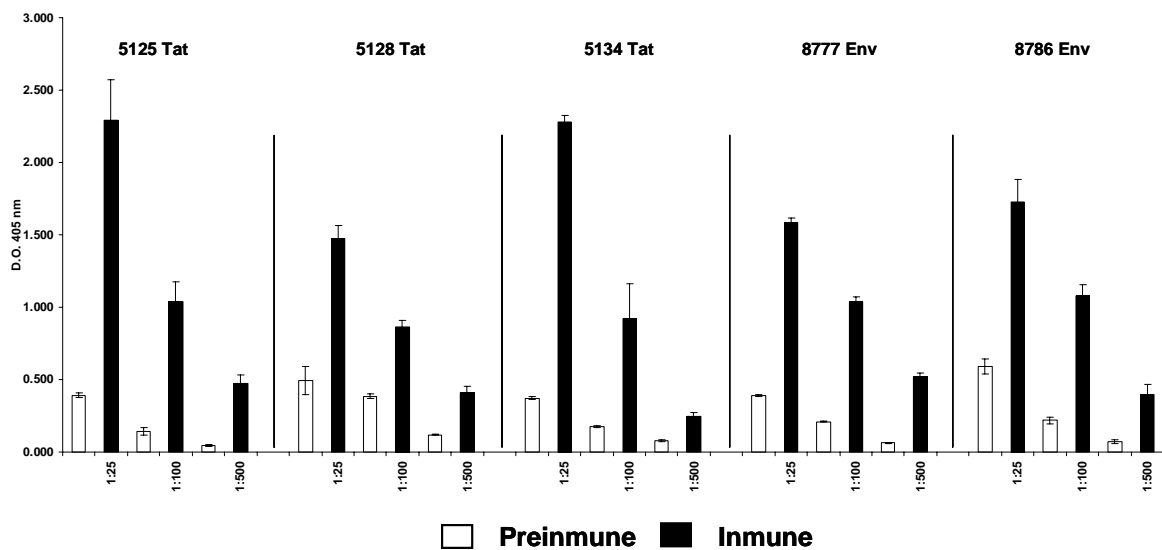


Figura AIII-2. Evaluación de suero de conejo inmunizado con mezcla de mimótopos GPGP/GQGP. Las diluciones de suero usadas fueron 1:25, 1:100, 1:500.

## REFERENCIAS

1. Alam S.M., McAdams M., Boren D., Rak M., Scarce R.M., Gao F., Camacho Z.T., Gewirth D., Keisoe G., Chen P., Haynes B.F. 2007. The role of antibody polyspecificity and lipid reactivity in binding of broadly neutralizing anti-HIV-1 envelope human monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 to glycoprotein 41 membrane proximal envelope epitopes. *J. Immunol.* 178:4424-4435.
2. Allaway G.P., Ryder A.M., Beaudry G.A., Maddon P.J. 1993. Synergistic inhibition of HIV-1 envelope-mediated cell fusion by CD4-based molecules in combination with antibodies to gp120 or gp41. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9: 581-587.
3. Al-Olbeidi F., Hruby V.J., Sawyer T.K. 1998. Peptide and peptido mimetic libraries. *Mol Biotechnol.* 9:205-223.
4. Arnaud M.C., Gazarian T., Palacios-Rodriguez Y., Gazarian K., Sakanyan V. 2003. Array assessment of phage-displayed peptide mimics of human immunodeficiency virus type 1 gp41 immunodominant epitope: binding to antibodies of infected individuals. *Proteomics* 4:1959-1964.
5. Barbas, C.F. 3<sup>rd</sup>., Björling E., Chiodi F., Dunlop N., Cababa D., Jones T.M., Zebedee S.L., Persson M.A.A., Nara P.L., Norrby E., Burton D.R. 1992. Recombinant human Fab fragments neutralize human type 1 immunodeficiency virus *in vitro*. *PNAS USA.* 89:9339-9343.
6. Barbato G., Bianchi E., Ingallinella P., Hurni W. H., Miller M. D., Ciliberto G., Cortese R., Bazzo R., Shiver J.W., Pessi A. 2003. Structural analysis of the epitope of the anti-HIV antibody 2F5 sheds light into its mechanism of neutralization and HIV fusion. *J. Mol. Biol.* 330:1101-1115.
7. Beenhouwer D.O., May R.J., Valadon P., Scharff M.D. 2002. High affinity mimotope of the polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* identified from an evolutionary phage peptide library. *J. Immunol.* 169(12):6992-6999.
8. Biron, Z., Khare S., Samson A.O., Hayek Y., Naider F., Anglister J. 2002. A monomeric 3(10)-helix is formed in water by a 13-residue peptide representing the neutralizing determinant of HIV-1 on gp41. *Biochemistry* 41:12687-12696.
9. Blanco J., Barretina J., Ferri K.F., Jacotot E., Gutiérrez A., Armand-Ugón M., Cabrera C., Kroemer G., Cltét B., Esté J.A. 2003. Cell-surface-expressed HIV-1 envelope induces the death of CD4 T cells during gp41-mediated hemifusion-like events. *Virology* 305(2):318-329.
10. Bour S., Schubert U., Strebel K. 1995. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation. *J. Virol.* 69:1510-1520.
11. Buchacher A., Predl R., Strutzenberger K., Steinfellner W., Trkola A., Purtscher M., Gruber G., Tauer C., Steindl F., Jungbauer A., Katinger H. 1994. Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins; electrofusion and Eipsten-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 10(4):359-369.

12. Burrer R., Haessig-Einius S., Aubertain A.M., Moog C. 2005. Neutralizing as well as non-neutralizing polyclonal immunoglobulin (Ig)G from infected patients capture HIV-1 via antibodies directed against the principal immunodominant domain of gp41. *Virology* 333(1):102–113.
13. Burton, D. R., Barbas C. F., Persson M. A. A., Koenig S., Chanock R. M., Lerner R. A. 1991. A large array of human monoclonal antibodies to HIV-1 from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. *PNAS USA*. 88:10134–10137.
14. Burton, D.R., Pyati J., Koduri R., Sharp S.J., Thornton G.B., Parren P.W. H. I., Sawyer L. S. W, Hendry R. M., Dunlop N., Nara P. L., Lamacchia M., Garratty E., Stiehm E. R., Bryson Y. J., Cao Y., Moore J. P., Ho D. D., Barbas III. C. F. 1994. Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science* 266:1024–1027.
15. Burton D.R., Montefiori, D.C. 1997. The antibody response in HIV-1 infection. *AIDS*. 11:S87–S98.
16. Burton D.R., Pantophlet R. 2006. GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Annu. Rev. Immunol.* 24:739-769.
17. Calarota S., Jansson M., Levy M., Broliden K., Libonatti O., Wigzell H., Wahren B. 1996. Immunodominant glycoprotein 41 epitope identified by seroreactivity in HIV type 1 infected individuals. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 12(8):705-713.
18. Cano A., Viveros M., Acero G., Govezensky T., Munguía M.E., González E., Soto L., Gevorkian G., Manoutcharian K. 2004. Antigenic properties of phage displayed peptides comprising disulfide-bonded loop of the immunodominant region of HIV-1 gp41. *Immunol. Let.* 95:207-212.
19. Cao J., Park I.W., Cooper A., Sodrosky J. 1996. Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 70(3):1340-1354.
20. Conley A. J., Gorny M.K., Kessler J.A., Boots L.J., Ossorio-Castro M., Koenig S., Lineberger D.W., Emini E.A., Williams C., Zolla-Pazner S. 1994a. Neutralization of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates by the broadly reactive anti-V3 monoclonal antibody, 447-52D. *J. Virol.* 68(11):6994-7000.
21. Conley A. J., Kessler II J. A., Boots L. J., Tung J. S., Arnold B. A., Keller P. M. Shaw A.R., Emini E.A. 1994b falta marcar b. Neutralization of divergent human immunodeficiency virus type 1 variants and primary isolates by IAM-41-2F5, an anti-gp41 human monoclonal antibody. *PNAS USA*. 91:3348–3352.
22. Conley A.J., Kessler II J.A., Boots L.J., McKenna P.M., Schleif W.A., Emini E.A., Mark III G. E., Katinger H., Cobb E.K., Lunceford S.M., Rouse S.R., Murthy K.K. 1996. The consequence of passive administration of an anti-human immunodeficiency virus type 1 neutralizing monoclonal antibody before challenge of chimpanzees with a primary virus isolate. *J. Virol.* 70(10):6751-6758.
23. Connor R.I., Ho D.D. 1994. Human immunodeficiency virus type 1 variants with increased replicative capacity develop during the asymptomatic stage before disease progrsion. *J. Virol.* 68:4400-4408.

24. Crawford J.M., Earl P.L., Moss B., Reimann K.A., Wyand M.S., Manson K.H., Bilska M., Zhou J.T., Pauza C.D., Parren P.W., Burton D.R., Sodroski J.G., Letvin N.L., Montefiori D.C. 1999. Characterization of primary isolate-like variants of simian-human immunodeficiency virus. *J.Virol.* 73(12):10199-101207.
25. Cullen B.R. 1998. HIV-1 Auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell.* 93:685-692.
26. Cwirla S.E., Peters E.A., Barrett R.W., Dower W.J. 1990. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *PNAS USA.* 87: 6378-6382.
27. Davies J., Scealy M., Cai Y-P., Whisstock J., Mackay I.R., Rowley M.J. 1999. Multiple alignment and sorting of peptides derived from phage-displayed random peptide libraries with polyclonal sera allows discrimination of relevant phagotopes. *Mol. Immunol.* 36:659-667.
28. De Clercq E. 2002. New anti-HIV agents and targets. *Med Res Rev.* 22:531-565.
29. Demangel C., Rouyre S., Alzari P.M., Nato F., Longacre S., Lafaye P., Mazie J.C. 1998. Phage-displayed mimotopes elicit monoclonal antibodies specific for a malaria vaccine candidate. *Biol Chem.* 379(1):65-70.
30. Devlin J.J., Panganiban L.C., Devlin P.E. 1990. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science* 249:404-406.
31. Di Marzo Veronese F., Willis A.E., Boyer-Thompson C., Appella E., Perham R.N. 1994. Structural mimicry and enhanced immunogenicity of peptide epitopes displayed on filamentous bacteriophage. The V3 loop of HIV-1 gp120. *J. Mol. Biol.* 243(2):167-172.
32. Dong X-N., Xiao Y., Chen Y-H. 2001. ELNKWA-epitope specific antibodies induced by epitope-vaccine recognize ELDKWA- and other two neutralizing-resistant mutated epitopes on HIV-1 gp41. *Immunol. Let.* 75:149-152.
33. Dong X.-N., Wu Y., Ying J., Chen Y.-H. 2005. The antigenic tip GPGRAPHY of the V3 loop on HIV-1 gp120: genetic variability and subtypes. *Immunol. Let.* 1001:112-114.
34. Dorgham K., Dogan I., Bitton N., Parizot C., Cardona V., Debré P., Hartley O., Gorochov G. 2005. Immunogenicity of HIV type 1 gp120 CD4 binding site phage mimotopes. *AIDS Res Hum. Retroviruses* 21(1):82-92.
35. Douek D.C. 2003. Disrupting T-cell homeostasis: how HIV-1 infection causes disease. *AIDS Rev.* 5(3):172-177.
36. Douvas A., Takehana Y., Ehresmann G., Chernyovskiy T., Daar E.S. 1996. Neutralization of HIV type 1 infectivity by serum antibodies from a subset of autoimmune patients with mixed connective tissue disease. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 12:1509-1517.
37. Dowbenko, D., Nakamura G., Fennie C., Shimasaki C., Riddle L., Harris L., Gregory T., Lasky L. 1988. Epitope mapping of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 with monoclonal antibodies. *J. Virol.* 62(12):4703-4711.

38. Dower W.J., Cwirla S.E. 1994. Peptide antigens. A practical approach. In: Wisdom G.B. (Ed.) IRL Press, Oxford University Press, New York, pp.219-243.
39. Eckhart L., Raffelsberger W., Ferko B., Klima A., Purtscher M., Katinger H., R ker F. 1996. Immunogenic presentation of a conserved gp41 epitope of human immunodeficiency virus type 1 on recombinant surface antigen of hepatitis B virus. *J. Gen. Virol.* 77:2001-2008.
40. Enshell-Seijffers D., Smelyanski L., Vardinon N., Yust I., Gershoni J. 2001. Dissection of the humoral immune response toward an immunodominant epitope of HIV: a model for the analysis of antibody diversity in HIV+ individuals. *FASEB J.* 15:2112-2120.
41. Etemad-Moghadam B., Sun Y., Nicholson E.K., Karlsson G.B., Schenten D., Sodroski J. 1999. Determinants of neutralization resistance in the envelope glycoproteins of a simian-human immunodeficiency virus passaged in vivo. *J. Virol.* 73(10):8873-8879.
42. Furuta R.A., Wild C.T., Weng Y., Weiss C.D. 1998. Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41. *Nat. Struct. Biol.* 5:276-279.
43. Galfr  G., Monaci P., Nicosia A., Luzzago A., Felici F., Cortese R. 1996. Immunization with phage-displayed mimotopes. *Methods. Enzymol.* 267:109-115.
44. Gallagher, W.R., Ball, J.M., Garry, R.F., Griffin, M.C., Montelaro, R.C. 1989. A general model of the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 5(4):431-440.
45. Gallo R.C. 2002. Human retroviruses after 20 years: a perspective from the past and prospects for their future control. *Immunological Reviews.* 185:236-265.
46. Gaschen B., Korber B.T., Foley D.T. 1999. Global variation in the HIV-1 V3 region. In *Human Retroviruses and AIDS.* (Kuiken C., Foley B., Hahn B. H. (Eds.)). Los Alamos National Library, Los Alamos, NM. pp.594-602.
47. Gatignol A., Jeang K.T. 2000. Tat as a transcriptional activator and a potential therapeutic target for HIV-1. *Adv. Pharmacol.* 48:20-227.
48. Gazarian T., Selisko B., H rion P., Gazarian K. 2000. Isolation and structure-functional characterization of phage display library-derived mimotopes of noxiustoxin, a neurotoxin of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffman. *Mol. Immunol.* 37:755-766.
49. Gazarian, K., Rowley, M.J., Gazarian, T., Sotelo, J., García-Mendoza, E., Hernández, R. 2001a. Post-panning computer-aided analysis of phagotopes collections selected with neurocysticercosis patient polyclonal antibodies: separation of disease-relevant and irrelevant peptide sequences. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 4:221-235.
50. Gazarian T., Selisko B., H rion P., Gazarian K. 2001b. Isolation and structure-functional characterization of phage display library-derived mimotopes of noxiustoxin, a neurotoxin of the scorpion *Centruroides noxius*. *Mol. Immunol.* 37:755-766.

51. Gazarian, T., Selisko, B., Gurrola, G.B., Hernández, R., Possani, L.D., Gazarian, K. 2003. Potential of peptides selected from random phage-displayed libraries to mimic conformational epitopes: a study on scorpion toxin Cn2 and the neutralizing monoclonal antibody BCF2. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 6:119–132.
52. Gazarian K. Drug Discovery and Design Via High Throughput Screening of Combinatorial Phage-Display Protein-Peptide Libraries. 2005. In *Frontiers in Drug Design & Discovery*. Volume 1. Edited by Caldwell G, Springer B, Atta-u-Rahman B. USA: Bentham Science Publishers. pp.29-67.
53. Gershoni J.M., Roitburd-Berman A., Simian-Toy D.D., Tarnovitski F.N., Weiss Y. 2007. Epitope mapping: the first step in developing epitope-based vaccines. *Bio. Drugs.* 21(3):145-156.
54. Geysen H.M, Rodda S.J., Mason T.J. 1986. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Mol. Immunol.* 23:709-715.
55. Gnann J., Schwimbeck, P., Nelson, J., Truax, B., Oldstone, M. 1987. Diagnosis of AIDS by using a 12-amino acid peptide representing an immunodominant epitope of the human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.* 156 (2): 261–267.
56. Gorny M.K., Xu J-Y., Giankakos V., Karwowska S., Williams C., Sheppard H. W., Hanson C.V., Zolla-Pazner S. 1991. Production of site-selected neutralizing human monoclonal antibodies against the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *PNAS USA.* 88:3228-3242.
57. Gorny M.K., Conley A.J., Karwowska S., Buchbinder A., Xu J.Y., Emini E.A., Koenig S., Zolla-Pazner S. 1992. Neutralization of diverse human immunodeficiency virus type 1 variants by an anti-V3 human monoclonal antibody. *J. Virol.* 66(12):7538–7542.
58. Gorny MK, Xu JY, Karwowska S, Buchbinder A, Zolla-Pazner S. 1993. Repertoire of neutralizing human monoclonal antibodies specific for the V3 domain of HIV-1 gp120. *J. Immunol.* 150:635–643.
59. Gorny M.K., VanCott T.C., Hioe C., Israel Z.R., Michael N.L., Conley A.J., Williams C., Kessler J.A., Chigurupati P., Burda S., Zolla-Pazner S. 1997. Human monoclonal antibodies to the V3 loop of HIV-1 with intra- and interclade cross-reactivity. *J. Immunol.* 159(10): 5114-5122.
60. Gorny M.K., Zolla-Pazner S. 2000. Recognition by human monoclonal antibodies of free and complexed peptides representing the prefusogenic and fusogenic forms of human immunodeficiency virus type 1 gp41. *J. Virol.* 74(13):6186-6192.
61. Gorny M.K., Revesz K., Williams C., Volsky B., Louder M.K., Anyangwe C.A., Krachmarov C., Kayman S.c., Pinter A., Nadas A., Nyambi P.N., Mascota J.R., Zolla-Pazner S. 2004. The V3 loop is accessible on the surface of most human immunodeficiency virus type 1 primary isolates and serves as a neutralization epitope. *J Virol.* 78(5):2394-2404.
62. Goudsmit, J. 1988. Immunodominant B-cell epitopes of the HIV-1 envelope recognized by infected and immunized hosts. *AIDS (Suppl. 1)*, S41–S45.

63. Goudsmit J., Meloen R. H., Brasseur R. 1990. Map of sequential B cell epitopes of the HIV-1 transmembrane protein using human antibodies as probe. *Intervirology* 31:327-338.
64. Greenwood J., Willis A. E., Perham R.N. 1991. Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein as antigens. *J Mol. Biol.* 220:821-827.
65. Grothaus M.C., Srivastava N., Smithson S.L., Kieber-Emmons T., Williams D.B., Carlone G.M., Westerink M.A. 2000. Selection of an immunogenic peptide mimic of the capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A using a peptide display library. *Vaccine* 18(13):1253-1263.
66. Guglielmone H., Vitozzi S., Elbarcha O., Fernandez E. 2001. Cofactor dependence and isotype distribution of anticardiolipin antibodies in viral infections. *Ann. Rheum. Dis.* 60:500-504.
67. Hartley O., Gaertner H., Wilken J., Thompson D., Fish R., Ramos A., Pastore C., Dufour B., Cerini F., Melotti A., Heveker N., Picard L., Alizon M., Mosier D., Kent S., Offord R. 2004. Medicinal chemistry applied to a synthetic protein: Development of highly potent HIV entry inhibitors. *PNAS USA.* 101(47):16460-16465.
68. Haynes B.F., Fleming J., St. Clair E.W., Katinger H., Stiegler G., Kunert R., Robinson J., Scarce R.M., Plonk K., Staats H.F., Ortel T.L., Liao H-X., Alam S.M. 2005. Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science* 308:1906-1908.
69. Haynes B.F., Montefiori D.C. 2006. Aiming to induce broadly reactive neutralizing antibody responses with HIV-1 vaccine candidates. *Expert Rev. Vaccines* 5(3):347-363.
70. Helseth E., Olshevsky U., Furman C., Sodroski J. 1991. Human Immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J. Virol.* 65,2119-2123.
71. Hernández R., Gazarian T., Héron P.S., Gazarian K. 2002. Molecular localization and crossreactivity of two epitopes of noxiustoxin from scorpion *Centruroides noxius*, identified by a panel of monoclonal antibodies and peptide mimotopes. *Immunol. Let.* 80:97-103.
72. Hioe C.E., Bastiani L., Hildreth J.E., Zolla-Pazner S. 1998. Role of cellular adhesion molecules in HIV type 1 infection and their impact on virus neutralization. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 14. S247-S254.
73. Ho, D.D., McKeating J.A., Li X.L., Moudgil T., Daar E.S., Sun N.C., Robinson J.E. 1991. Conformational epitope on gp120 important in CD4 binding and human immunodeficiency virus type 1 neutralization identified by a human monoclonal antibody. *J. Virol.* 65(1): 489-493.
74. Hofman-Lehmann R., Vlasak J., Rasmussen R.A., Smith B.A., Baba T.W., Liska V., Ferrantelli F., Montefiori D.C., McClure H.M., Anderson D.C., Bernacky B.J., Rizvi T.A., Schmidt R., Hill L.R., Keeling M.E., Katinger H., Stiegler G., Cavacini L.A., Posner M.R., Chou T.C., Andersen J., Ruprecht R.M. 2001. Postnatal passive immunization of neonatal macaques with a triple combination of human



- monoclonal antibodies against oral simian-human immunodeficiency virus challenge. *J. Virol.* 75:7470-7480.
75. Horal P., Svennerholm B., Jeansson S., Rymo L., Hall W.W., Vahlne A. 1991. 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.* 65(5): 2718–2723.
  76. Hou Y., Gu X.X. 2003. Development of peptide mimotopes of lipooligosaccharide from nontypeable *Haemophilus influenzae* as vaccine candidates. *J. Immunol.* 170(8):4373–4379.
  77. Huerta L., Lamoyi E., Báez-Saldaña A., Larralde C. 2002. Human Immunodeficiency virus envelope-dependent cell-cell fusion: a quantitative fluorescence cytometric assay. *Cytometry* 47(2):100-106.
  78. Huerta L., Gómez-Icazbalceta G., Soto-Ramírez L., Viveros Rigel M., Rodríguez R., Fuentes L., Lamoyi E., Larralde C. 2005. Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) envelope-dependent cell-cell fusion modulation by HIV-positive sera is related to disease progression. *J. Gen. Virol.* 86(7):1961-1966.
  79. Huerta L., López-Balderas N., Larralde C., Lamoyi E. 2006. Discriminating in vitro cell fusion from cell aggregation by flow cytometry combined with fluorescence resonant energy transfer. *J. Virol. Methods* 138:17-23.
  80. Irving M.B., Pan O., Scott J.K. 2001. Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5:314-324.
  81. Jelinek R., Ferry T.D., Gesell J.J., Malik P., Perham R.N., Opella S.J. 1997. NMR structure of the principal neutralizing determinant of HIV-1 displayed in filamentous bacteriophage coat protein. *J. Mol. Biol.* 266:649-655.
  82. Jin B.-S., Lee W.-K., Ahn K., Lee M.K., Yu Y.G. 2005. High-throughput screening method of inhibitors that block the interaction between 2 helical regions of HIV-1 gp41. *J. Biomol. Screen.* 10:13-19.
  83. Joyce J.G., Hurni W.M., Bogusky M.J., Garsky V.M., Liang X., Citron M.P., Danzeisen R.C., Miller M.D., Shiver J.W., Keller P.M. 2002. Enhancement of alpha-helicity in the HIV-1 inhibitory peptide DP178 leads to an increased affinity for human monoclonal antibody 2F5 but does not elicit neutralizing responses in vitro. Implications for vaccine design. *J. Biol. Chem.* 277:45811–45820.
  84. Kazmierski W.M., Hazen R. J., Aulabaugh A., StClair M. H. 1996. Inhibitors human immunodeficiency virus type 1 derived from gp41 transmembrane protein: structure-activity studies. *J. Med. Chem.* 39:2681-2689.
  85. Kazmierski W.M., Kenakin T.P., Gudmundsson K. S. 2006. Peptide, peptidomimetic and small-molecule drug discovery targeting HIV-1 host-cell attachment and entry through gp120, gp41 CCR5 and CXCR4. *Chem Biol. Drug. Des.* 67:13-26.
  86. Keller P.M., Arnold B.A., Shaw A.R., Tolman R.L., Van Middlesworth F., Bondy S., Rusiecki V.K., Koenig S, Zolla-Pazner S., Conard P., Emini E.A., Conley A.J.

1993. Identification of HIV vaccine candidate peptides by screening random phage epitope libraries. *Virology* 193(2):709–716.
87. Laman J.D., Schellekens M.M., Abacioglu Y.F., Lewis G.K., Tersmette M., Fouchier R.A.M., Langedijk J.P.M., Claassen E., Boersma W.J.A. 1992. Variant-specific monoclonal and group-specific polyclonal human immunodeficiency virus type 1 neutralizing antibodies raised with synthetic peptides from the gp120 third variable domain. *J. Virol.* 66:1823-1831.
  88. Laman J.D., Schellekens M.M., Paddenburg D., Tersmette M., Langedijk J.P.M., Boersma W.J.A., Claassen E. 1993. HIV-1 specific polyclonal and monoclonal antibodies raised with synthetic peptides: characterization and applications. In: *Generation of Antibodies by Cell and Gene Immobilization*, Terhorst C, Malavasi F, Albertini A (Eds.), Karger, Basel, Year Immunol. 7:63-68.
  89. López-Balderas N., Huerta L., Villarreal C., Rivera-Toledo E., Sandoval G., Larralde C., Lamoyi E. 2007. In vitro cell fusion between CD4+ and HIV-1 Env+ T cells generates a diversity of syncytia varying in total number, size and cellular content. *Vir. Res.* 123:138-146.
  90. Li Y., Welcher B., Svehla K., Tang M., Shu Y., Guenaga J., Phogat S., Connors M., Mascola J., Wyatt R. 2006. Neutralizing specificity mapping in complex polyclonal sera. *Antiviral therapy.* 11(Suppl.2):109. (AIDS Vaccine Conference 2006, Amsterdam)
  91. Lu X., Xiao Y., Ding J., Dierich M.P., Chen Y.H. 2000. Multiepitope vaccines intensively increased levels of antibodies recognizing three neutralizing epitopes on human immunodeficiency virus-1 envelope protein. *Scand. J. Immunol.* 51:497-501.
  92. Mandava S., Makowski L., Devarapalli S., Uzubell J., Rodi D. 2004. RELIC-A bioinformatics server for combinatorial peptide analysis and identification of protein-ligand interaction sites. *Proteomics.* 4:1439-1460.
  93. Mascola J.R., Lewis M.G., Stiegler G., Harris D., VanCott T.C., Hayes D., Louder M.K., Brown C.R., Sapan C.V., Frankel S.S., Lu Y., Robb M.L., Katinger H., Birx D.L. 1999. Protection of macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J. Virol.* 73:4009-4018.
  94. McGaughey G.B., Citron M., Danzeisen R.C., Freidinger R.M., Garsky V.M., Hurni W.M., Joyce J.G., Liang X., Miller M., Shiver J., Bogusky M.J. 2003. HIV-1 vaccine development: constrained peptide immunogens show improved binding to the anti-HIV-1 gp41 MAb. *Biochemistry* 42:3214-3223.
  95. McMichael, A.J. 2006. HIV vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 24,227-255.
  96. Melzer H., Baier K., Felici F., von Specht B.U., Wiedermann G., Kollaritsch H., Wiederman U., Duchene M. 2003. Humoral immune response against proteophosphoglycan surface antigens of *Entamoeba histolytica* elicited by immunization with synthetic mimotope peptides. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 37(2-3):179–183.

97. Menendez A., Chow K.C., Pan O.C., Scott J.K. 2004. Human immunodeficiency virus type 1-neutralizing monoclonal antibody 2F5 is multispecific for sequences flanking the DKW core epitope. *J. Mol. Biol.* 338(2):311-27.
98. Modrow S., Hahn B.H., Shaw G.M., Gallo R.C., Wong-Staal F., Wolf H. 1987. Computer assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J. Virol.* 61:570-578.
99. Moore J.P., Doms R.W. 2003. The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine. *PNAS USA.* 100:10598-10602.
100. Morris M.K., Katzenstein D.A., Israelski D., Zolopa A., Hendry R.M., Hanson C.V. 2001. Characterization of the HIV-1 specific humoral immune response during highly active antiretroviral therapy (HAART). *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 28:405-415.
101. Morrow C.D., Park J., Wakefield J.K. 1994. Viral gene products and replication of the human immunodeficiency virus type 1 virus. *Am. J. Physiol.* C1135-C1156.
102. Mullen L.M., Fair S.P., Ward J.M., Rycroft A.N. 2006. Phage display in the study of infectious diseases. *Trends Microbiol.* 14(3):141-147.
103. Muster, T., Steindl, F., Purtscher, M., Trkola, A., Klima, A., Himmler, G., R ker F., Katinger H. 1993. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 67(11):6642-6647.
104. Muster T., Guinea R., Trkola A., Purtscher M., Klima A., Steindl F., Palese P., Katinger H. 1994. Cross-neutralizing activity against divergent human immunodeficiency virus type 1 isolates induced by the gp41 sequence ELDKWAS. *J. Virol.* 68(6):4031-4034.
105. Nájera R., Delgado E., Pérez-Álvarez L., Thomson M.M. 2002. Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. *AIDS.* 16(suppl 4):S3-S16.
106. Nakowitsch S., Quendler H., Fekete H., Kunert R., Katinger H., Stiegler G. 2005. HIV-1 mutants escaping neutralization by the human antibodies 2F5, 2G12, and 4E10: in vitro experiments versus clinical studies. *AIDS.* 19:1957-1966.
107. Nyambi P.N., Gorny M.K., Bastiani L., van der Groen G., Williams C., Zolla-Pazner S. 1998. Mapping of epitopes exposed on intact human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) virions: a new strategy for studying the immunologic relatedness of HIV-1. *J. Virol.* 72(11):9384-9391.
108. O'Connor K. H., Banga J. P., Darmanin C., El-Kabbani O., Mackay I.R., Rowley M.J. 2006. Characterisation of an autoreactive conformational epitope on GAD65 recognised by the human monoclonal antibody b78 using a combination of phage display, in vitro mutagenesis and molecular modeling. *J. Autoimm.* 26:172-181
109. O'Neil K.T., Hoess R.H., Jackson S.A., Ramachandran N.S., Mousa S.A., DeGrado W.F. 1992. Identification of novel peptide antagonists for GPIIb/IIIa from a conformationally constrained phage peptide library. *Proteins.* 14:509-515.

110. Ofek G., Tang M., Sambor A., Katinger H., Mascola J.R., Wyatt R., Kwong P.D. 2004. Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope. *J. Virol.* 78(19):10724-10737.
111. Oldstone M.B., Thison A., Lewicki H., Dyson J.H., Feher V.A., Assa-Munt N., Wright P.E. 1991. 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.* 65(4):1727-1734.
112. Osmanov S., Pattou C., Walker N, Schwardlander B., Esparza J. 2002. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 29(2):184-190.
113. Palacios R., Santos J. 2004. Human immunodeficiency virus infection and systemic lupus erythematosus. *Int. J. STD & AIDS* 15:277-283.
114. Pan Chan Du, A., Limal, D., Semetey, V., Dali, H., Jolivet, M., Desgranges, C., Thong Cung, M., Briand, J.P., Petit, M.C., Muller, S. 2002. Structural and immunological characterization of heteroclitic peptide analogues corresponding to the 600–612 region of the HIV-1 envelope gp41 glycoprotein. *J. Mol. Biol.* 323:503–521.
115. Pantophlet R., Burton DR. 2006. Gp120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Annu. Rev. Immunol.* 24:739-769.
116. Parker C. E., Deterding L. J., Hager-Braun C., Binley J. M., Schulke N., Katinger H., Moore J.P., Tomer K.B. 2001. Fine definition of the epitope on the gp41 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 for the neutralizing monoclonal antibody 2F5. *J. Virol.* 75(22):10906–10911.
117. Paschke M. 2006. Phage display systems and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70:2-11.
118. Pilgrim A.K., Pantaleo G., Cohen O.J., Fink L.M., Zhou J.Y., Zhou J.T., Bolognesi D.P., Fauci A.S., Montefiori D.C. 1997. Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J. Infect. Dis.* 176:924-932.
119. Pincus S.H., Smith M.J., Jennings H.J., Burritt J.B., Glee P.M. 1998. Peptides that mimic the group B streptococcal type III capsular polysaccharide antigen. *J. Immunol.* 160(1):293–298.
120. Prinz D.M., Smithson S.L., Westerink M.A. 2004. Two different methods result in the selection of peptides that induce a protective antibody response to *Neisseria meningitidis* serogroup C. *J. Immunol. Methods.* 285(1):1–14.
121. Purtscher M., Trkola A., Gruber G., Buchacher A., Predl R., Steindl F., Tauer C., Berger R., Barret N., Jungbauer A., Katinger H. 1994. A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10:1651-1658.
122. Purtscher M., Trkola A., Grassauer A., Schulz P.M., Klima A., Döpper S., Gruber G., Buchacher A., Muster T., Katinger H. 1996. Restricted antigenic variability of

- the epitope recognized by the neutralizing gp41 antibody 2F5. *AIDS*. 10(6):587-593.
123. Purtscher M., Trkola A., Grassauer A., Schulz P. M., Klima A., Döpfer S., Gruber G., Buchacher A., Muster T., Katinger H. 1999. Restricted antigenic variability of the epitope recognized by the neutralizing gp41 antibody 2F5. *AIDS*. 10(6):587-593.
  124. Rambaut A., Posada D., Crandall K.A., Holmes E.C. 2004. The causes and consequences of HIV evolution. *Nat. Rev. Gen.* 5:52-61.
  125. Roben P, Moore J.P., Thali M, Sodroski J, Barbas CF 3rd, Burton DR. 1994. Recognition properties of a panel of human recombinant Fab fragments to the CD4 binding site of gp120 that show differing abilities to neutralize immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 68:4821-4828.
  126. Robert-Guroff M., Goedert J. J., Naugle C. J., Jennings A. M., Blattner W. A., Gallo, R.C. 1988. Spectrum of HIV-1 neutralizing antibodies in a cohort of homosexual men: results of a 6 year prospective study. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 4:343-350.
  127. Rodi D.J., Makowski L. 1999. Phage-display technology-finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr Opin. Biotechnol.* 10(1):87-93.
  128. Rosen O., Chill J., Sharon M., Kessler N., Mester B., Zolla-Pazner S., Anglister J. 2005. Induced fit in HIV neutralizing antibody complexes: evidence for alternative conformations of the gp120 V3 loop and the molecular basis for broad neutralization. *Biochemistry* 44:7250-58.
  129. Rowley M.J., O'Connor K., Wijeyewickrema L. 2004. Phage display for epitope determination: A paradigm for identifying receptor-ligand interactions. *Biotechnol. Annu. Rev.* 10:151-188.
  130. Russel M. 1991. Filamentous phage assembly. *Mol Microbiol.* 5:1607-1613.
  131. Sánchez-Martínez S., Lorizate M., Katinger H., Kunert R., Basañez G., Nieva J.L. 2006. Specific phospholipids recognition by human immunodeficiency virus type-1 neutralizing anti-gp41 2F5 antibody. *FEBS Let.* 580:2395-2399.
  132. Sanders RW, Venturi M, Schiffner L, Kalyanaraman R, Katinger H, Lloyd K.O., Kwong P.D. Moore J.P. 2002. The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *J. Virol.* 76(14):7293-7305.
  133. Scala, G., Chen, X., Liu, W., Telles, J.N., Cohen, O.J., Vaccarezza, M., Igarashi, T., Fauci, A. 1999. Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1 positive sera. *J. Immunol.* 162: 6155-6161.
  134. Scanlan C.N., Pantophlet R., Wormald M.R., Saphire E.O., Stanfield R., Wilson I.A., Katinger H., Dwek R.A., Rudd P.M, Burton D.R. 2002. The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1->2 mannose residues on the outer face of gp120. *J. Virol.* 76(14):7306-7321.

135. Schibli D.J., Montelaro R.C., Vogel H.J. 2001. The membrane-proximal tryptophan-rich region of the HIV glycoprotein, gp41, forms a well-defined helix in dodecylphosphocholine micells. *Biochemistry* 40:9570-9578.
136. Schulz T.F., Jameson B.A., Lopalco L., Siccardi A.G., Weiss R.A., Moor J.P. 1992. Conserved structural features in the interaction between retroviral surface and transmembrane glycoproteins. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8(9):1571-1580.
137. Scott J.K., Smith G.P. 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 249:386-390.
138. Sharon M., Kessler N, Levy R., Zolla-Pazner S., Gorlach M., Anglister J. 2003. Alternative conformations of HIV-1 V3 loops mimic B hairpins in chemokines, suggesting a mechanism for coreceptor selectivity. *Structure (Camb)*. 11(2):225-236.
139. Sidhu S.S., Lowman H.B., Cunningham B.C., Wells J.A. 2000. Phage display for selection of novel binding peptides. Chap. 21. In *Methods in enzymology*. Ed. Academic Press. 328:333-363.
140. Sierra S., Kupfer B., Kaiser R. 2005. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J. Clin. Virol.* 34:233-244.
141. Smith G.P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228:1315-1317.
142. Smith G.P., Petrenko, V.A. 1997. Phage display. *Chem. Rev.* 97:391-410.
143. Smith G.P., Scott J. K. 1993. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol.* 217:228-257.
144. Stanfield R.L., Gorny M.K., Williams C., Zolla-Pazner S., Wilson I.A. 2004. Structural rationale for the broad neutralization of HIV-1 by human monoclonal antibody 447-52D. *Structure* 12:193-204.
145. Stigler R.D., Ruker F., Katinger D., Elliott G., Hohne W., Henklein P., Ho J.X., Keeling K., Carter D.C., Nugel E., Kramer A., Porstmann T., Schneider-Mergener J. 1995. Interaction between a Fab fragment against gp41 of human immunodeficiency virus 1 and its peptide epitope: characterization using a peptide epitope library and molecular modeling. *Protein Eng.* 8(5):471-479.
146. Stiegler G., Kunert R., Purtscher M., Wolbank S., Voglauer R., Steindl F., Katinger H. 2001. A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17:1757-1765.
147. Stiegler G., Armbruster C., Vcelar B., Stoiber H., Kunert R., Michael N.L., Jagodzinski L.L., Ammann C., Jäger W., Jacobson J., Vetter N., Katinger H. 2002. Antiviral activity of the neutralizing antibodies 2F5 and 2G12 in asymptomatic HIV-1-infected humans: a phase I evaluation. *AIDS.* 16:2019-2025.
148. Stiegler G., Katinger H. 2003. Therapeutic potential of neutralizing antibodies in the treatment of HIV-1 infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:757-759.

149. Tardif M.R., Tremblay M.J. 2005. LFA-1 is a key determinant for preferential infection of memory CD4+ T cells by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 79(21):13714-13724.
150. Tian Y., Ramesh C. V., Ma X., Naqvi S., Patel T., Cenizal T., Tiscione M., Diaz K., Crea T., Arnold E., Arnold G.F., Taylor J.W. 2002. Structure-affinity relationships in the gp41 ELDKWA epitope for the HIV-1 neutralizing monoclonal antibody 2F5: effects of side-chain and backbone modifications and conformational constraints. *J. Pept. Res.* 59(6):264-276.
151. Trkola A., Pomales A.B., Yuan H., Korber B., Maddon P.J., Allaway G.P., Katinger H., Barbas 3rd. C.F., Burton D.R., Ho D.D., Moore J.P. 1995. Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG. *J. Virol.* 69:6609-6617.
152. Trkola A., Purtscher M., Muster T., Ballaun C., Buchacher A., Sullivan N., Srinivasan K., Sodroski J., Moore JP., Katinger H. 1996. Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 70(2):1100-1108.
153. Ugen K.E., Goedert J.J., Boyer J., Refaeli Y., Frank I., William W.V., Willoughby A., Landesman S., Mandez H., Rubinstein A., Kieber-Emmons T., Weiner D.B. 1992. Vertical transmission of human immunodeficiency virus (HIV) infection. Reactivity of maternal sera with glycoprotein 120 and 41 peptides from HIV type 1. *J. Clin. Invest.* 89:1923-1930.
154. van Houten N.E., Zwick M.B., Menendez A., Scott J.K. 2006. Filamentous phage as an immunogenic carrier to elicit focused antibody responses against a synthetic peptide. *Vaccine* 24:4188-4200.
155. van Zonneveld A.J., van den Berg B.M., van Meijer M., Pannekoek H. 1995. Identification of functional interaction sites on proteins using bacteriophage-displayed random epitope libraries. *Gene* 167:49-52.
156. Wang L.-F., Yu M. 2004. Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics. *Curr. Drug. Targets* 5:1-15.
157. Willey R.L., Rutledge R.A., Dias S., Folks T., Theodore T., Bucker C.E., Martin M.A. 1986. Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. *PNAS USA.* 83(14):5038-5042.
158. Willis A.E., Perham R.N., Wraith D. 1993. Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. *Gene* 128(1):79-83.
159. Wyatt R, Sodroski J. 1998. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 280:1884-1888.
160. Xu J.Y., Gorny M.K., Palker T., Karwowska S., Zolla-Pazner S. 1991. Epitope mapping of two immunodominant domains of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1, using ten human monoclonal antibodies. *J. Virol.* 65 (9):4832-4838.

161. Yamazaki T., Saitou A., Ono M., Yokoyama S., Bannai K., Hirose K. 2003. Preparation of amino acid amide derivatives as antagonists of chemokine CXCR4 receptor. WO 029218
162. Zhou T., Xu L., Dey B., Hessel A.J., Van Ryk D., Xiang S.-H., Yang X., Zhang M.-Y., Zwick M.B., Arthos J., Burton D.R., Dimitrov D.S., Sodroski J., Wyatt R., Nabel G.J., Kwong P.D. 2007. Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. *Nature*. 445:732-737.
163. Zolla-Pazner S., O'Leary J., Burda S., Gorny M.K., Kim M., Mascola J., McCutchan F. 1995. Serotyping of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates from diverse geographic locations by flow cytometry. *J. Virol.* 69(6):3807-3815.
164. Zolla-Pazner S., Zhong P., Revesz K., Volsky B., Williams C., Nyamby P., Gorny M.K. 2004a. The cross-clade neutralizing activity of a human monoclonal antibody is determined by the GPGR V3 motif of HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 20(11): 1254-1258.
165. Zolla-Pazner S. 2004b. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nat. Rev. Immunol.* 4(3):199-210
166. Zwick M.B., Bonnycastle L.I.C., Menendez A., Irving M.B., Barbas C.F. 3<sup>rd</sup>., Parren P.W.H.I., Burton D.R., Scott J. K. 2001a. Identification and characterization of a peptide that specifically binds the human, broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody b12. *J. Virol.* 75(14): 6692-6699.
167. Zwick M.B., Menendez A., Bonnycastle L.L.C., Scott J.K. 2001b. Analysis of phage-bone peptides. In: Barbas III C., Burton D.R., Scott J.K., Silverman G.J. (Eds.) *Phage display: a laboratory manual*. Plainview. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 18.26-18.30.
168. Zwick M. B., Wang M., Pognard P., Stiegler G., Katinger H., Burton D.R., Parren P.W. 2001c. Neutralization synergy of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by cocktails of broadly neutralizing antibodies. *J Virol.* 75:12198-12208.
169. Zwick M.B., Labrijn A.F., Wang M., Spenlehauer C., Saphire E.O., Binley J.M., Moore J.P., Stiegler G., Katinger H., Burton D., Parren P.W.H.I. 2001d. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrana-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J. Virol.* (75):10892-10905.
170. Zwick M.B., Jensen R., Church S., Wang M., Stiegler G., Kunert R., Katinger H., Burton D.R. 2005. Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) antibodies 2F5 and 4E10 require surprisingly few crucial residues in the membrane-proximal external region of glycoprotein gp41 to neutralize HIV-1. *J Virol.* 79(2):1252-1261.



## Collection of phage–peptide probes for HIV-1 immunodominant loop-epitope

Yadira Palacios-Rodríguez<sup>a</sup>, Tatiana Gazarian<sup>b</sup>, Merrill Rowley<sup>c</sup>,  
Abraham Majluf-Cruz<sup>d</sup>, Karlen Gazarian<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Molecular Biology and Biotechnology of Institute of Biomedical Research, Mexico City, Mexico

<sup>b</sup> Department of Public Health of Faculty of Medicine, Mexican National Autonomous University, Mexico City, Mexico

<sup>c</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Monash University, Clayton, Australia

<sup>d</sup> General Hospital No. 1 Gabriel Mancera, IMSS, Mexico

Received 1 April 2006; received in revised form 17 July 2006; accepted 11 August 2006

Available online 12 October 2006

### Abstract

Early diagnosis and prevention of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection, which remains a serious public health threat, is inhibited by the lack of reagents that elicit antiviral responses in the immune system. To create mimotopes (peptide models of epitopes) of the most immunodominant epitope, CSGKLIC, that occurs as a loop on the envelope gp41 glycoprotein and is a key participant in infection, we used phage-display technology involving biopanning of large random libraries with IgG of HIV-1-infected patients. Under the conditions used, library screening with IgG from patient serum was directed to the CSGKLIC epitope. Three rounds of selection converted a 12 mer library of 10<sup>9</sup> sequences into a population in which up to 79% of phage bore a family of CxxKxxC sequences (“x” designates a non-epitope amino acid). Twenty-one phage clones displaying the most frequently selected peptides were obtained and were shown to display the principal structural (sequence and conformational), antigenic and immunogenic features of the HIV-1 immunodominant loop-epitope. Notably, when the mixture of the phage mimotopes was injected into mice, it induced 2- to 3-fold higher titers of antibody to the HIV-1 epitope than could be induced from individual mimotopes. The described approach could be applicable for accurately reproducing HIV-1 epitope structural and immunological patterns by generation of specialized viral epitope libraries for use in diagnosis and therapy.

© 2006 Published by Elsevier B.V.

**Keywords:** Biopanning; Epitopes; gp41; HIV-1; Mimotopes; Phage-display

### 1. Introduction

Presently, HIV continues to spread over the continents, and has become the most dangerous slowly progressing pandemic threat (Rambaut et al., 2004; UNAIDS, 2005). No prevention has been found so far (McMichael, 2006) because the virus has the unique property of escaping both natural and laboratory-created prevention and therapeutic measures (Altman and Feinberg, 2004). Of primary concern in the efforts to developing effective protection against HIV is the lack of peptide

substitutes of immunodominant epitopes to reproduce the crucial antigenic and immunogenic viral properties in experiments and trials. One approach has been the use of sequences of HIV epitopes to synthesize peptides using chemical methods. In fact, synthetic peptides representing viral epitopes are widely produced and used in diagnosis (Gnann et al., 1987) and in experiments on inhibition of viral entry into the target cell (Eckert and Kim, 2001). The major deficiency of these peptides is that their conformations are not stable, so they are non-homogeneous, tend to form aggregates, and, in general, do not display the natural epitope structure–function pattern correctly (Oldstone et al., 1991; Pan Chan Du et al., 2002). Another approach, is to allow the anti-HIV-1 antibody itself to recognize and select perfect peptides from vast phage epitope libraries (Parnley and Smith, 1988; Scott and Smith, 1990; Smith and Petrenko, 1997; see reviews Deroo and Muller, 2001; Gazarian,

\* Corresponding author. Department of Molecular Biology and Biotechnology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Circuito Escolar S/N, C.P. 04510 México D.F., México. Tel.: +52 55 5 622 9206; fax: +52 55 5 622 9212/550 0048.

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

## Short Communication

# Array assessment of phage-displayed peptide mimics of Human Immunodeficiency Virus type 1 gp41 immunodominant epitope: Binding to antibodies of infected individuals

Marie-Claire Arnaud<sup>1</sup>, Tatyana Gazarian<sup>2</sup>, Yadira Palacios Rodriguez<sup>3</sup>, Karlen Gazarian<sup>3</sup> and Vehary Sakanyan<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Biotechnologie, Biocatalyse, Biorégulation, CNRS UMR 6204, Université de Nantes, Nantes, France

<sup>2</sup>Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional, Autónoma de México, México, México

<sup>3</sup>Departamento de Biología Molecular y Biotechnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, México

<sup>4</sup>ProtNeteomix, Université de Nantes, Nantes, France

An array of phage-displayed mimetic peptides representing 18 sequences from the HIV-1 gp41 immunodominant epitope was fabricated on a nitrocellulose membrane. It used to compare the antibody-binding affinity of the peptide and to monitor the immune response of four patients prior to and after the initiation of Highly Active Anti-Retroviral Therapy in parallel assays with several probes using near-infrared fluorescence detection. The proposed multiplexed approach is highly sensitive, consumes less sample and can be used to analyze the immune repertoires of virus-infected individuals.

**Keywords:** Gp41 epitope mimotopes / HIV-1 / Immune response / Phage display / Protein array

Received	31/10/03
Revised	17/12/03
Accepted	22/12/03

Miniaturized protein array technology provides many binding reactions in a single assay and opens up new perspectives in the development of antigen/antibody-based diagnostic tools. Indeed, arrays prepared by immobilization in the solid phase, of purified antigens as capture molecules have been successfully used to detect specific antibodies by means of chemiluminescence or visible fluorescence detection [1–5]. Recently, it has been shown that the sensitivity of the detection of interacting partners with proteins arrayed on a NC membrane can be significantly improved by using probes labeled with near-infrared fluorescent dyes [6, 7]. This is an important step towards the identification of low abundance and low affinity antigens in protein complexes or in cell extracts. In view of the development of new applications of array technol-

ogy for biomedical research, there is significant interest in assessing arrays of epitope-mimicking peptides displayed in large phage particles, such as for the analysis of human immune repertoires in virus-infected patients. The transmembrane gp41 protein of the Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) harbors a major immunodominant epitope, CSGKLC. This epitope forms a disulfide-bonded loop recognized by the sera of almost all HIV-1 of infected individuals [8–11]. Therefore, the epitope has been used for the immunological diagnosis of HIV-1 [8]. More recently, mimetic peptides of the epitope selected from combinatorial phage-display libraries have been used for studying HIV-1-specific humoral immunity in patients by ELISA using microplate and dot-blot formats [12, 13]. In this study, we have taken advantage of protein array technology to assess the HIV-1-specific immune response to the gp41 major immunodominant epitope in patients, using its peptide mimics selected from a phage display library as antigen. A list of the 18 sequence variations of the major immunodominant epitope of gp41 used is shown in Table 1 (other mimotopes of HIV-1 epitopes selected from the library were not studied here; Gazarian *et al.*, unpublished data).

**Correspondence:** Dr. Vehary Sakanyan, Biotechnologie, Biocatalyse, Biorégulation, CNRS UMR 6204, FRE-CNRS 2230, Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière, 44322 Nantes, France  
**E-mail:** vehary.sakanyan@chimbio.univ-nantes.fr  
**Fax:** +33-251125637

**Abbreviations:** HAART, highly active anti-retroviral therapy; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1

## En preparación

**On the gp41 amino acids crucial for epitope recognition by neutralizing anti-HIV-1 monoclonal antibody 2F5: a 7mer cyclic peptide indicates the DKWA to be the minimum epitope and N-terminal leucine in “LDKWA” increases 2F5 affinity**

Yadira Palacios-Rodríguez, Tatiana Gazarian, Karlen Gazarian\*

Laboratory of Molecular Genetics, Department of Molecular Biology and Biotechnology, Institute of Biomedical Research, Mexican National University, Mexico City, 04510, Mexico.

\*Corresponding author

Email addresses:

YPR: [yadis@biomedicas.unam.mx](mailto:yadis@biomedicas.unam.mx)

TG: [tgazaryan@gmail.com](mailto:tgazaryan@gmail.com)

KG: [karlen@servidor.unam.mx](mailto:karlen@servidor.unam.mx)