

Universidad de Barcelona
Facultad de Farmacia
Departamento de Fisicoquímica

Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales de Barcelona
Departamento de Química de Péptidos y Proteínas

Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer
Hospital Clínico de Barcelona
Servicio de Inmunología

Programa de doctorado "Medicaments, alimentació i salut"
Bienio: 2000-2002

Diseño y síntesis de péptidos para el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis G (GBV-C/HGV)

Memoria presentada por M^a Teresa Pérez Escoda para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona

Directores:

Dra. Isabel Haro Villar
Investigador Científico
Dept. Química de Péptidos y Proteínas
IIQAB - CSIC

Dra. Guadalupe Ercilla González
Consultor
Servicio de Inmunología
IDIBAPS - Hospital Clínico

Tutor:

Dra. Montserrat Muñoz
Profesora asociada
Departamento de Fisicoquímica
Facultad de Farmacia
Universidad de Barcelona

M^a Teresa Pérez Escoda
Barcelona, marzo 2007

CAPÍTULO 1

Péptidos sintéticos como antígenos. Diseño, síntesis y purificación de construcciones peptídicas pertenecientes a proteínas estructurales y no estructurales del virus GBV-C/HGV

1.1 Diagnóstico de infecciones víricas

Los virus son patógenos intracelulares obligados, es decir, necesitan vivir en un huésped para poder propagarse. El diagnóstico de una infección vírica activa puede efectuarse por métodos basados en la detección de la presencia de ácidos nucleicos específicos de agentes infecciosos por la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En ocasiones, la presencia del agente patógeno es concomitante con la presencia de anticuerpos, por lo que la detección de anticuerpos específicos del tipo IgM puede ser utilizado como método diagnóstico de infección aguda. Este es el método habitual que se emplea en los laboratorios clínicos de diagnóstico para identificar una infección aguda por el virus de la hepatitis A [58,59,60] y por el virus de la hepatitis B [61,62].

En otras ocasiones, la presencia de anticuerpos neutralizantes de tipo IgG indica un estado de protección frente a nuevas infecciones [63] y se utiliza para monitorizar la eficacia de las vacunas [64]. Sin embargo, algunas veces la presencia de anticuerpos indica solamente una infección previa con el virus, no relacionado con el estado de inmunidad postinfección.

Los anticuerpos antivirales o inmunoglobulinas pueden ser detectados o bien por su unión física a componentes virales o bien por su función biológica. Para la detección de anticuerpos que se unen a componentes virales, los métodos más ampliamente utilizados están basados en técnicas de enzimoimmunoanálisis (EIA) que utilizan como antígenos derivados proteicos del agente infeccioso.

La detección de anticuerpos que reaccionan específicamente con proteínas del agente, requiere el empleo de reactivos altamente purificados que no presenten reacciones cruzadas con proteínas de otros agentes patógenos. En este contexto, se han utilizado proteínas recombinantes como dianas de reconocimiento de los anticuerpos, asumiendo que una vez reconstituidas adquieren la misma conformación tridimensional equiparable a la proteína nativa, y que presentan la misma conformación que los epítomos discontinuos, los cuales, son perfectamente reconocidos por anticuerpos. Aún así, cuando es posible, existe la tendencia a reemplazar las moléculas biológicas que se emplean en los tests de diagnóstico por moléculas sintéticas, generalmente péptidos sintéticos o moléculas relacionadas. La utilización de las moléculas sintéticas en lugar de las moléculas biológicas presenta varias ventajas. Las moléculas sintéticas son más robustas, más fáciles de transportar y almacenar, además de que su producción es más económica. También se pueden producir en grandes cantidades con un elevado grado de pureza, lo que permite garantizar la homogeneidad del antígeno.

En este sentido, y gracias a los avances alcanzados en la síntesis de péptidos en fase sólida se pueden diseñar secuencias peptídicas que se asemejen a los epítomos más relevantes de las proteínas víricas. Desde hace años, los péptidos sintéticos que mimetizan epítomos específicos de proteínas se vienen utilizando tanto en el diseño molecular de vacunas como en el desarrollo de sistemas de diagnóstico para la detección de un gran número de enfermedades infecciosas ya sean de origen parasitario [65,66], bacteriano o viral [67].

Las secuencias peptídicas que mimetizan epítomos inmunodominantes de las proteínas virales se han utilizado para aumentar la sensibilidad y la especificidad de los sistemas de diagnóstico. La falta de reproducibilidad de los resultados, así como la gran variabilidad en la sensibilidad de los ensayos inmunológicos clásicos, que utilizan antígenos no definidos, podría ser solventada mediante la utilización de antígenos químicamente bien definidos, como son los péptidos. Existen actualmente sistemas de diagnóstico basados en péptidos sintéticos que se encuentran en fase de desarrollo [68] e incluso algunos de ellos ha sido ya comercializados [69,70].

Sin embargo, la utilización de péptidos sintéticos lineales como sustratos en ensayos inmunoenzimáticos puede dar resultados menos sensibles de los esperados por varios motivos diferentes. Uno de los motivos es que los péptidos cortos, especialmente aquellos que contienen cadenas laterales poco hidrófobas son generalmente poco antigénicos en los inmunoensayos en fase sólida debido a que se adsorben débilmente al poliestireno, que es el material más habitualmente empleado en las placas de inmunoensayo. Las secuencias peptídicas pueden ver limitada o disminuida su antigenicidad debido a que las cadenas laterales no quedan lo suficientemente expuestas, adoptando conformaciones que impiden un buen reconocimiento por parte de las inmunoglobulinas. Como se explica en el capítulo 2 de esta tesis, este problema se ha solucionado en muchos casos utilizando placas de microensayo que permiten la unión covalente y dirigida del péptido en la placa.

Otro de los motivos por el cual los péptidos lineales pueden ser poco antigénicos es debido a pequeño su tamaño. De ahí surge la idea de combinar dos o más epítomos en una misma molécula y obtener de este modo los denominados péptidos quiméricos [71]. Por otro lado, los péptidos cortos no adoptan una conformación estable en solución [72] y solo una pequeña fracción del péptido adopta una conformación comparable a la que se presenta en el lugar antigénico de la proteína completa. La introducción de restricción de movilidad en los péptidos, mediante la formación de ciclaciones intramoleculares, mejora su reactividad frente a los anticuerpos ya que reduce notablemente el repertorio conformacional de las secuencias lineales y puede por ello suponer una mimetización antigénica más eficaz [73].

En este capítulo se comenta y discute la selección de las secuencias del virus escogidas como posibles antígenos con utilidad en el diagnóstico del GBV-C/HGV. También se diseñan nuevas construcciones peptídicas formadas por la combinación de varios epítomos, así como construcciones cíclicas. Todo ello con la finalidad de obtener moléculas con capacidad de detectar los anticuerpos anti-GBV-C/HGV. Asimismo, en este capítulo se muestran los resultados obtenidos tras la síntesis y purificación de las moléculas diseñadas.

1.2 Selección de las secuencias peptídicas

A pesar de que el papel de las proteínas no estructurales del virus GBV-C/HGV no se conoce con exactitud, sí se encuentra descrito en la bibliografía que las proteínas no estructurales desempeñan un papel importante en la síntesis de las proteínas del virus. Se ha descrito que la proteína NS4a actúa como cofactor de la helicasa que codifica la proteína NS3 [74] y que la proteína NS4b es necesaria para llevar a cabo la escisión entre la unión NS4a y NS4b [17]. En relación con la proteína NS5, Pilot-Matias *et al.* describieron que la región comprendida entre los aminoácidos 2047 y 2376 contenía secuencias potencialmente epitópicas capaces de generar una respuesta inmune detectable por anticuerpos [75]. Algo parecido ocurre con el virus de la hepatitis C, dado que los anticuerpos que reconocen regiones de las proteínas no estructurales son fácilmente detectables [68]. En el caso del virus GBV-C/HGV, Toniutto *et al.* estudiaron la capacidad antigénica de fragmentos peptídicos pertenecientes a las proteínas no estructurales NS4 y NS5 [46].

A la vista de los trabajos publicados, se han seleccionado fragmentos peptídicos de las proteínas no estructurales NS4a, NS4b y NS5a potencialmente antigénicas que pudieran utilizarse como sustratos en el desarrollo futuro de un sistema de diagnóstico para la infección por GBV-C/HGV basado en péptidos sintéticos.

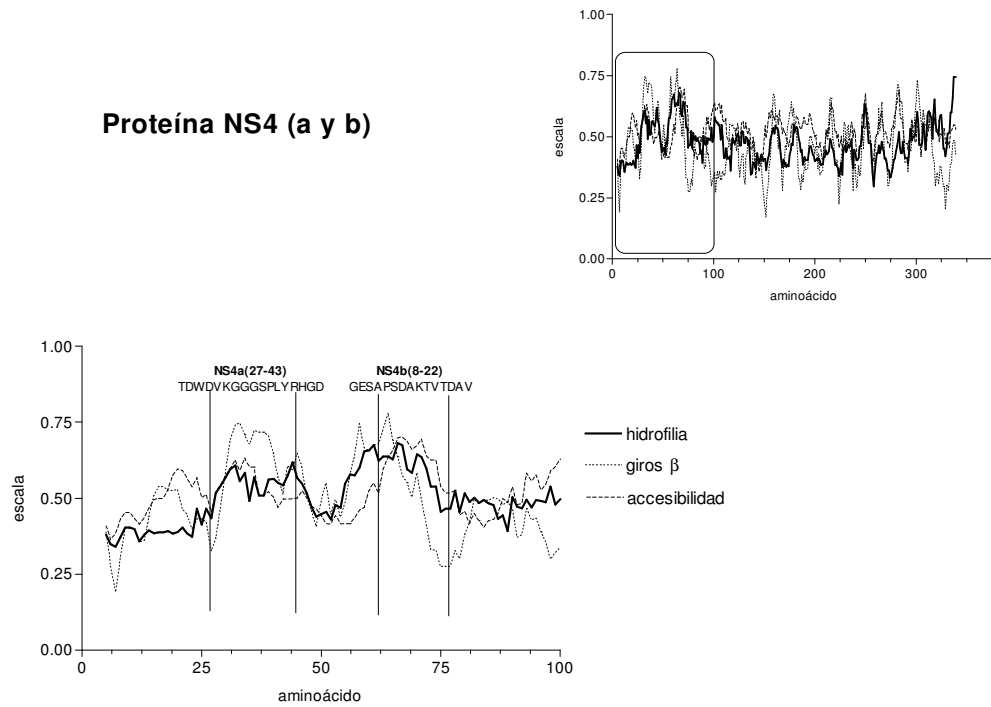
Para ello, se realizó un estudio comparativo de los mapas genéticos de distintas cepas del virus GBV-C/HGV, cuyos números de acceso están detallados en la Tabla 1.1, con la finalidad de seleccionar las regiones más altamente conservadas que a la vez cumplieran los requisitos para ser un buen epítipo. El programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) se utilizó para alinear las secuencias y realizar el análisis de las regiones conservadas.

Como ya se ha comentado anteriormente, las regiones epitópicas suelen ser regiones de la proteína que quedan expuestas al exterior, por este motivo, se realizó un estudio completo de las proteínas no estructurales mencionadas con la finalidad de hallar las regiones más hidrófilas y con una elevada propensión de formar giros β . Se analizaron los perfiles de hidrofilia de Hopp & Woods [76] y de antigenicidad de Welling [77]. También se evaluó la predicción de la conformación más estable según Chou & Fasman [78]. En la Figura 1.1 se muestran los perfiles de hidrofilia, accesibilidad y la probabilidad de formar giros β para cada una de las proteínas no estructurales. Una vez seleccionadas las secuencias, éstas se estudiaron con el programa BLAST. Este programa es una herramienta ampliamente utilizada para la búsqueda de bases de datos de proteínas con secuencias similares. El programa permite comparar proteínas mediante procedimientos algorítmicos y estadísticos en un tiempo pequeño y con una buena sensibilidad. Tras analizar las secuencias seleccionadas por este método se comprobó que no existen secuencias coincidentes con otros virus, lo que nos permite asegurar que la reactividad obtenida por ELISA o SPR es debida únicamente a la reacción específica entre el péptido y los anticuerpos anti-GBV-C/HGV.

Tabla 1.1. Alineación de las secuencias (ClustalW) de las distintas cepas aisladas. [*] Mismo aminoácido en todas las secuencias comparadas; [:] se observan sustituciones conservadas (Aa con las mismas propiedades); [.] se observan sustituciones no conservadas (aminoácidos con distintas propiedades).

Nº acceso GenBank	origen	NS4a (27-43)	NS4b (8-22)	NS5a (112-126)
AF104403	Europa	TDWDVKGGGSPLYRHGD	GESAPSDAKTVTDAL	GTSGWAEVVVTPTHV
AF309966	Alemania	TDWDVKGGGSPLYRHGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
U44402	USA	TDWDVKGGGAPLYRHGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTTTHV
U45966	USA	TDWDVKGGGSPLYRHGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
AF031827	USA	TDWDVKGGGAPLYRHGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
AF031828	USA	TDWDVKGGGAPLYRHGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
AF031829	USA	TDWDVKGGGAPLYRHGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
AY196904	USA	TDWDVKGGGAPLYRHGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
AF121950	USA	TDWDVKGGGSPLYRHGD	GESAPSDANTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
D90600	Japón	TDWDVKGGGSPLYRHGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
D90601	Japón	TDWDVKGGGNPLYRSGD	GESSPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
D87255	Japón	TDWDVKGGGAPLYRHGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
D87262	Japón	TDWDVKGGGNPLYRNGD	GEAAPADAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
D87263	Japón	TDWDVKGGGNPLYRNGD	GEAAPADAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
D87708	Japón	TDWDVKGGGNPLYRNGD	GESSPSDANTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
D87709	Japón	TDWDVNGGGNPLYRNGD	GESSPSEARTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
D87710	Japón	TDWDVKGGGNPLYRNGD	GDSAPSDARTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
D87711	Japón	TDWDVKGGGNPLYRNGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
D87712	Japón	TDWDVKGGGNPLYRNGD	GESSPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
D87714	Japón	TDWDVKGGGNPLYRNGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
D87715	Japón	TDWDVKGGGNPLYRNGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
AB003288	Japón	TDWDVKGGGNPLYRNGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
AB003289	Japón	TDWDVKGGGAPLYRHGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
AB003290	Japón	TDWDVKGGGNPLYRNGD	GESSPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
AB003291	Japón	TEWDVRGGGNPLYRNGD	AESAPADAKTVTDAV	GTAGWAEVVVTPTHV
AB003292	Japón	TDWDVKGGGNPLYRNGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVPVTPTHV
AB003293	Japón	TDWDVKGGGNPLYRNGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
AB008342	Japón	TDWDVKGGGNPLYRNGD	GESSPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
AF081782	Japón	TDWDVKGGGAPLYRHGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
U94695	China	TDWDVKGGGNPLYRNGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
AB018667	Vietnam	TDWDAKGGGNPLYRSGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
AB021287	Myanmar	SDWDVKGGGNPLYRNGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPVQV
AF006500	Hong Kong	TDWDVKGGGNPLYRNGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
U63715	Egipto	TDWDVKGGGNPLYRSGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
AB013501	Bolivia	TDWDVKGGGAPLYRHGD	GEAAPADAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
U36380	Ghana	TDWDVKGGGNPLYRSGD	GESAPRDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
AB013500	Ghana	TDWDVKGGGNPLYRNGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV
AF070476	Chimpancé	TDWEVRGGGNLMRHGD	AESAPADAKTVTEAV	GTSGWAEVVVTPTHV
		::*:.*** ** ** **	.:::* :*.***:**	. . .* **.*:**
Secuencias sintetizadas		TDWDVKGGGSPLYRHGD	GESAPSDAKTVTDAV	GTSGWAEVVVTPTHV

Proteína NS4 (a y b)



Proteína NS5a

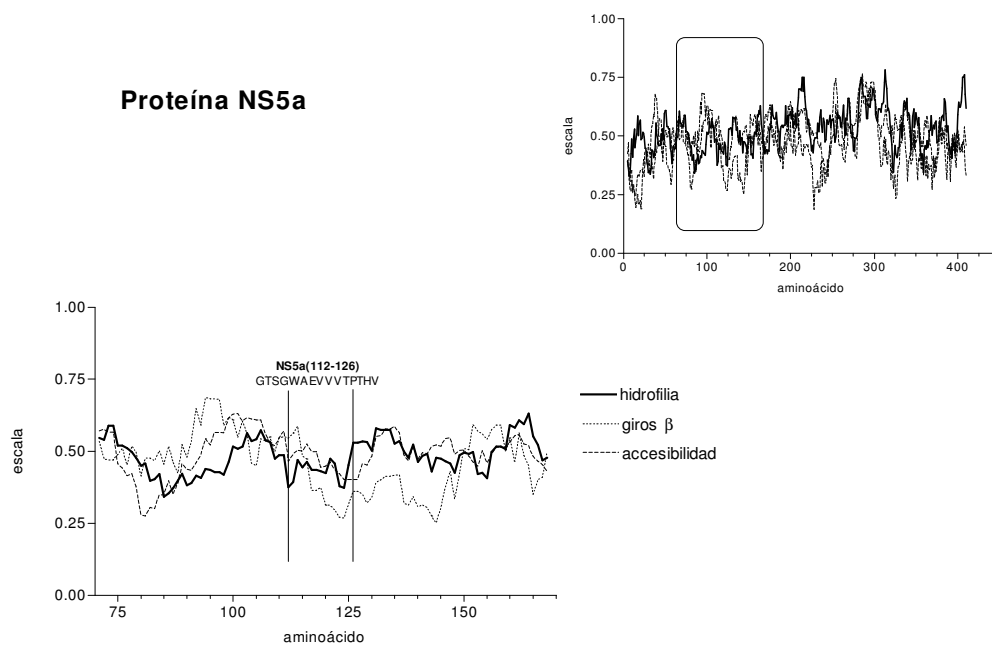


Figura 1.1. Perfiles de hidrofilia según Hopps & Woods, de probabilidad de formación de giros β según Chou & Fasman, y de accesibilidad para las proteínas no estructurales NS4 a y b (superior) y NS5a (inferior).

1.3 Síntesis de péptidos en fase sólida

La idea de la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS, del inglés *solid-phase peptide synthesis*) fue descrita por primera vez por Merrifield en 1963 [79], y hoy en día es la manera más habitual y sencilla de obtener péptidos. Este método se basa en la unión del aminoácido carboxi-terminal (C-terminal) a un soporte insoluble y la posterior elongación secuencial, aminoácido tras aminoácido, de la cadena peptídica. Este método de síntesis en fase sólida presenta numerosas ventajas respecto a la síntesis de péptidos en solución. Los rendimientos son buenos debido a que al trabajar con el péptido unido a un soporte sólido, se pueden emplear excesos de reactivos que se eliminan fácilmente tras sencillos procesos de lavado y filtrado. No se producen pérdidas mecánicas de péptido puesto que el soporte sólido al que está unido el péptido permanece en el mismo recipiente durante todo el proceso. Además, las operaciones de lavado y filtrado son sencillas y susceptibles de automatización.

El crecimiento de la cadena peptídica tiene lugar siempre por el extremo carboxilo mediante la adición sucesiva de los aminoácidos que tienen tanto el extremo α -amino como las cadenas laterales de los aminoácidos convenientemente protegidos.

Existen dos estrategias distintas para la síntesis de péptidos en fase sólida, la estrategia Boc/Bzl y la estrategia Fmoc/tBu. La estrategia Boc/Bzl utiliza el grupo tert-butoxicarbonil (Boc) como protector de los grupos α -amino y grupos del tipo benzil (Bzl) como protector de las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales. La estrategia Fmoc/tBu emplea el grupo 9-fluorometoxicarbonil (Fmoc) como protector temporal del grupo α -amino y grupos del tipo tert-butil (tBu) para proteger las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales.

La cadena peptídica se sintetiza sobre un soporte polimérico insoluble o resina por la unión del aminoácido C-terminal o un conector al que se le unirá el primer aminoácido. El crecimiento de la cadena tiene lugar desde el extremo carboxilo hacia el extremo amino del péptido. El conector entre el soporte polimérico y el primer aminoácido variará dependiendo del tipo de péptido que se desee obtener (carboxilo, amida, aldehído, etc.). En el caso de los aminoácidos trifuncionales, la cadena lateral está protegida para evitar polimerizaciones o reacciones no deseadas con dichas cadenas. Estos grupos protectores dependen del tipo de grupo funcional del aminoácido y del tipo de estrategia que se emplee para la síntesis.

El grupo protector α -amino se elimina antes de la unión del siguiente aminoácido. La eliminación del grupo protector Boc se realiza en medio ácido mientras que la eliminación del grupo Fmoc se realiza en medio básico, habitualmente con piperidina. Una vez el grupo α -amino se encuentra libre, se une el aminoácido siguiente, previa activación, al aminoácido anterior formando el enlace peptídico. El proceso de acoplamiento requiere la activación del grupo α -carboxilo del aminoácido entrante de modo que éste sea susceptible de reaccionar con el grupo amino de la cadena de péptido creciente. Este proceso de desprotección y acoplamiento se repite tantas veces

como sea necesario hasta completar la secuencia del péptido deseado. Una vez sintetizada la cadena peptídica, ésta se separa del soporte polimérico y se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos, habitualmente en una única etapa.

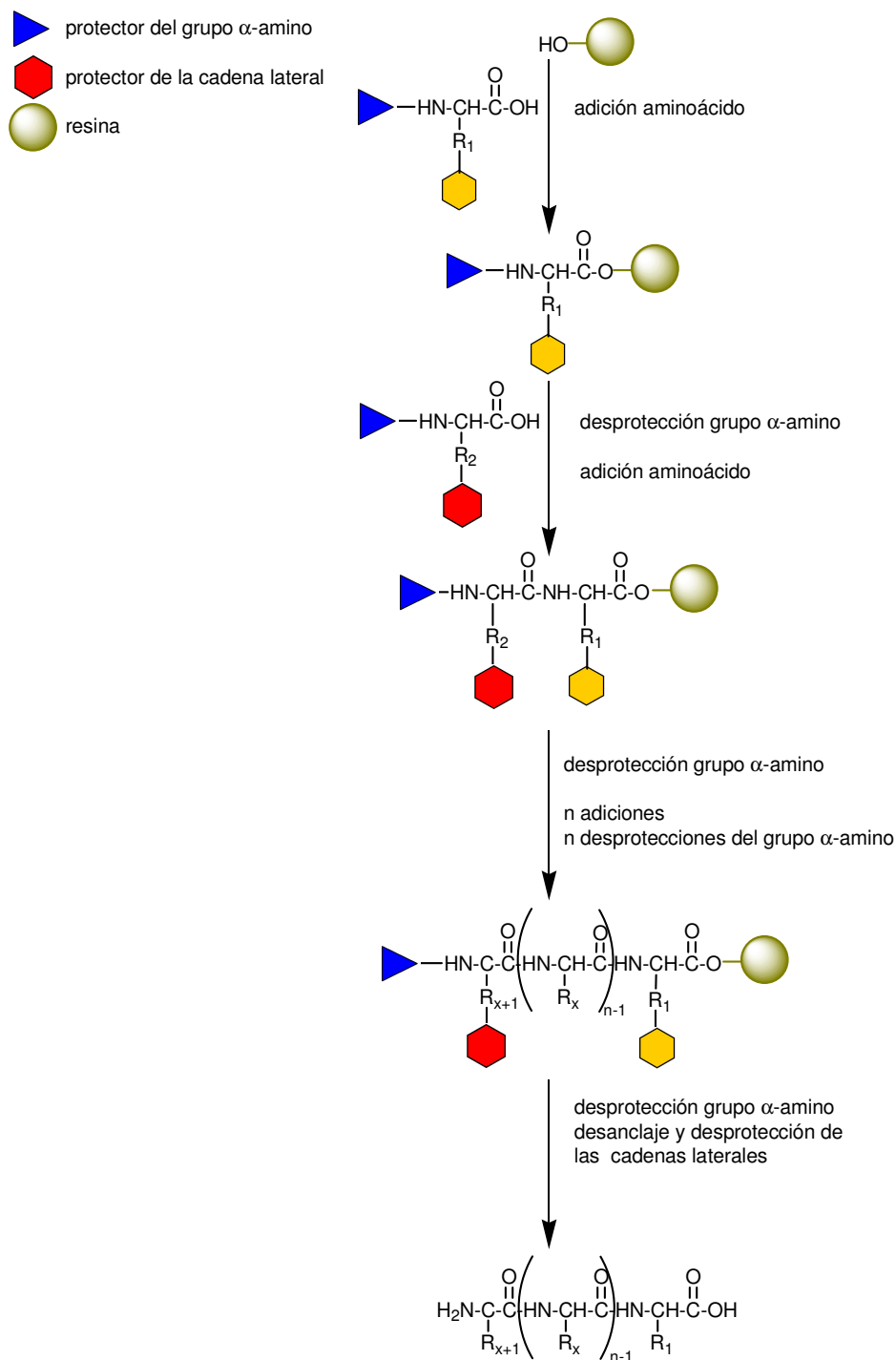


Figura 1.2. Esquema general de la síntesis en fase sólida.

Matrices poliméricas

En los últimos años se han desarrollado un gran número de matrices poliméricas o resinas para la síntesis de péptidos en fase sólida. El soporte polimérico o resina debe ser inerte en las condiciones empleadas en toda la síntesis, estable mecánicamente y completamente insoluble en los disolventes empleados.

Las resinas acostumbran a aumentar su volumen en contacto con los disolventes y este hecho es clave para el buen desarrollo de la síntesis. Además debe estar convenientemente funcionalizada para poder unir el aminoácido o el conector.

Los péptidos seleccionados en esta tesis se sintetizaron sobre resinas comerciales NovaSyn® TG. Estas resinas están compuestas por poliestireno y polietilenglicol, éste último funcionalizado en su extremo con grupos lábiles en medio ácido. La resina NovaSyn® TGA tiene en su extremo el ácido hidroximetilfenoxiacético, que permite la obtención de péptidos en forma de ácidos carboxílicos debido a la formación de un enlace éster entre la resina y el grupo carboxilo del primer aminoácido. Para realizar este enlace es necesaria la catálisis de un nucleófilo para disminuir así el riesgo de racemización y/o formación de dipéptidos. El catalizador más empleado es la 4-dimetilaminopiridina (DMAP). Además, debe procurarse que el tiempo de esterificación no sea excesivamente largo. La resina NovaSyn® TGR, tiene en el extremo un derivado amida y proporciona péptidos en forma de carboxiamidas. Debido a que la unión del péptido a la resina es a través de un enlace amida, la formación del enlace entre el primer aminoácido y el soporte sólido tiene lugar utilizando los métodos habituales para la formación de enlaces amida. No hay necesidad de emplear catalizadores como el DMAP, por lo que no existe el riesgo de racemización o formación de dipéptidos.

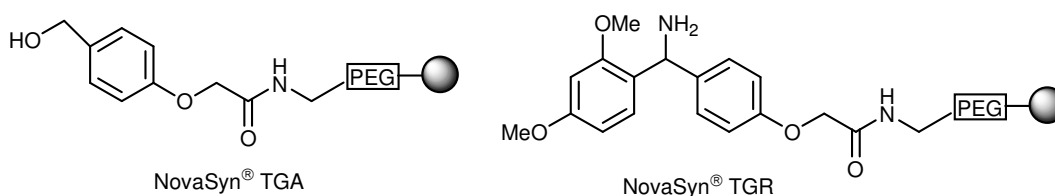


Figura 1.3. Estructura de las resinas utilizadas como soporte sólido.

Para que la formación del enlace peptídico sea eficiente y se minimicen los procesos de racemización es necesaria una buena activación del grupo α -carboxilo del aminoácido entrante.

Las carbodiimidas son los reactivos de acoplamiento más utilizados en la síntesis de péptidos. La N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) fue la primera descrita y todavía hoy sigue siendo la más popular. Además, es particularmente apropiada para trabajar en ambientes apolares como los originados por las resinas de poliestireno. Otra de las carbodiimidas más utilizadas es la N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) todavía más recomendada que su precursora debido a la gran solubilidad de las ureas que se forman como subproductos. Cuando se emplean las carbodiimidas como agentes de condensación se recomienda la utilización de aditivos como el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) [80] que aceleran la reacción y reducen el riesgo de racemización.

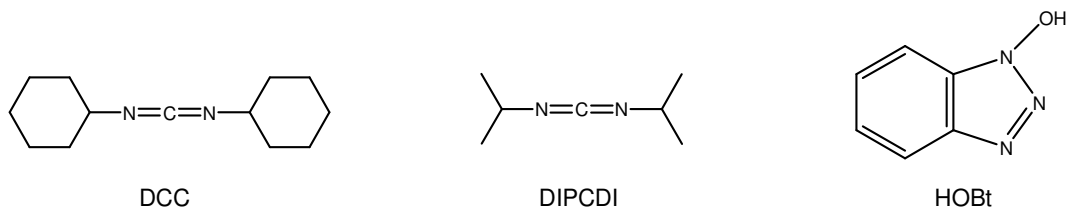


Figura 1.4. Estructura de las carbodiimidas y aditivos utilizados en la síntesis de péptidos en fase sólida.

En los últimos años han surgido nuevos reactivos que minimizan la formación de subproductos no deseados a la vez que reducen los tiempos de reacción, lo que hace que su utilización se haya extendido mucho.

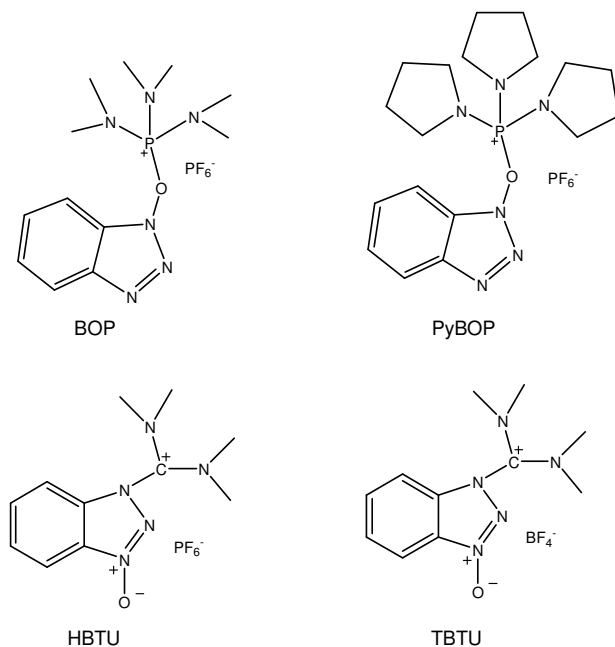


Figura 1.5. Estructura de algunas sales de fosonio (BOP, PyBOP) y sales de uronio (HBTU, TBTU) utilizadas como agentes de acoplamiento.

La mayoría son sales de fosfonio o uronio, las cuales, en presencia de una base, pueden convertir el carboxilato del aminoácido protegido en una especie activada. Las más empleadas son el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(dimetilamino) fosfonio (BOP) y el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(pirrolidin) fosfonio (PyBOP) [81], derivadas del HOBt. Entre las sales de uronio, se encuentran el hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il)-dimetilamino-metilen]-N-metilmetanaminio (HBTU) [82] y el tetrafluoroborato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il)-dimetilamino-metilen]-N-metilmetanaminio (TBTU) [83] entre las más comunes.

Todos los péptidos de esta tesis fueron sintetizados siguiendo el esquema de protección Fmoc/tBu. Los grupos carboxilo de las cadenas laterales de los aminoácidos se protegieron como éster de tertbutilo, mientras que los grupos hidroxilo lo fueron como éteres de tertbutilo. Por su parte, se empleó el 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonio (Pmc) para proteger el grupo guanidino de la Arg. El trifenilmetil (trt) para proteger el grupo imidazol de la His y el grupo amida de la Gln. El grupo Boc se utilizó para proteger el grupo indol del Trp y la amina de la Lys.

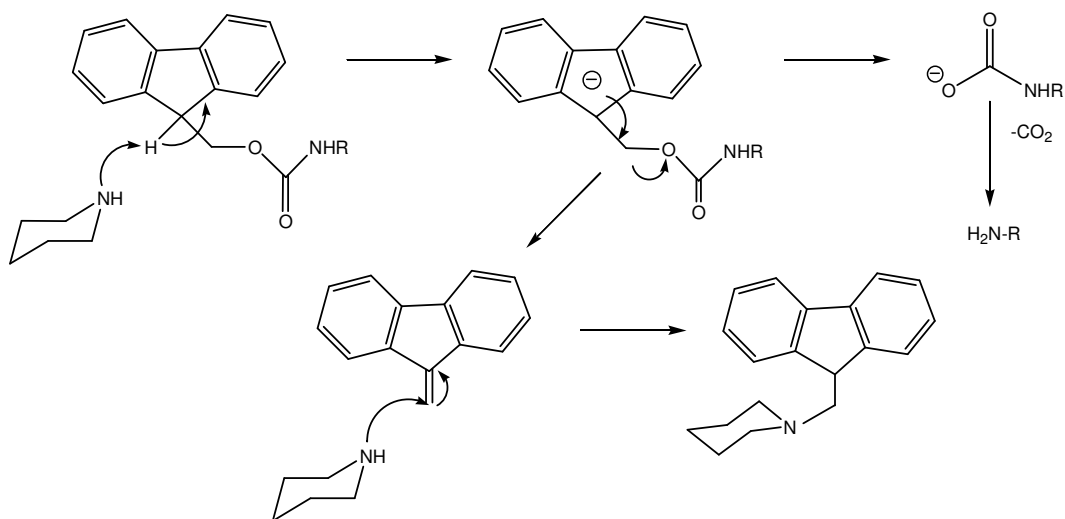


Figura 1.6. Mecanismo de eliminación del grupo Fmoc.

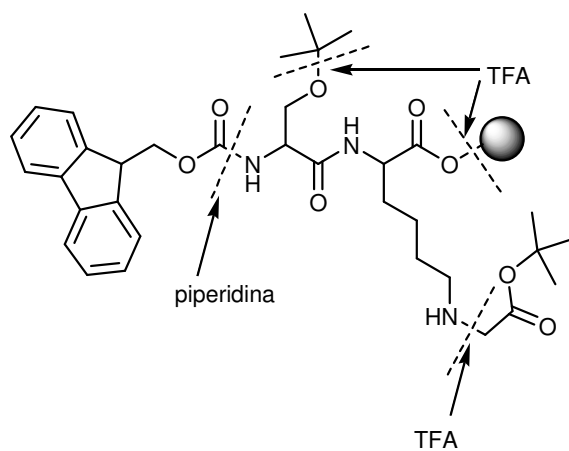
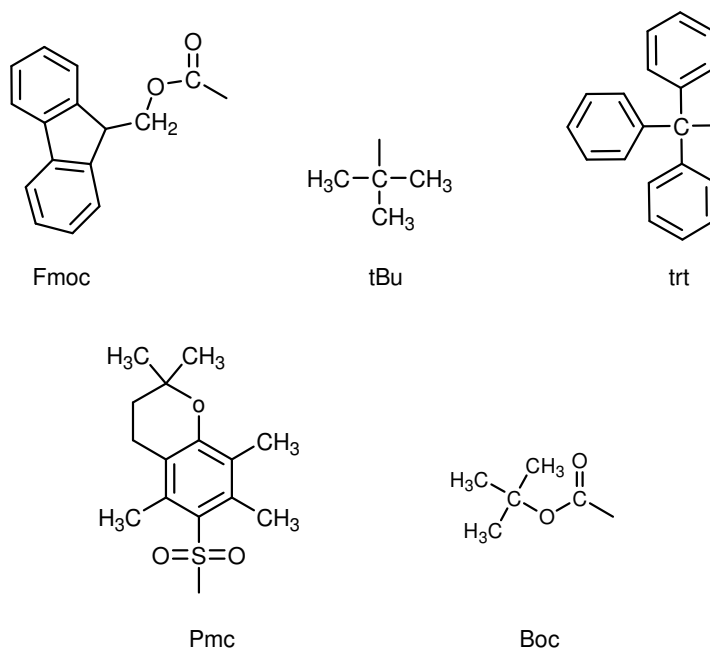


Figura 1.7. Estructura de los grupos protectores empleados. Esquema de protección utilizado en la química Fmoc/tBu.

1.3.1 Síntesis, purificación y caracterización del péptido NS4b(8-22)

El péptido NS4b(8-22) pertenece a la región próxima al extremo N-terminal de la proteína NS4b del virus GBV-C/HGV. Su secuencia de aminoácidos es GESAPSDAKTVTDAV. A dicha secuencia se le añadió un residuo de Asp en el extremo C-terminal unido a la resina por su cadena lateral, para poder llevar a cabo la posterior ciclación del péptido en fase sólida, en caso de que se considerara de interés. La síntesis se realizó de forma manual en fase sólida utilizando la resina NovaSyn® TGA con una funcionalización inicial de 0.23 mmol g⁻¹. Sobre la resina se unió directamente el derivado de ácido aspártico, Fmoc-Asp-ODmab, en forma de anhídrido simétrico. Por determinación de la N-fluorenilmetilpiperidina se calculó el rendimiento de unión del primer aminoácido que fue del 76%, siendo la funcionalización calculada de la resina de 0.17 mmol g⁻¹. El resto de la síntesis se llevó a término sin mayores complicaciones utilizando 3 equivalentes de aminoácido protegido y de agentes de condensación (DIPCDI y HOBt) disueltos en DMF.

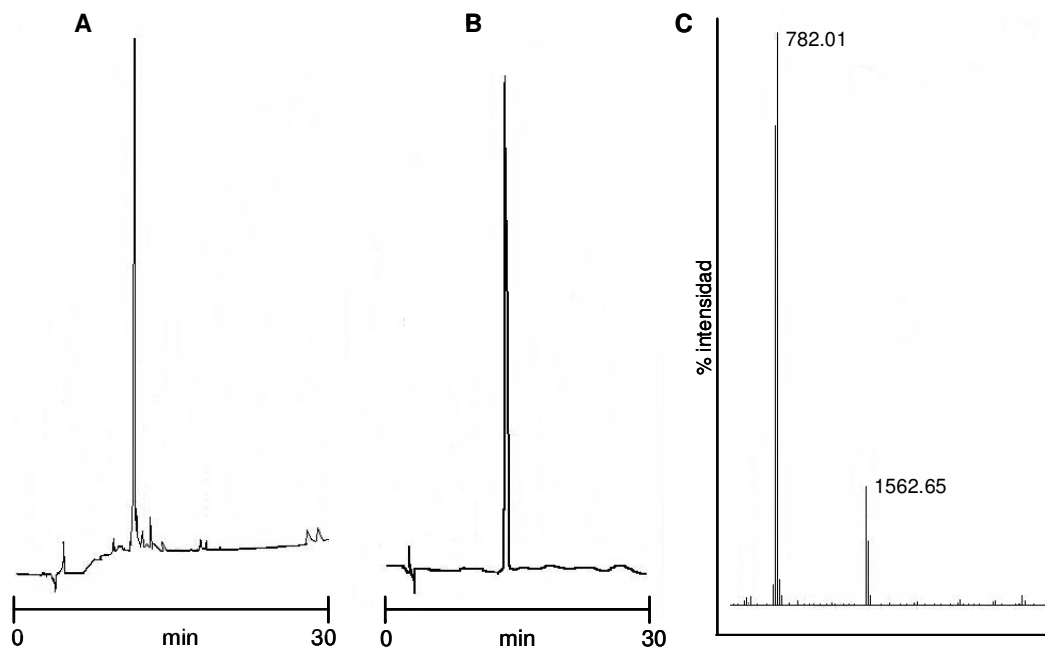


Figura 1.8. Cromatogramas del crudo peptídico (A) y del péptido NS4b(8-22) purificado (B). Espectro de masas del péptido purificado (C). Condiciones HPLC (B): columna de fase reversa Kromasil® C18 (250 x 4.6 mm) 5 µm, gradiente lineal de 90 a 65% de A en 30 minutos, flujo 1 ml min⁻¹, detección 215 nm. (A: H₂O + 0.05% TFA, B: MeCN + 0.05% TFA).

Finalizada la síntesis, se separó una alícuota de la peptidil-resina que se desprotegió completamente de los grupos protectores y se separó de la resina. El crudo obtenido se purificó por cromatografía líquida de alta resolución a escala semipreparativa. Posteriormente, el péptido

purificado se caracterizó por cromatografía líquida de alta resolución a escala analítica, análisis de aminoácidos y espectrometría de masas (electrospray) que confirmaron la presencia del péptido deseado.

Tabla 1.2. Caracterización del péptido NS4b(8-22) por análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta resolución analítica y espectrometría de masas electrospray.

NS4b(8-22)		H-GESAPSDAKTVTDAVD-OH			
análisis de aminoácidos ^(a)				HPLC ^(b)	ES-electrospray
Asp 3.21 (3)	Thr 1.47 (2)	Ser 1.82 (2)	Glu 0.98 (1)	k'=2.50	[M ⁺] _{calc.} : 1562.61 Da [M ⁺] _{exp.} : 1562.65 Da
Gly 0.93 (1)	Ala 2.96 (3)	Val 1.74 (2)	Lys 1.18 (1)		
Pro n.d.					

^(a) los valores teóricos se encuentran entre paréntesis. Pro no ha sido determinada.

^(b) El valor de la k' ha sido calculado en las condiciones que se muestran en el cromatograma del péptido purificado de la Figura 1.8.

1.3.2 Síntesis, purificación y caracterización del péptido NS5a(112-126)

El péptido NS5a(112-126) se encuentra localizado en el primer tercio de la proteína NS5a del virus GBV-C/HGV y su secuencia de aminoácidos es GTSGWAEVVVTPTHV. Del mismo modo que el péptido NS4b(8-22), éste también fue elongado en su extremo C-terminal con un residuo de ácido aspártico. La síntesis se llevó a cabo de forma manual en fase sólida utilizando como soporte la resina NovaSyn[®] TGA, con una funcionalización inicial de 0.23 mmol g⁻¹ que permite obtener el péptido en forma de ácido carboxílico en el extremo C-terminal. El primer aminoácido, Fmoc-Asp-ODamb, se unió en forma de anhídrido simétrico a la resina. El grado de unión del primer aminoácido se calculó determinando la N-fluorenilmetilpiperidina y fue del 78%, con lo que la nueva funcionalización de la resina se estableció en 0.17 mmol g⁻¹. La síntesis de la secuencia se realizó siguiendo el esquema de protección habitual de la química Fmoc/tBu, empleando en cada acoplamiento 3 equivalentes de aminoácido protegido y 3 equivalentes de reactivos (DIPCDI y HOBt) disueltos de DMF. Únicamente fue necesario repetir el acoplamiento de la ¹¹¹Thr. En el segundo acoplamiento se utilizaron 1.5 equivalentes tanto de aminoácido como de agentes de reactivos.

Al finalizar la síntesis del péptido, se separó una alícuota de 60 mg de peptidil-resina que tras secarla, se desprotegió totalmente y se liberó de la resina por acidólisis con una mezcla de TFA y capturadores de carbocationes. El crudo peptídico fue purificado por cromatografía líquida de alta resolución a escala semipreparativa. El péptido purificado se caracterizó por cromatografía líquida de alta resolución analítica, análisis de aminoácidos y espectrometría de masas MALDI-TOF.

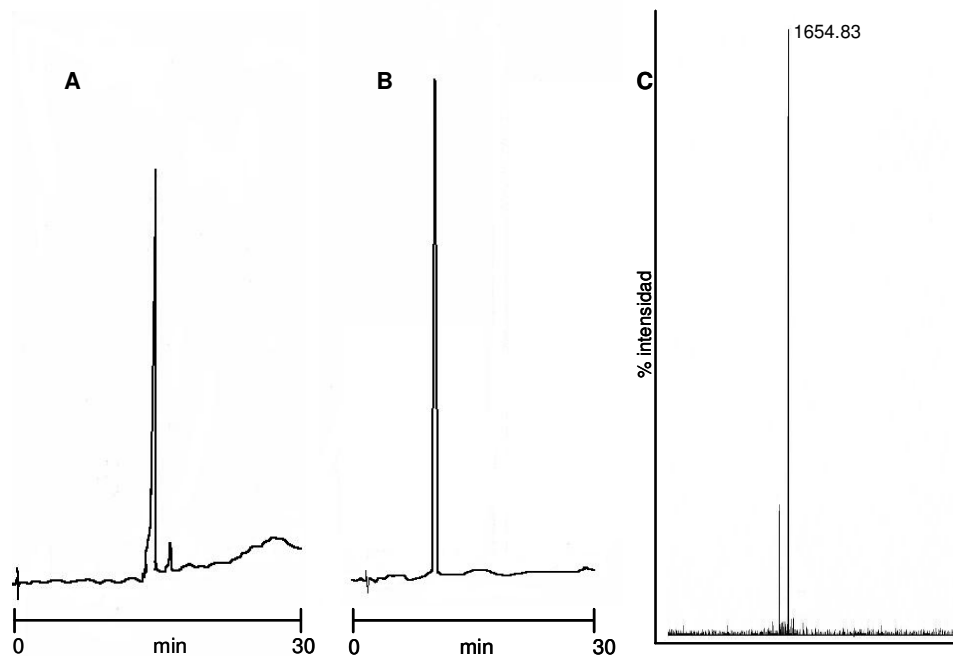


Figura 1.9. Cromatogramas del crudo peptídico (A) y del péptido NS5a(112-126) purificado (B). Espectro de masas MALDI-TOF del péptido purificado (C). Condiciones HPLC: columna de fase reversa Kromasil® C18 (250 x 4.6 mm) 5 μm , gradiente lineal de 90 a 65% de A en 30 minutos, flujo 1 ml min^{-1} , detección 215 nm. (A: H_2O + 0.05% TFA, B: MeCN + 0.05% TFA).

Tabla 1.3. Caracterización del péptido NS5a(112-126) por análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta resolución analítica y espectrometría de masas MALDI-TOF.

NS5a(112-126)				H-GTSGWAEVVVTPHVD-OH	
análisis de aminoácidos ^(a)				HPLC ^(b)	ES-MALDI-TOF
Asp 1.09 (1)	Thr 2.92 (3)	Ser 1.04 (1)	Pro n.d.	$k' = 2.20$	$[M^+]_{\text{calc}}: 1654.80 \text{ Da}$
Glu 1.09 (1)	Gly 1.84 (2)	Val 3.70 (4)	His 0.97 (1)		$[M^+]_{\text{exp}}: 1654.83 \text{ Da}$
Ala 1.06 (1)	Trp n.d.				

^(a) los valores teóricos se encuentran entre paréntesis. Pro y Trp no determinados. ^(b) El valor de la k' ha sido calculado en las condiciones que se muestran en el cromatograma (B) de la Figura 1.9.

1.3.3 Síntesis, caracterización y purificación de los péptidos quiméricos Qm1 y Qm2

Como se ha mencionado al inicio del capítulo, los péptidos lineales cortos pueden mostrar una baja antigenicidad en los ensayos inmunoenzimáticos debido a su pequeño tamaño. Aunque pueden emplearse dos o más antígenos en los ensayos, la sensibilidad y la especificidad del test podría verse afectada por un efecto de competición de los antígenos a la fase sólida y por cambios en la distribución de los determinantes antigénicos de los péptidos unidos. Por estos motivos, cada vez más existe una tendencia a utilizar péptidos quiméricos para evitar estos problemas y además, mejorar tanto la sensibilidad como la especificidad de los ensayos [84,85,86].

Los péptidos quiméricos lineales son aquellos en que los diferentes epítomos se encuentran unidos de manera secuencial, generalmente separados por dos o tres residuos de algún aminoácido no funcional pequeño cuya función es conferir flexibilidad a la molécula a la vez que incrementar la distancia entre los distintos epítomos de la molécula y preservar, de este modo, la actividad y estructura de cada uno de los antígenos integrantes. La orientación de los epítomos dentro de la molécula puede influir en la manera de estructurarse en el espacio y ello puede influir tanto en la capacidad de generar anticuerpos como en la capacidad de detectarlos. Existen trabajos en los que se describe la importancia de la orientación de los antígenos para estimular el sistema inmunitario y desencadenar la producción de anticuerpos [87], si bien la capacidad para detectar posteriormente los anticuerpos no parece verse influida por la orientación de los epítomos [88,89]. También se encuentran trabajos en los que se describe la importancia de la orientación de los epítomos en la capacidad antigénica de las moléculas [84]. Teniendo presentes estos trabajos, se diseñaron dos péptidos quiméricos constituidos por dos epítomos distintos, en los que éstos estuvieran dispuestos en las dos orientaciones posibles.

Los péptidos Qm1 y Qm2 son péptidos quiméricos constituidos por los péptidos NS4b(8-22) y NS5a(112-126) en distinta orientación unidos colinealmente mediante un nexo de tres residuos de glicina (Figura 1.10). Para la síntesis del péptido Qm1 se pesaron de 200 mg de peptidil-resina NovaSyn® TGA con el péptido NS4b(8-22) unido y totalmente protegido. Se elongó la cadena peptídica introduciendo tres residuos de glicina y a continuación se hizo crecer el péptido NS5(112-126). Para obtener el péptido Qm2 se partió de la peptidil-resina con el péptido NS5a(112-126) anclado y se sintetizó sobre éste el péptido NS4b(8-22) separados también por tres residuos de glicina. La síntesis de los péptidos quiméricos no presentó complicaciones, todos los acoplamientos de los aminoácidos se llevaron a cabo utilizando 3 equivalentes de aminoácido protegido previamente activado con HOBt y DIPCDI, empleando DMF como medio de reacción.

Una vez finalizada la síntesis de los péptidos quiméricos, se procedió a la total eliminación de los grupos protectores y a la liberación del péptido de la resina por tratamiento ácido con TFA. Los crudos peptídicos se purificaron por cromatografía líquida de alta resolución semipreparativa y posteriormente se caracterizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución analítica y espectrometría de masas MALDI-TOF.

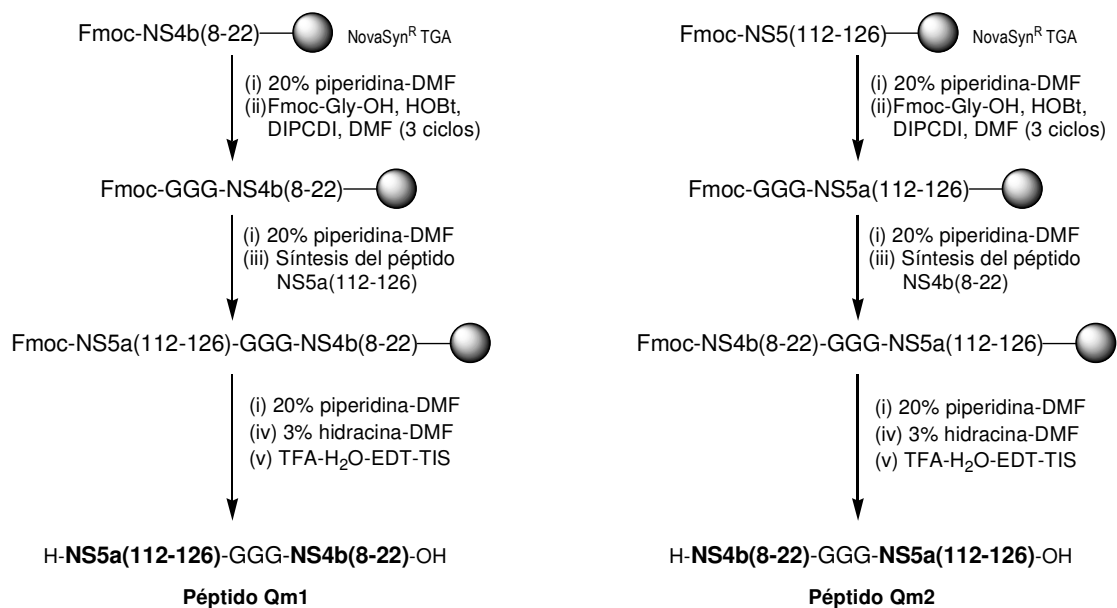


Figura 1.10. Esquema de síntesis seguido para la obtención de los péptidos quiméricos Qm1 y Qm2.

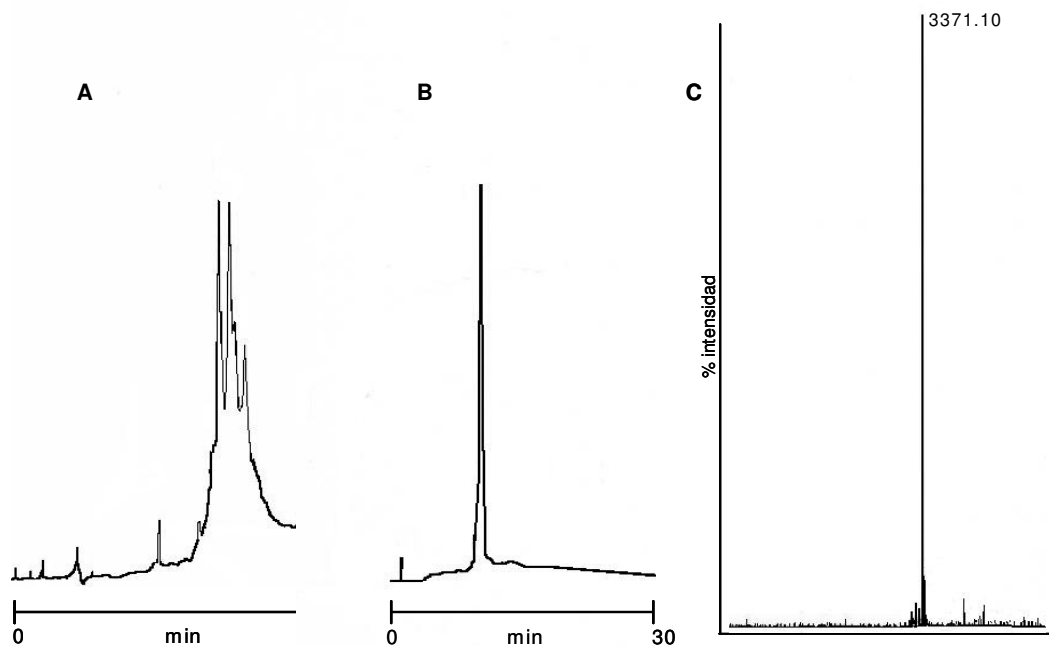


Figura 1.11. Cromatogramas del crudo peptídico (A) y del péptido Qm1 purificado (B). Espectro de masas MALDI-TOF del péptido purificado (C). Condiciones HPLC: columna de fase reversa Kromasil[®] C18 (250 x 4.6 mm) 5 μ m, gradiente lineal de 90 a 65% de A en 30 minutos, flujo 1 ml min⁻¹, detección 215 nm. (A: H₂O + 0.05% TFA, B: MeCN + 0.05% TFA).

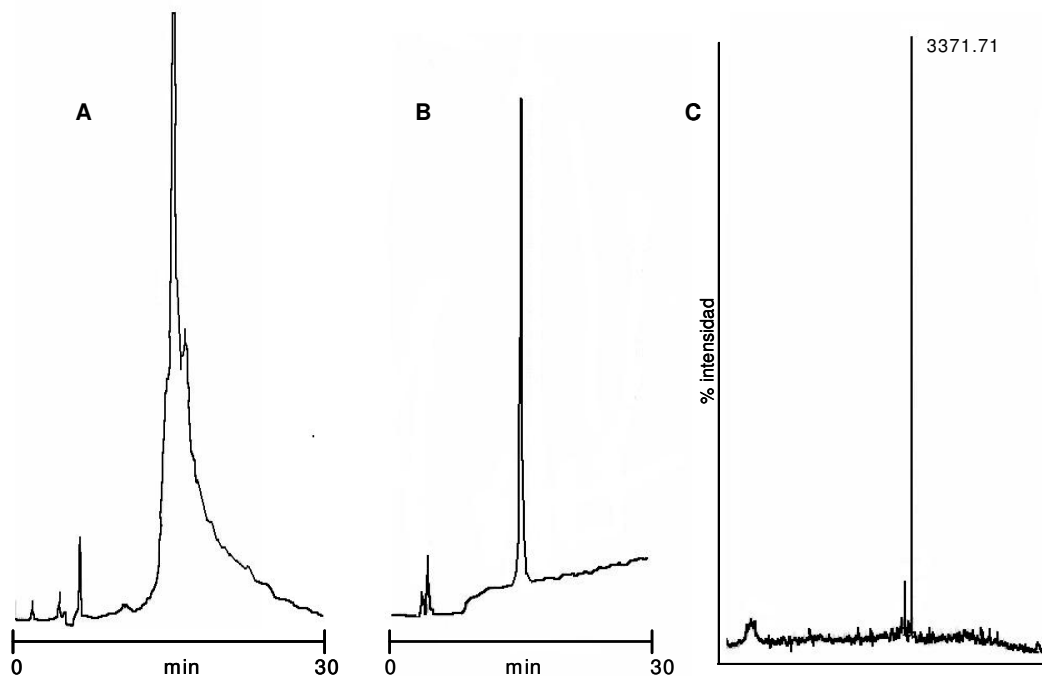


Figura 1.12. Cromatogramas del crudo peptídico (A) y del péptido Qm2 purificado (B). Espectro de masas MALDI-TOF del péptido purificado (C). Condiciones HPLC: columna de fase reversa Kromasil® C18 (250 x 4.6 mm) 5 µm, gradiente lineal de 90 a 65% de A en 30 minutos, flujo 1 ml min⁻¹, detección 215 nm. (A: H₂O + 0.05% TFA, B: MeCN + 0.05% TFA).

Tabla 1.4. Caracterización de los péptidos quiméricos Qm1 y Qm2 por cromatografía líquida de alta resolución analítica y espectrometría de masas MALDI-TOF.

Qm1		H-GTSGWAEVVVTPHVD-GGG-GESAPSDAKTVTDAVD-OH
HPLC ^(b)	ES-MALDI-TOF	
k' = 3.57	[M ⁺] _{calc} : 3371.54 Da [M ⁺] _{exp} : 3371.10 Da	
Qm2		H-GESAPSDAKTVTDAVD-GGG-GTSGWAEVVVTPHVD-OH
HPLC ^(a)	ES-MALDI-TOF	
k' = 4.44	[M ⁺] _{calc} : 3371.54 Da [M ⁺] _{exp} : 3371.71 Da	

^(a) El valor de la k' ha sido calculado en las condiciones que se muestran en los cromatogramas de las Figuras 1.11 y 1.12.

1.3.4 Síntesis de péptidos superpuestos. Región estructural E2(89-149)

El objetivo principal en el desarrollo de un test de diagnóstico basado en péptidos sintéticos, es reconocer a los anticuerpos con la misma eficacia con que los reconocen las proteínas virales enteras, pero empleando únicamente fragmentos cortos que contengan el determinante antigénico más específico. Esta porción específica que interacciona con los anticuerpos es la que se denomina epítipo. A lo largo de los años, se han utilizado distintos métodos para identificar los epítipos, entre los que se incluyen la utilización de algoritmos de predicción, que identifican los posibles epítipos. Otro método que se ha hecho popular en los últimos años, es la utilización de péptidos sintéticos superpuestos que abarquen toda la proteína o región a explorar. Los recursos para identificar los epítipos han aumentado enormemente con el desarrollo de técnicas e instrumentos que permiten la síntesis múltiple de secuencias peptídicas [90].

Durante el transcurso de su tesis doctoral, Núria Rojo, sintetizó dos péptidos sintéticos pertenecientes a la proteína de envoltura E2, los péptidos E2(99-118) y E2(125-139), que mostraron una buena capacidad para reconocer anticuerpos anti-GVB-C/HGV [91,92]. Para desarrollar un test de diagnóstico con una buena especificidad y sensibilidad es muy importante la correcta identificación de los epítipos [93]. Basándonos en los resultados obtenidos, se investigó de una manera más específica cuales de los aminoácidos incluidos en estas secuencias eran los encargados del reconocimiento específico de los anticuerpos. Para ello se realizó una exploración del fragmento de la proteína mediante la síntesis de distintos péptidos superpuestos.

Se seleccionó un fragmento de 60 aminoácidos de la proteína de envoltura E2, la región 89-149, que contiene las secuencias de los péptidos E2(99-118) y E2(125-139). En la Figura 1.13 se muestran los perfiles teóricos de hidrofilia, accesibilidad y probabilidad de formar giros β para esta región, donde pueden observarse dos máximos que se corresponden con las secuencias de los péptidos E2(99-118) y E2(125-139).

Se escogió la secuencia consenso más conservada después de comparar las estructuras primarias de las distintas cepas conocidas del virus. Se diseñaron 24 péptidos superpuestos de 15 aminoácidos cada uno, que abarcaron toda la región 89-149, de manera que cada uno de los péptidos superpuestos comparte 13 aminoácidos con el péptido que le sigue (Figura 1.14).

proteína E2

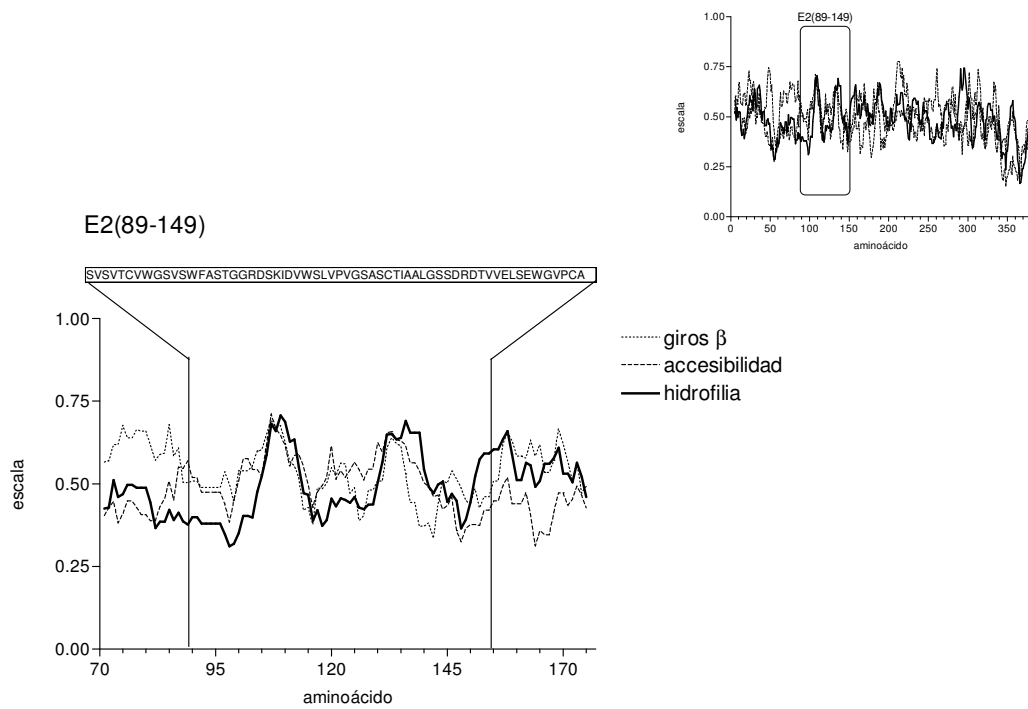


Figura 1.13. Perfiles de hidrofilia según Hopps & Woods, de probabilidad de formación de giros β según Chou & Fasman, y de accesibilidad para la región 89-149 de la proteína de envoltura E2 del virus GBV-C/HGV.

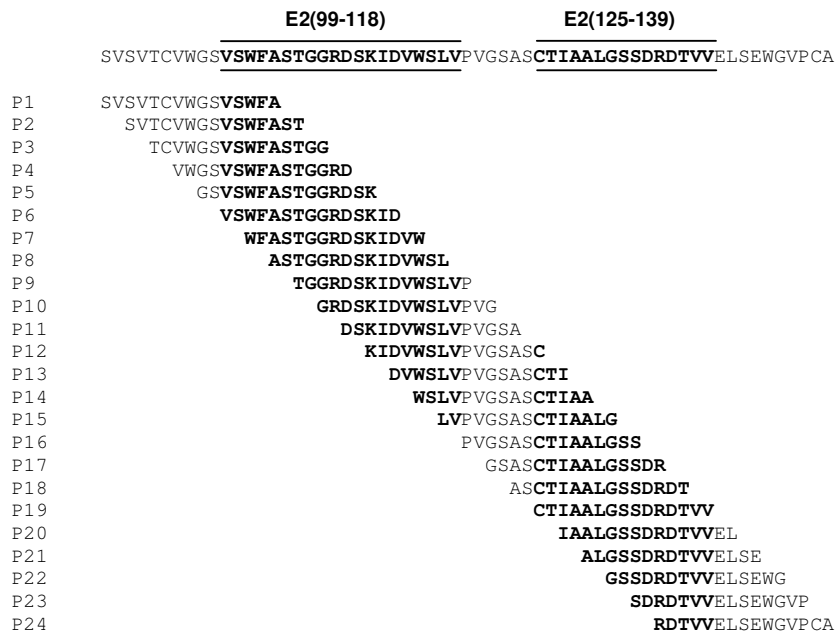


Figura 1.14. Estructura primaria de los 24 péptidos superpuestos pertenecientes a la región 89-149 de la proteína de envoltura E2 del virus GBV-C/HGV.

La síntesis de las 24 secuencias superpuestas se llevó a cabo de manera simultánea en un sintetizador semiautomático (Multisyntech GmbH). Para cada péptido, se partió de 50 mg de resina Rink Amida con un grado de funcionalización inicial de 0.73 mmol g^{-1} . La incorporación de los aminoácidos se realizó sistemáticamente con un doble acoplamiento. En el primer acoplamiento se utilizaron excesos triples tanto de aminoácidos como de reactivos, mientras que en el segundo acoplamiento se emplearon solamente excesos de 1.5. Los reactivos utilizados en el primer acoplamiento y en el segundo también cambiaron. En el primer acoplamiento se emplearon los reactivos más comúnmente empleados para la activación del grupo carboxilo: DIPCDI y HOBt, mientras que en el segundo acoplamiento se emplearon activadores más enérgicos, como el PyBOP en presencia de DIEA. Únicamente se realizó el control del grado de incorporación de los aminoácidos mediante la realización del test de ninhidrina para dos péptidos. En cada ciclo, la selección de los péptidos a analizar fue aleatoria.

Finalizada la síntesis múltiple, la etapa de liberación de los péptidos de la resinas se llevó a cabo de manera manual, tal y como se describe en el apartado 7.3.8 de los materiales y métodos.

Los péptidos fueron caracterizados mediante HPLC y los análisis de espectrometría de masas confirmaron la presencia de los productos deseados.

1.3.5 Síntesis, purificación y caracterización del péptido ramificado MAP₄ E2-NS5a

Además de la posibilidad de sintetizar péptidos quiméricos lineales, existe la posibilidad de sintetizar péptidos ramificados. Se han descrito numerosas ventajas de las estructuras peptídicas multiméricas (MAP, del inglés *multiple antigenic peptides*). Estas estructuras, descritas por primera vez por Tam [71], se basan en una matriz inmunológicamente inerte, de residuos trifuncionales de lisinas sobre la que puede sintetizarse una estructura ramificada de secuencias peptídicas. A diferencia de la composición ambigua que tienen los péptidos conjugados a proteínas, los MAPs se caracterizan por presentar una estructura química bien definida. Además, la estructura ramificada que genera el núcleo de lisinas de un MAP facilita el empaquetamiento de los antígenos peptídicos que lo forman dando lugar a una mayor estabilización de la estructura secundaria de las secuencias peptídicas. Cabe destacar, que el extremo N-terminal del antígeno peptídico que está alejado del núcleo de lisinas, se encuentra más expuesto y es más flexible que el extremo próximo al núcleo.

En el momento de diseñar el péptido ramificado, se tuvieron en cuenta las ventajas que representaría contener en una misma molécula epítomos pertenecientes a las proteínas de envoltura y epítomos pertenecientes a las proteínas no estructurales. Con esta idea, se diseñó un MAP

tetramérico heterogéneo, cuya estructura se muestra en la Figura 1.15, constituido por dos copias de una secuencia perteneciente a una proteína de envoltura y dos copias de una secuencia perteneciente a una proteína no estructural. Como región estructural se seleccionó el péptido E2(99-118), por ser el que presentó una mayor capacidad para reconocer anticuerpos anti-GBV-C/HGV tras haber realizado el estudio con los 24 péptidos superpuestos en los que estaba incluida esta región. Como péptido de la región no estructural se seleccionó el péptido NS5a(112-126), que también había mostrado una buena capacidad para reconocer anticuerpos anti-GBV-C/HGV.

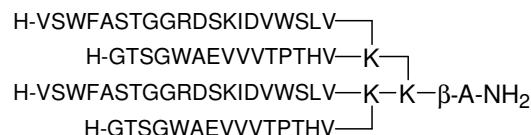


Figura 1.15. Estructura del péptido ramificado tetramérico MAP₄ E2-NS5a.

La síntesis del MAP₄ E2-NS5a, se realizó sobre 600 mg de resina NovaSyn[®] TGR con una funcionalización inicial de 0.29 mmol g⁻¹. El primer aminoácido introducido fue una β-alanina, que actuaría a modo de espaciador entre la resina y la matriz de lisinas. El núcleo de lisinas tetravalente fue obtenido, en primer término, mediante el acoplamiento de Fmoc-Lys(Fmoc)-OH seguido del acoplamiento de Fmoc-Lys(ivDde)-OH. El péptido E2(99-118) fue sintetizado en los grupos α-amino de los residuos de lisina del núcleo utilizando la activación DIPCDI/HOBt. El péptido NS5a(112-126) fue sintetizado sobre los grupos ε-amino de las lisinas tras la eliminación del grupo ivDde que protegía las aminas de su cadena lateral (Figura 1.16).

La síntesis de las cadenas E2(99-118) se llevó a cabo empleando activación DIPCDI/HOBt, utilizando 6 equivalentes de aminoácido protegido y de agentes de acoplamiento. Para conseguir grados de acoplamiento satisfactorios, fue necesario repetir el acoplamiento de los residuos ¹¹⁷Leu, ¹¹⁵Trp, ¹¹⁴Val, ¹¹³Asp, ¹¹²Ile, ¹¹¹Lys, ¹⁰⁸Arg. El aminoácido N-terminal de la secuencia se introdujo con el grupo α-amino protegido con el grupo Boc. Llegados a este punto, se separó una alícuota de peptidil-resina y se realizó la desprotección total de todos los aminoácidos y la escisión de la resina para realizar un análisis por espectrometría de masas, que mostró un único pico correspondiente a la masa calculada para el MAP dimérico.

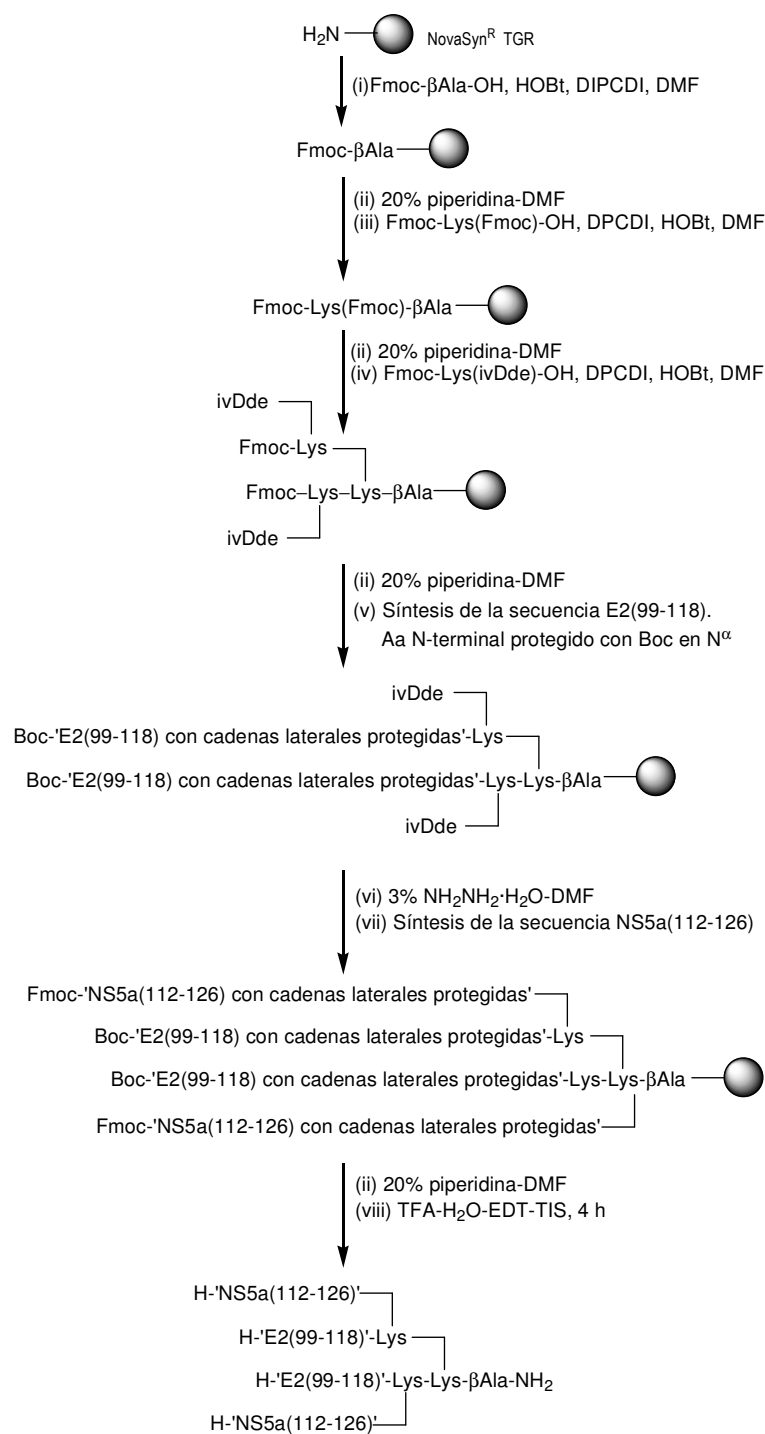


Figura 1.16. Esquema de síntesis del péptido ramificado tetramérico MAP₄ E2-NS5.

Antes de continuar con la síntesis, se eliminó el grupo ivDde de las lisinas del núcleo con hidracina al 3% en DMF. Las secuencias NS5a(112-126) se ensamblaron sobre los grupos amino expuestos de las lisinas del núcleo.

La incorporación de los aminoácidos activados con DIPCDI/HOBt resultó dificultosa en los cinco primeros aminoácidos de la secuencia y los acoplamientos se repitieron hasta tres veces, empleando TBTU en presencia de base (DIEA) como activador del grupo α -carboxilo. De este modo, se consiguieron acoplamientos satisfactorios a excepción del aminoácido ^{125}His , punto donde finalmente se acetiló la cadena creciente. La incorporación del resto de los Aa de la secuencia se completó satisfactoriamente previa activación con DIPCDI/HOBt.

Una vez finalizada la síntesis se eliminó el grupo Fmoc en α -amino y se realizó la desprotección total y la liberación del péptido de la resina por acidólisis con TFA. El crudo peptídico se purificó por cromatografía líquida semipreparativa. Las fracciones correspondientes al péptido se juntaron y se analizaron por HPLC analítica y espectrometría de masas MALDI-TOF. En la figura 1.17 se muestran los cromatogramas del crudo peptídico y del péptido después de la purificación, así como el espectro de masas del producto purificado.

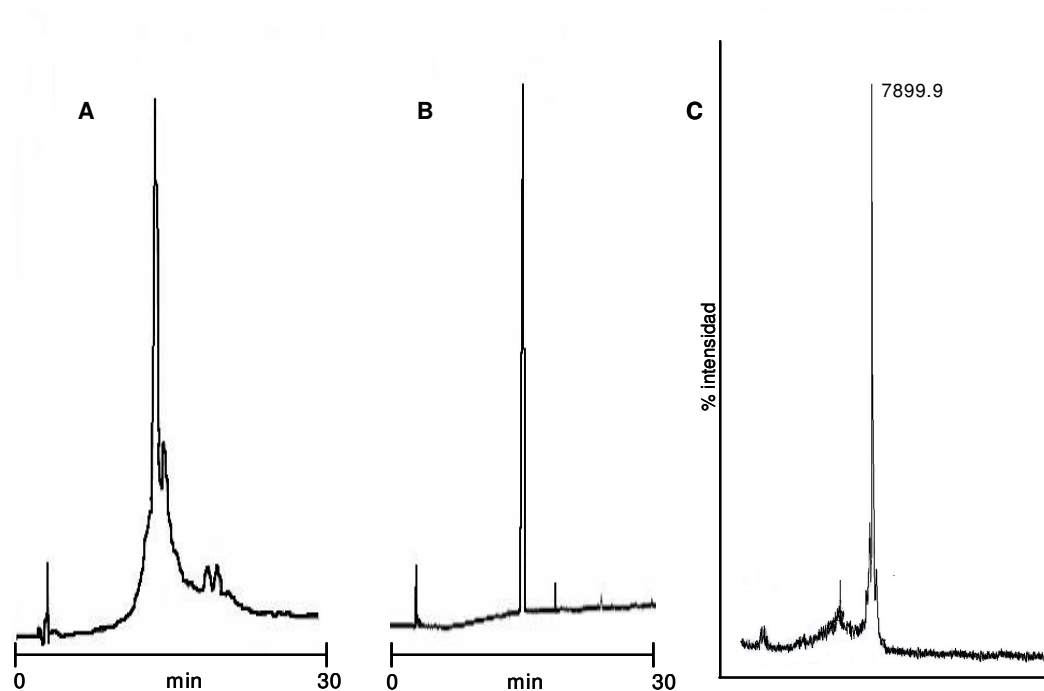


Figura 1.17. Cromatogramas del crudo peptídico (A) y del péptido MAP₄ E2-NS5a purificado (B). Espectro de masas MALDI-TOF del péptido purificado (C). Condiciones HPLC: columna de fase reversa Kromasil® C18 (250 x 4.6 mm) 5 μm , gradiente lineal de 95 a 5% de A en 30 minutos, flujo 1 ml min⁻¹, detección 215 nm. (A: H₂O + 0.05% TFA, B: MeCN + 0.05% TFA).

Tabla 1.5. Caracterización del péptido ramificado MAP₄ E2-NS5a por cromatografía líquida de alta resolución analítica y espectrometría de masas MALDI-TOF.

MAP4 E2-NS5a	
HPLC ^(b)	ES-MALDI-TOF
k' = 6.5	[M*] _{calc} : 7900.0 Da [M*] _{exp} : 7899.9 Da

^(a) El valor de la k' ha sido calculado en las condiciones que se muestran en el cromatograma de la Figura 1.17.

1.3.6 Ciclación de péptidos en fase sólida

Como ya se ha comentado al inicio de este capítulo una de las desventajas de los péptidos lineales cortos es su poca capacidad para adoptar conformaciones ordenadas en solución. Este efecto, conocido como “dilución conformacional”, tiene un efecto negativo en la afinidad del anticuerpo por el péptido a pesar que la secuencia peptídica contenga el lugar antigénico [72,94].

Desde hace mucho tiempo se conocen péptidos cíclicos con actividad biológica interesante. Algunos de ellos se emplean como fármacos, por ejemplo la ciclosporina A [95], un decapeptido cíclico que presenta una gran actividad inmunodepresora, o el antibiótico gramicidina S [96].

La ciclación de péptidos ha demostrado ser una aproximación útil en el desarrollo de péptidos con utilidad diagnóstica y terapéutica, lo que ha hecho que en los últimos años, la síntesis y propiedades biológicas de los péptidos cíclicos hayan alcanzado un considerable interés. Los péptidos cíclicos se han utilizado como inmunógenos sintéticos [97,98] ya que al reducir la libertad conformacional de estas moléculas lineales tan flexibles, a menudo, muestran una mayor afinidad de unión a su receptor, debido a la reducción de un efecto entrópico desfavorable. Además de la introducción de restricción de movilidad, la ciclación se ha empleado en muchas ocasiones para alargar la duración de la acción de los péptidos dado que, en general, los péptidos cíclicos son más estables a la proteólisis que sus análogos lineales [99,73]. Trabajos más recientes han demostrado que la introducción de restricción de movilidad en los péptidos mediante la formación de ciclaciones intramoleculares, mejora su reactividad frente a los anticuerpos ya que al reducirse notablemente el repertorio conformacional de las secuencias lineales se puede conseguir una mimetización antigénica más eficaz en comparación con sus precursores lineales [69,100].

Los péptidos cíclicos se pueden dividir en dos grandes grupos: homodéticos y heterodéticos. En los péptidos cíclicos homodéticos, el anillo está formado por aminoácidos unidos única y

exclusivamente por enlaces amida. En cambio, en los péptidos cíclicos heterodéticos existen otros tipos de enlaces formando el ciclo, como pueden ser ésteres, éteres, tioéteres y más habitualmente los puentes disulfuro, formados por la oxidación de los tioles presentes en la cadena lateral de los residuos de cisteína, probablemente la restricción conformacional más natural.

Los ciclopéptidos homodéticos, a su vez, pueden clasificarse según los aminoácidos que intervienen en la formación del ciclo en [101,102]:

1. ciclopéptidos “cabeza-cola” en los que la ciclación se establece por la formación de un enlace amida entre el residuo N^α-terminal y el C^α-terminal.
2. ciclopéptidos “cadena lateral-cadena lateral” en los que la ciclación conecta las cadenas laterales de dos aminoácidos, en este tipo de ciclación intervienen los grupos ε-amino de la lisina y los β-carboxilo de los residuos de aspártico y glutámico.
3. ciclopéptidos “cadena lateral-terminal” que se originan cuando la cadena lateral de un residuo se une con el grupo N^α-terminal o C^α-terminal. Por ejemplo, al hacer reaccionar el N^ε-lisina con el grupo C^α-terminal, o el β-carboxilo de un residuo de ácido aspártico o glutámico con el grupo N^α-terminal.

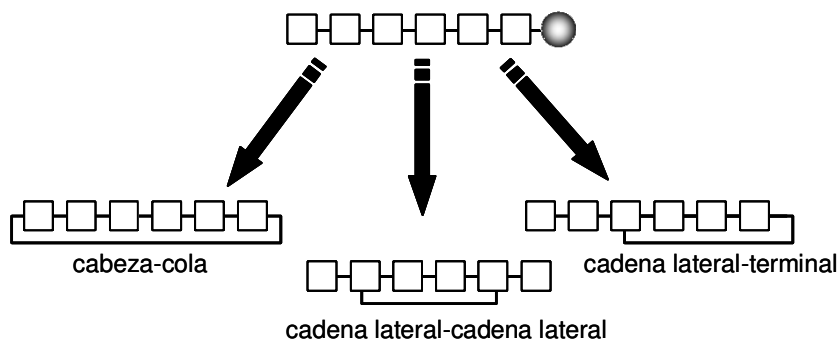


Figura 1.18. Síntesis de péptidos cíclicos homodéticos, clasificación según los aminoácidos que intervienen en la formación del ciclo.

La ciclación puede llevarse a cabo en solución o en fase sólida [103,104]. La ciclación en fase sólida presenta ventajas respecto a la ciclación en solución. Una de las ventajas es que se reduce el número de etapas de aislamiento y purificación ya que la reacción de ciclación tiene lugar sobre el péptido lineal unido todavía a la resina. Otra de las ventajas es que al trabajar con resinas de baja sustitución (condición necesaria) se desfavorecen los procesos intermoleculares. En estas reacciones se emplean los mismos agentes de condensación que en un acoplamiento normal, pero hay que

tener en cuenta que la etapa crítica para la obtención de estos productos es la reacción para establecer el anillo, en la que los grupos que han de reaccionar se tienen que encontrar en el espacio para cerrar el macrociclo. Existen diferentes estrategias, en cuanto a la unión del primer aminoácido a la resina, para llevar a cabo la ciclación en fase sólida:

- a. unión del primer aminoácido a la resina mediante la cadena lateral del aminoácido.
- b. unión a la resina mediante un nitrógeno del esqueleto peptídico.
- c. unión del grupo carboxilo del primer aminoácido al soporte mediante espaciadores sensibles a aminas libres.

En esta tesis se ha llevado a cabo la obtención de péptidos cíclicos mediante la formación de un enlace cabeza-cola y mediante la formación de un enlace cadena lateral-terminal. La estrategia seguida para obtener las moléculas cíclicas se basa en la unión del aminoácido C-terminal a la resina a través del grupo carboxilo de su cadena lateral. Los aminoácidos más empleados para realizar este tipo de unión a resina son el ácido aspártico y el ácido glutámico. Para realizar esta estrategia es necesario que el grupo protector del grupo α -carboxilo del residuo C-terminal de ácido aspártico sea ortogonal respecto a los grupos protectores de carboxilo del resto de aminoácidos y también al de los grupos α -amino. Entre los grupos protectores más empleados están el éster fluorenil metílico [105] en química Boc/Bzl, el éster 2,4-dimetilbenzílico [106] y el éster metílico [107] en química Fmoc/tBu, aunque el más ampliamente utilizado es el éster alílico [108] debido a que es compatible tanto en química Boc/Bzl como en química Fmoc/tBu. La eliminación del éster alílico se realiza con Pd⁰ y este hecho presenta algunos inconvenientes, sobre todo si la resina presenta una alta funcionalización o se trata de péptidos cíclicos grandes. Recientemente, se ha desarrollado el éster 4-{N-[1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)-3-metilbutil]amino}benzílico (Dmab), como nuevo grupo protector de las funciones carboxilo que se elimina fácilmente con hidracina [109,110].

1.3.6.1 Selección y diseño de los péptidos cíclicos

Se seleccionó la secuencia perteneciente a la proteína no estructural NS4a, NS4a(27-43), que corresponde a una región altamente conservada y que además, tiene una gran probabilidad de contener un giro β según la predicción teórica de Chou & Fasman (Figura 1.1).

A partir de la secuencia lineal mencionada se diseñaron dos tipos de péptidos cíclicos, un péptido cíclico del tipo “cabeza-cola” y un péptido cíclico del tipo “cadena lateral-terminal”. Para llevar a cabo la síntesis del péptido cíclico “cadena lateral-terminal” se aprovechó la presencia en la secuencia de un residuo de lisina. En la síntesis se emplearon grupos protectores no habituales para

proteger la función β -carboxilo del ácido aspártico y el N^ϵ de la lisina. Se aprovechó la ortogonalidad de los grupos 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)-3-metilbutil (ivDde) y 4{N-[1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)-3-metilbutil]-amino}benciloxi (Dmab) con la estrategia Fmoc/tBu, ya que son estables tanto a la piperidina como al DBU, bases utilizadas para eliminar el grupo Fmoc.

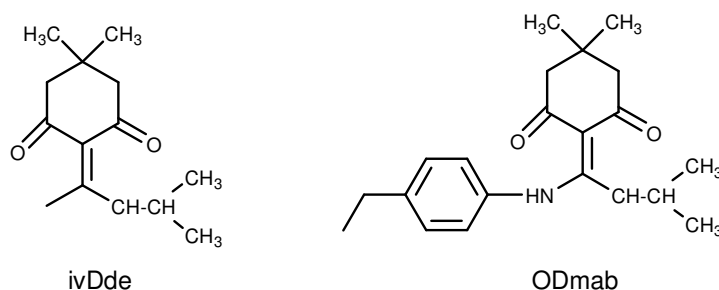


Figura 1.19. Estructura de los grupos protectores de los grupos amino (ivDde) y ácido carboxílico (ODmab), empleados en la ciclación en fase sólida.

Así pues, se utilizó el derivado de lisina con la función ϵ -amino protegido con el grupo ivDde y la treonina protegida en N^α con el grupo Boc, para obtener el derivado cíclico “cadena lateral-terminal”, NS4a(27-43) cyc-CT. Para la obtención del derivado cíclico “cabeza-cola”, NS4a(27-43) cyc-HT, se emplearon los grupos protectores más habituales para cada aminoácido. En la Figura 1.20 se muestra el esquema de síntesis para la obtención de los ciclopeptidos.

1.3.6.2 Síntesis y caracterización del precursor lineal NS4a(23-47)

La síntesis del péptido NS4a(23-43) TDWDVKGGGSPLYRHGD, se llevó a cabo de forma manual en fase sólida empleando la estrategia de protección Fmoc/tBu. Se partió de 1g de resina NovaSyn[®] TG Sieber con una funcionalización inicial de 0.16 mmol g⁻¹. Se seleccionó esta resina por presentar la propiedad de ser lábil a un 1% de TFA, característica que permitiría, en caso necesario, llevar a cabo la reacción de ciclación en solución con la cadena peptídica parcialmente protegida. Antes de incorporar el primer aminoácido de la secuencia, se unió a la resina un residuo de β -Ala y a continuación el ácido 4-hidroximetilfenoxiacético (HMPA) de manera que la resina quedó funcionalizada con un ácido carboxílico, que permitió la obtención del péptido en su forma carboxílica.

Se formó un anhídrido simétrico con el primer aminoácido, el ácido aspártico, que se unió por esterificación al espaciador. Se calculó el rendimiento de unión del residuo de Asp antes de seguir con la síntesis. Para determinarlo se empleó el método de la N-fluorenilmetilpiperidina y se obtuvo una nueva funcionalización de la resina, de 0.11 mmol g⁻¹.

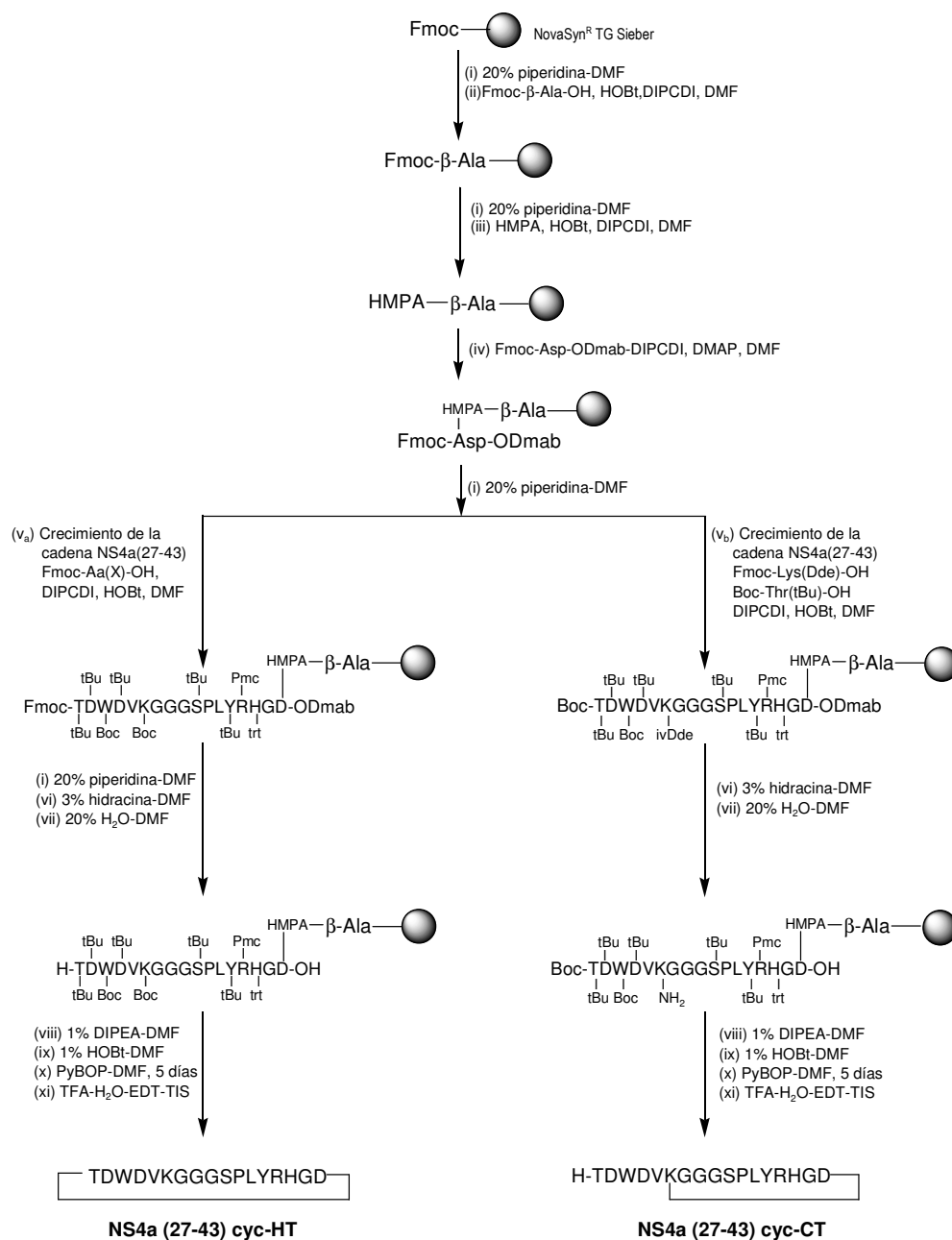


Figura 1.20. Estrategia de síntesis para obtener los derivados cíclicos cyc-CT y cyc-HT a partir del precursor lineal NS4a(27-43).

El crecimiento de la cadena se realizó empleando la estrategia habitual de química Fmoc hasta la incorporación de la ²⁹Gly. En este punto se secó la peptidil-resina y se dividió en dos partes para seguir la síntesis por separado, empleando los aminoácidos con diferente protección dependiendo del péptido final a obtener. Para las incorporaciones de los aminoácidos se utilizaron 3 equivalentes del aminoácido protegido y de los agentes de acoplamiento (DIPCDI/HOBt) disueltos en DMF.

Una vez finalizada la síntesis se tomó una alícuota de 50 mg de cada una de las peptidil-resinas para realizar la desprotección total de los aminoácidos y la escisión de la resina. Los crudos peptídicos obtenidos se caracterizaron por HPLC, análisis de aminoácidos y espectrometría de masas. Debido a la gran pureza de los productos obtenidos no fue necesaria su purificación.

Tabla 1.6. Caracterización de los dos derivados del péptido NS4a(27-43) por análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta resolución analítica y espectrometría de masas MALDI-TOF.

NS4a(27-43) der 1 H-TDWDVKGGGSPLYRHGD-OH						
análisis de aminoácidos ^(a)				HPLC ^(b)	ES-MALDI-TOF	
Asp 2.51 (3)	Thr 0.73 (1)	Ser 1.01 (1)	Pro n.d.	k' = 2.88	[M ⁺] _{calc} : 1859.97 Da	
Gly 4.37 (4)	Val 0.71 (1)	Leu 1.11 (1)	Tyr 1.04 (1)		[M ⁺] _{exp} : 1859.90 Da	
His 1.06 (1)	Lys 0.66 (1)	Arg 0.90 (1)	Trp n.d.			

NS4a(27-43) der 2 H-TDWDVKGGGSPLYRHGD-OH						
análisis de aminoácidos ^(a)				HPLC ^(b)	ES-MALDI-TOF	
Asp 2.94 (3)	Thr 0.94 (1)	Ser 1.07 (1)	Pro n.d.	k' = 2.92	[M ⁺] _{calc} : 1859.97 Da	
Gly 4.16 (4)	Val 0.72 (1)	Leu 1.06 (1)	Tyr 1.00 (1)		[M ⁺] _{exp} : 1860.03 Da	
His 1.01 (1)	Lys 0.65 (1)	Arg 0.91 (1)	Trp n.d.			

NS4a(27-43) der 1, sintetizado con los aminoácidos: Fmoc-Lys(Boc)-OH y Fmoc-Thr(tBu)-OH.

NS4a(27-43) der 2, sintetizado con los aminoácidos: Fmoc-Lys(ivDde)-OH y Boc-Thr(tBu)-OH.

^(a) los valores teóricos se encuentran entre paréntesis. Pro y Trp no determinados. ^(b) El valor de la k' ha sido calculado en las condiciones que se muestran en el cromatograma de la Figura 1.21.

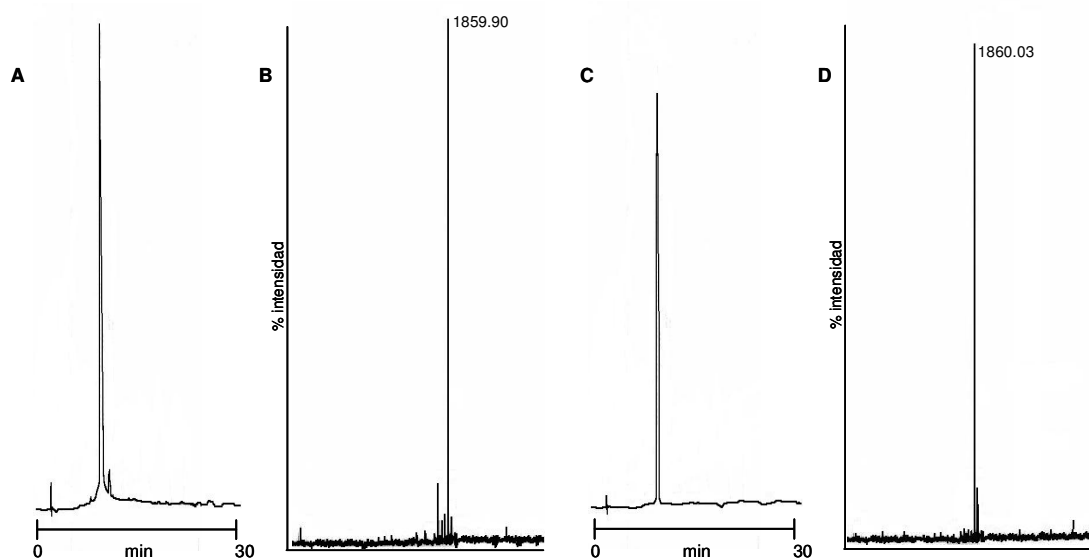


Figura 1.21. Cromatogramas y espectros de masas MALDI-TOF del crudo peptídico NS4a(27-43) der1 (A y B) y NS4a(27-43) der2 (C y D). Condiciones HPLC: columna de fase reversa Kromasil® C18 (250 x 4.6 mm) 5 μ m, gradiente lineal de 95 a 40% de A en 30 minutos, flujo 1 ml min⁻¹, detección 215 nm. (A: H₂O + 0.05% TFA, B: MeCN + 0.05% TFA).

1.3.6.3 Síntesis, caracterización y purificación de los péptidos cíclicos cyc-CT y cyc-HT

La puesta a punto de las estrategias de ciclación descritas se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Weng C. Chan [109,111] en la Universidad de Nottingham, durante una estancia en su laboratorio. Posteriormente, las ciclaciones se realizaron en el Departamento de Química de Péptidos y Proteínas del IIQAB-CSIC en Barcelona.

Se probaron diferentes estrategias de activación del grupo carboxilo, empleando desde los reactivos más frecuentemente utilizados como son el DIPCDI y HOBt, hasta aquellos que permiten una activación mucho más rápida del grupo ácido, como el PyBOP o el HOAt. La reacción de ciclación se llevó a cabo empleando diferentes tiempos de reacción. Mediante la técnica de HPLC analítico se siguió el avance de la reacción.

Para la obtención de los péptidos cíclicos, se disponía de los dos precursores lineales protegidos y unidos a la resina. El primer paso consistió en la eliminación de los grupos protectores de los residuos que se verían involucrados en la ciclación.

En el caso del precursor del macrociclo de 12 residuos (cyc-CT), se eliminó el grupo Fmoc con 20% pip/DMF y posteriormente se eliminó el grupo Dmab utilizando 3% hidracina en DMF. De manera similar, en el caso del precursor del macrociclo de 17 residuos (cyc-HT) solo fue necesario tratar la peptidil-resina con 3% de hidracina en DMF, ya que los dos grupos protectores a eliminar (ivDde, Dmab) son lábiles en las mismas condiciones.

La eliminación del grupo protector Dmab puede ser incompleta si solo se emplea la hidracina, pudiendo dar lugar a la formación del éster 4-aminobencil estable (Figura 1.22) [112]. En caso que se dé la formación de dicho éster, el grupo carboxilo no estaría disponible para reaccionar con el grupo amino y cerrar así el ciclo. Para evitar que esto suceda, después del tratamiento de las peptidil-resinas con hidracina, éstas se trataron con una disolución de 20% de agua en DMF durante 30 min y después se dejaron las peptidil-resinas 16 horas en contacto con esta disolución. Transcurrido este tiempo se lavaron las peptidil-resinas con DMF, DCM y hexano hasta sequedad.

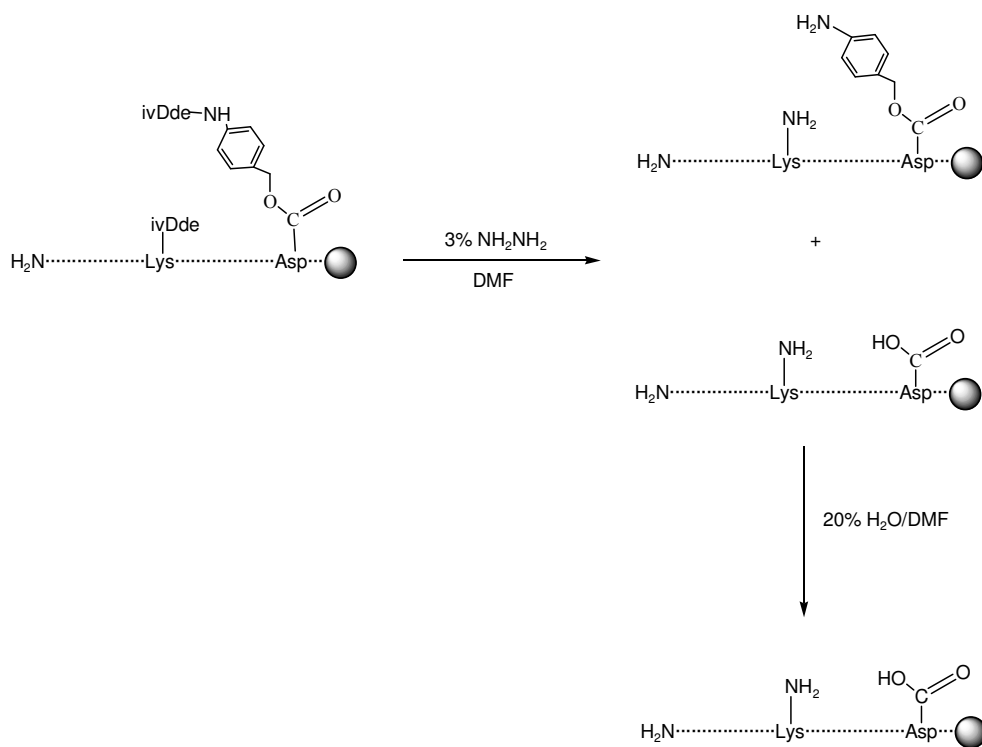


Figura 1.22. Eliminación completa del grupo Dmab.

Una vez se tuvieron las peptidil-resinas parcialmente desprotegidas se llevó a cabo la activación del grupo α -carboxilo. Se pesaron 100 mg de cada una de las peptidil-resinas y se lavaron con una disolución de HOBT al 1% en DMF. Posteriormente, se añadieron los activadores. Como agentes de condensación: 4 eq de DIPCDI y 2 eq de HOAt disueltos en 1 ml de DMF. Esta reacción se dejó en agitación continua y suave durante 4 días.

Transcurrido este tiempo se lavaron las resinas con DMF, se secaron con DCM y hexano y se llevó a cabo la desprotección y liberación de una pequeña alícuota de 10 mg de cada peptidil-resina para seguir por HPLC la reacción de ciclación. Los cromatogramas mostraron un cambio en el perfil que sugería que la reacción de ciclación había tenido lugar, aunque de manera incompleta, dado que aún se apreciaban los picos correspondientes a los precursores lineales.

Se repitió la reacción de ciclación en idénticas condiciones, con la única diferencia que las peptidil-resinas se lavaron con una disolución de 1% DIEA en DMF y seguido de una disolución de 1% HOBt en DMF antes de activar el grupo carboxilo. Pasados los 4 días de reacción, se lavaron las peptidil-resinas y se secaron siguiendo el protocolo habitual. Se realizó el control cromatográfico de una pequeña alícuota de cada una de las peptidil-resinas.

Finalmente, se repitió la reacción de ciclación empleando agentes de condensación más reactivos. El tratamiento previo a la activación fue el mismo que en el caso anterior, neutralización de las peptidil-resinas con una disolución de DIEA al 1% en DMF seguido de un lavado con una disolución de HOBt al 1% en DMF. Posteriormente, se activó el carboxilo, esta vez empleando 1.5 eq de PyBOP disueltos en DCM:DMF 1:1. La reacción se mantuvo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un baño de sal con hielo durante 3 horas y transcurrido este tiempo se dejó durante 5 días a temperatura ambiente con agitación constante. Pasado el tiempo se lavaron las resinas y se procedió al desanclaje.

Las muestras obtenidas de esta tercera activación se analizaron mediante cromatografía líquida acoplada a masas con la finalidad de identificar las masas de los productos correspondientes a cada pico. Se confirmó la presencia de un pico correspondiente a la masa de los productos deseados: 1842 g mol^{-1} . Dichos productos fueron aislados por purificación en cromatografía líquida de alta resolución y posteriormente caracterizados por espectrometría de masas.

El rendimiento de obtención de los productos cíclicos tras la purificación fue del 4.4% y 4.8% para las construcciones cyc-HT y cyc-CT, respectivamente.

Tabla 1.7. Caracterización de los derivados cíclicos del péptido NS4a(27-43), cyc-HT y cyc-CT, por cromatografía líquida de alta resolución analítica y espectrometría de masas MALDI-TOF.

cyc-HT	
HPLC ^(b)	ES-MALDI-TOF
k' = 3.36	[M ⁺] _{calc} : 1841.97 Da [M ⁺] _{exp} : 1842.90 Da

cyc-CT	
HPLC ^(b)	ES-MALDI-TOF
k' = 5.45	[M ⁺] _{calc} : 1841.97 Da [M ⁺] _{exp} : 1841.70 Da

^(b) El valor de la k' ha sido calculado en las condiciones que se muestran en los cromatogramas de las Figuras 1.23 y 1.24.

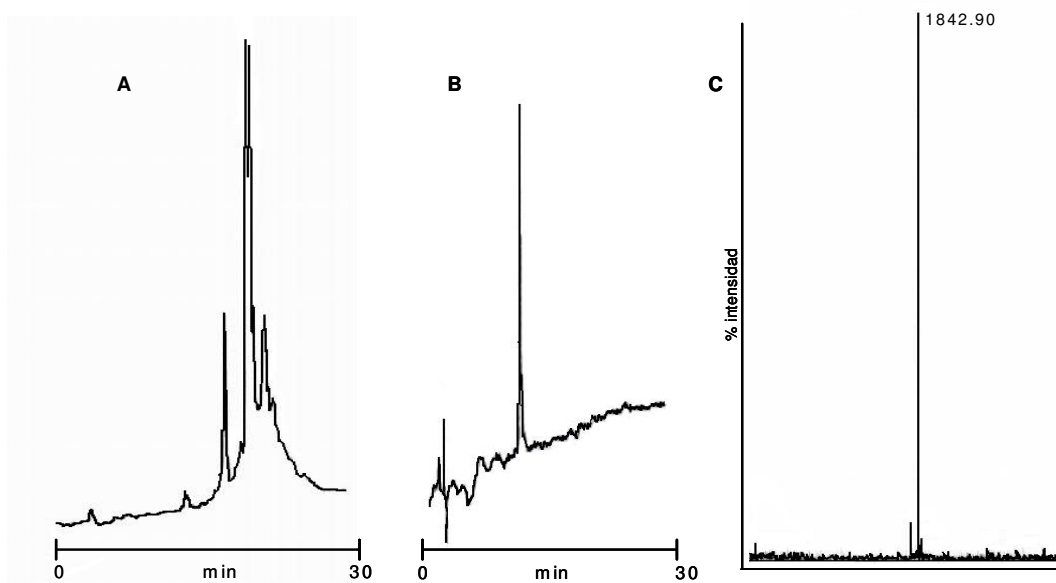


Figura 1.23. Cromatogramas del crudo peptídico (A) y del péptido cyc-HT purificado (B). Espectro de masas MALDI-TOF del péptido purificado (C). Condiciones HPLC: columna de fase reversa Kromasil® C18 (250 x 4.6 mm) 5 µm, gradiente lineal de 95 a 40% de A en 30 minutos, flujo 1 ml min⁻¹, detección 215 nm. (A: H₂O + 0.05% TFA, B: MeCN + 0.05% TFA).

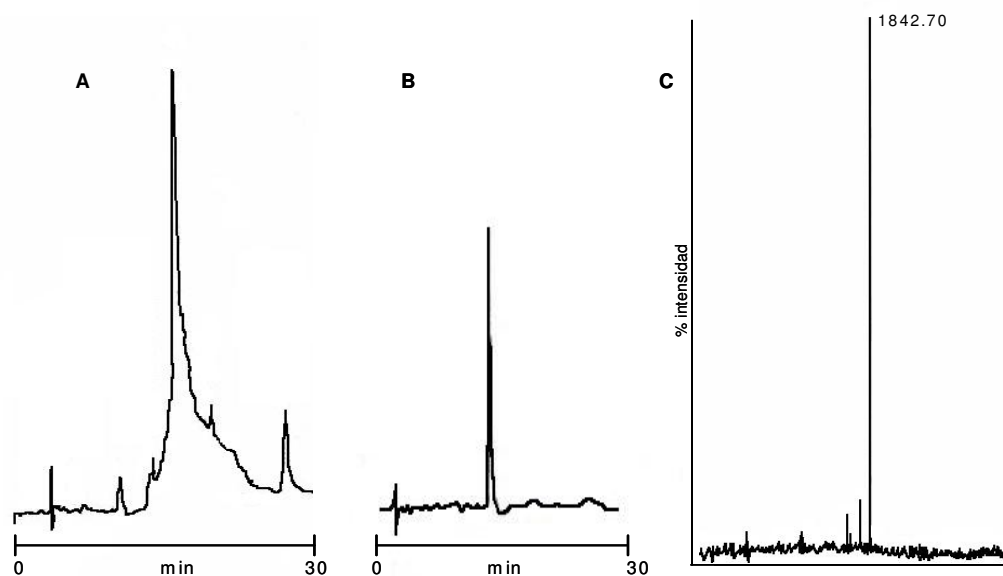


Figura 1.24. Cromatogramas del crudo peptídico (A) y del péptido cyc-CT purificado (B). Espectro de masas MALDI-TOF del péptido purificado (C). Condiciones HPLC: columna de fase reversa Kromasil® C18 (250 x 4.6 mm) 5 μ m, gradiente lineal de 95 a 65% de A en 30 minutos, flujo 1 ml min⁻¹, detección 215 nm. (A: H₂O + 0.05% TFA, B: MeCN + 0.05% TFA).

1.4 Recapitulación

En este capítulo se han diseñado distintas construcciones peptídicas para estudiar posteriormente su utilidad como antígenos en la detección de anticuerpos anti-GBV-C/HGV. Se han seleccionado regiones de las proteínas no estructurales y de la proteína de envoltura E2 del virus GBV-C/HGV.

Con la finalidad de obtener moléculas antigénicamente más activas que los péptidos lineales, además de las secuencias lineales seleccionadas, NS4a(27-43), NS4b(8-22) y NS5a(112-126) se han diseñado péptidos quiméricos lineales, Qm1 y Qm2, en los que se combinan los epítopos NS4b(8-22) y NS5a(112-126) en las dos orientaciones posibles. Por otro lado, tras realizar un estudio de la región 89-149 de la proteína de envoltura E2 se seleccionó la secuencia peptídica más antigénica contenida en esta región. Se diseñó la construcción multimérica en la que se combinan la secuencia E2(99-118) con el péptido de la proteína NS5a dando lugar a la construcción ramificada (MAP₄ E2-NS5a) formada por dos copias de cada epítipo.

Finalmente, dado el importante papel que desempeña la conformación de los péptidos en el reconocimiento por parte de los anticuerpos, se han diseñado y sintetizado dos construcciones cíclicas, cyc-HT y cyc-CT, que si bien comparten la estructura primaria de aminoácidos, difieren en el tamaño del ciclo.

La síntesis de todas las secuencias se ha llevado a cabo satisfactoriamente en el laboratorio, bien por síntesis manual o semiautomática, empleando en todos los casos la estrategia Fmoc/tBu. Todos los productos han sido purificados y han podido ser correctamente caracterizados empleando las técnicas de análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas. En el siguiente capítulo se muestran los resultados y la discusión de los mismos tras el análisis de la capacidad antigénica de todas estas construcciones sintéticas.

