

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<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> Teresa Pérez Escoda  
Barcelona, marzo 2007

## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 6. Reactivos, disolventes e instrumentación básica

### 6.1 Reactivos y disolventes

**Tabla 6.1.** Relación entre los reactivos y disolventes empleados en este proyecto y las casas comerciales donde fueron adquiridos.

Casa comercial	Reactivos y disolventes
NovaBiochem	Aminoácidos y resinas TBTU DMAP
Scharlau	N,N-Dimetilformamida Ácido acético Ácido trifluoroacético
Merck	N-Metilpirrolidona Diclorometano Éter dietílico Acetonitrilo Alcohol tert-butilo Ninhidrina Resina Amberlite MB-3 Bromuro de Litio Hidrogenocarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> ) Potasio dihidrogenofosfato (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) Di-sodio hidrogenofosfato anhidro (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) Cloruro de potasio (KCl) Sulfato de magnesio heptahidrato (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O) tris(hidroximetil)-aminometano, TRIS
	Tritón X-100
	Ácido sulfúrico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
Fluka	N,N'-Diisopropilcarbodiimida 1-Hidroxibenzotriazol Piridina DIEA Carbonato de sodio (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) carboximetildextrano sulfo-NHS 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP)
Multisyntech	Aminoácidos y resinas PyBOP
Carlo Erba	Metanol Etanol absoluto Acetona Cloruro de sodio (NaCl)
J.J. Baker	Fenol

Tabla 6.1 (continuación)

Casa comercial	Reactivos y disolventes
Sigma	Piperidina DBU Tolueno anhídrido acético 1,2-etanoditiol triisopropilsilano 2,4,6-tricloro-1,3,5-triacina (cloruro de cianurilo) Albúmina sérica bovina (BSA) docecil sulfato sódico deoxicolato de sódio Tween 20 Ácido cítrico monohidratado Dihidrocloruro de orto-fenilendiamina (OPD) Peróxido de hidrógeno 30% (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) Hepes (ácido N-[2-hidroxietil]piperacina-N'-[2-3etanolsulfónico]) Adyuvante completo de Freund Adyuvante incompleto de Freund EDC n-octil-β-D-glucopiranosido Ácido palmítico
DAKO	IgG anti-humana de conejo P0214
Caltag	IgG (γ) anti-ratón de cabra
Central lechera asturiana	leche desnatada en polvo
BIACORE	tampón HBS-EP EDC etanolamina NHS

## 6.2 Instrumentación general

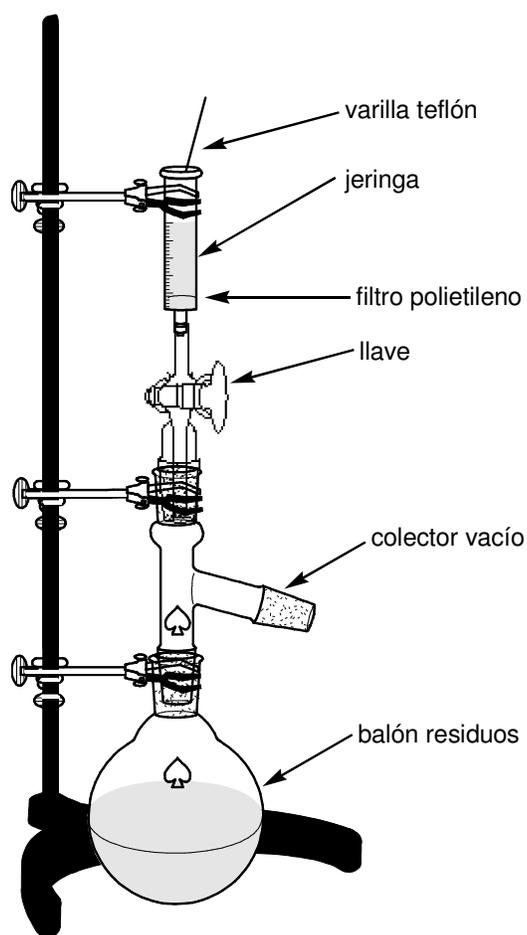
Tabla 6.2. Relación de la instrumentación general utilizada y la marca comercial.

instrumento	marca
agitadores magnéticos	Velp Scientifica 2x <sup>3</sup> ; Heidolph MR2002
balanza	Sartorius Analytic A200S
baño ultrasonidos	Selecta
centrífuga	Beckman GP.
equipo agua milli-Q	Millipore
estufa	Selecta
lector espectrofotométrico	SpectraPlus Max
liofilizadora	Lioalfa, Telstar
pHmetro	Crison
pipetas automáticas	Finnpipette (LabSystems); Biopette (Labnet)

## 7. Síntesis de péptidos en fase sólida

### 7.1 Consideraciones generales de la síntesis

La síntesis de los péptidos se realizó de manera manual en jeringas de polipropileno con un filtro de polietileno poroso. Para la agitación se utilizó una varilla de teflón. La eliminación de disolventes, reactivos y posibles subproductos formados durante el acoplamiento se realizan mediante filtración. El sistema utilizado para realizar los lavados por filtración se muestra en la Figura 7.1.



**Figura 7.1.** Esquema ilustrativo del equipo empleado para la síntesis manual de péptidos en fase sólida.

## **7.2 Tests de identificación**

### **7.2.1 Test cualitativo de Kaiser o ninhidrina**

El test cualitativo de ninhidrina, desarrollado por Kaiser [226], es el test más utilizado para determinar la presencia o la ausencia de grupos amino libres ya que se trata de un test rápido y sencillo.

Para realizar el ensayo se coge una pequeña muestra de peptidil-resina resina seca (1-2 mg) y se coloca en un tubo de vidrio. Se añaden 3 gotas de reactivo A y 3 gotas de reactivo B. A continuación se calienta el tubo en la estufa a 110°C durante 3 minutos. Pasado el tiempo se enfría y se observa la coloración que ha tomado la disolución. Una coloración amarilla indica la ausencia de aminas primarias (test negativo), lo que indica que al menos el 95% de los puntos funcionales han sido bloqueados. Por el contrario, una coloración azul-verdosa (test positivo) indica la presencia de aminas primarias. En paralelo se realiza un ensayo control que contiene la misma proporción de reactivos sin presencia de peptidil-resina. Es posible, sin embargo, que algunos aminoácidos, como la serina, el ácido aspártico o la asparagina no den la coloración azul oscuro que se espera cuando existen grupos amino libres.

Los reactivos se prepararon de la manera que se detalla a continuación:

*Reactivo A:* se preparó una disolución en caliente de fenol (40 g) en etanol absoluto (10 ml). Por otro lado, se añadieron 2 ml de una disolución de cianuro de potasio (65 mg) en agua (100 ml) sobre 100 ml de piridina. A ambas mezclas se les añadieron 4 g de resina Amberlite MB-3 y se agitaron durante 45 minutos. Seguidamente se filtraron y se mezclaron las dos disoluciones.

*Reactivo B:* se preparó una disolución de ninhidrina (2.5 g) en etanol (50 ml).

### **7.2.2 Test de cloranilo [227]**

Este ensayo se utiliza para evaluar los acoplamiento sobre aminas secundarias como la prolina. El reactivo que se utiliza es una disolución saturada de 2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona (cloranilo) en tolueno (0.75 mg en 25 ml). Para realizar el test se toma una pequeña muestra de peptidil-resina seca en un tubo (1-2 mg) y se le añaden 5 gotas de cloranilo en tolueno y 20 gotas de acetona. Se agita durante 5 minutos a temperatura ambiente. La aparición de una coloración azul-verdosa indica la presencia de aminas secundarias libres, y por tanto, un resultado positivo del test.

### 7.2.3 Test de De Clercq o del p-nitrofeniléster

El ensayo cualitativo del p-nitrofeniléster [228] permite la detección de aminas libres, sobre todo de aquellas que presentan impedimento estérico. Se recurrió a él en los casos en que el test de ninhidrina dio coloraciones dudosas, especialmente en la detección de las aminas libres de aminoácidos como serina, asparagina y ácido aspártico.

Para realizar el ensayo, se dispone una muestra de peptidil-resina (1-2 mg) en un tubo de vidrio al cual se le añaden 100  $\mu\text{l}$  de una disolución 0.02 M de p-nitrofeniléster en acetonitrilo. Después de calentar la muestra en un baño a 70°C durante 10 minutos, y una vez enfriada, se separa el sobrenadante y se lava la peptidil-resina con DMF, MeOH y DCM hasta obtener lavados incoloros. Una coloración rojiza o rosada de la peptidil-resina (test positivo) indica la presencia de aminas primarias o secundarias libres sobre el soporte sólido. La ausencia de color (test negativo) indica la ausencia de aminas libres.

## 7.3 Síntesis de péptidos en fase sólida

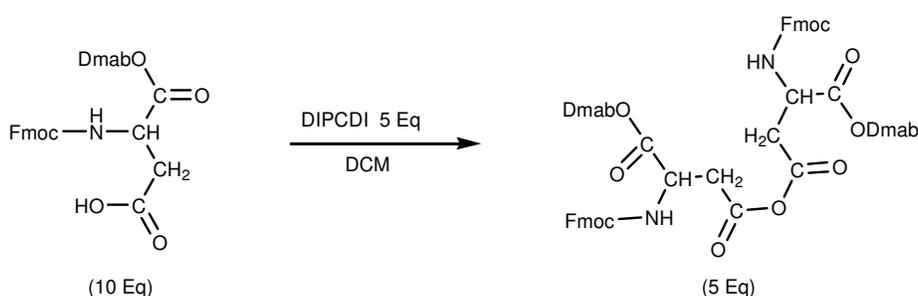
Todos los péptidos sintetizados en esta tesis se sintetizaron empleando el esquema de protección Fmoc/tBu. A continuación se detallan los procesos de las diferentes etapas que tienen lugar durante la síntesis de péptidos en fase sólida. Para la obtención de péptidos con el extremo C-terminal en forma de ácido carboxílico se utilizó la resina NovaSyn<sup>®</sup> TGA con una funcionalización inicial de 0.23  $\text{mmol g}^{-1}$  mientras que para la obtención de péptidos con el extremo C-terminal en forma de carboxiamida se utilizó la resina NovaSyn<sup>®</sup> TGR con una funcionalización inicial de 0.29  $\text{mmol g}^{-1}$ .

### 7.3.1 Incorporación del primer aminoácido. Formación del anhídrido simétrico

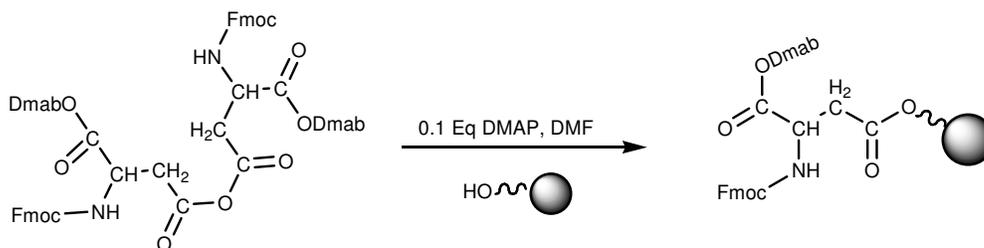
La incorporación del aminoácido C-terminal sobre la resina NovaSyn<sup>®</sup> TGR se realizó mediante la formación de un enlace amida utilizando los reactivos y condiciones de acoplamiento habituales que se describen más adelante.

Sin embargo, la incorporación del residuo C-terminal a la resina hidroxilo (NovaSyn<sup>®</sup> TGA), implica la formación de un enlace éster, a menudo un proceso difícil, que si se lleva a cabo en condiciones no controladas puede dar lugar a racemizaciones o formación de dipéptidos. Uno de los métodos más sencillos para llevar a cabo la esterificación de las resinas hidroxilo es mediante la formación del anhídrido simétrico del aminoácido (convenientemente protegido en su extremo  $\alpha$ -amino y cadena lateral) en presencia de DMAP.

Para la formación del anhídrido simétrico se disolvió el aminoácido (10 eq. respecto la funcionalización de la resina) en DCM, con 1 ó 2 gotas de DMF para completar la disolución. Se adicionaron 5 eq. de DIPCDI (respecto la funcionalización de la resina) disuelto también en DCM. Esta mezcla se dejó reaccionar por espacio de 20 minutos a 0°C en un ambiente libre de humedad que se consiguió tapando el balón con un tubo relleno de CaCl<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo se evaporó el disolvente en un rotavapor. El residuo seco obtenido se disolvió en la mínima cantidad de DMF y se adicionó a la resina. Seguidamente se adicionaron 0.1 eq. de DMAP también disuelto en DMF. Tras 1 hora de reacción a temperatura ambiente y con agitación ocasional, se eliminaron los excesos de reactivo realizando lavados con DMF y se calculó el grado de incorporación del aminoácido mediante la detección de la N-fluorenilmetilpiperidina.



**Figura 7.2.** Formación del anhídrido simétrico con Fmoc-Asp-ODmab.



**Figura 7.3.** Unión del primer aminoácido a la resina por el método del anhídrido simétrico.

### 7.3.2 Determinación del grado de unión del primer aminoácido

Este ensayo permite determinar el porcentaje de incorporación del primer aminoácido sobre la resina, y por tanto su funcionalización inicial real, aprovechando el carácter cromóforo del aducto N-fluorenilmetilpiperidina que se obtiene al liberar el grupo Fmoc con piperidina.

Para llevar a cabo este ensayo se pesó en una cubeta de cuarzo una cantidad de Fmoc-aminoácido-resina seca equivalente a 1  $\mu\text{mol}$  respecto a la funcionalización de la resina. Se le adicionaron 3 ml de una disolución de piperidina al 20% en DMF y se agitó suavemente durante 5 minutos. Paralelamente, se preparó un blanco que contenía únicamente la disolución de piperidina-DMF. Se midieron las absorbancias de las dos cubetas a la longitud de onda de 290 nm. La nueva funcionalización de la resina en  $\text{mmol g}^{-1}$  viene dada por la fórmula siguiente:

$$\text{mmol g}^{-1} = (A_{\text{muestra}} - A_{\text{referencia}}) / (1.65 \cdot \text{mg resina})$$

A continuación, se detallan las diferentes etapas de los procesos de lavado de la peptidil-resina, eliminación del grupo Fmoc e incorporación de aminoácidos.

### 7.3.3 Eliminación del grupo Fmoc

En la mayoría de los casos y de forma rutinaria se empleó la piperidina como base para liberar el grupo Fmoc. Sólo en algunos casos en que se obtuvieron test de ninhidrina dudosos, se optó por utilizar una base distinta como es el DBU.

**Tabla 7.1.** Método 1 de eliminación del grupo Fmoc (1E).

etapa	reactivos	operación	tiempo (min) x n <sup>o</sup> repeticiones
1	piperidina:DMF 2:8	eliminación grupo Fmoc	1 x 1
2	piperidina:DMF 2:8	eliminación grupo Fmoc	10 x 2
3	DMF	lavado	1 x 3
4	comprobar mediante el test de ninhidrina la presencia de grupos amino libres (test positivo)		

**Tabla 7.2.** Método 2 de eliminación del grupo Fmoc (2E).

etapa	reactivos	operación	tiempo (min) x n <sup>o</sup> repeticiones
1	piperidina:DBU:DMF 1:1:48	eliminación grupo Fmoc	1 x 1
2	piperidina:DBU:DMF 1:1:48	eliminación grupo Fmoc	10 x 2
3	DMF	lavado	1 x 3
4	comprobar mediante el test de ninhidrina la presencia de grupos amino libres (test positivo)		

### 7.3.4 Incorporación de los aminoácidos

De manera habitual, para el acoplamiento de los aminoácidos se empleó DIPCDI y HOBt como activadores del grupo carboxilo disueltos en 1-2 ml de DMF.

**Tabla 7.3.** Método 1 de acoplamiento de aminoácido (1A).

etapa	reactivos	operación	tiempo (min) x nº repeticiones
1	Fmoc-Aa(X)-OH:DIPCDI:HOBt 3:3:3 eq. en DMF	acoplamiento	90 x 1
2	DMF	lavado	1 x 3
3	comprobar mediante el test de ninhidrina la ausencia de grupos amino libres (test negativo)		

En caso en que los acoplamientos fuesen lentos o incompletos, se emplearon otros activadores más enérgicos como el PyBOP (método 2) o el TBTU (método 3) en presencia de una base.

**Tabla 7.4.** Método 2 de acoplamiento de aminoácido (2A).

etapa	reactivos	operación	tiempo (min) x nº repeticiones
1	Fmoc-Aa(X)-OH:PyBOP:HOBt:DIEA 3:3:3:6 eq. en DMF	acoplamiento	90 x 1
2	DMF	lavado	1 x 3
3	comprobar mediante el test de ninhidrina la ausencia de grupos amino libres (test negativo)		

**Tabla 7.5.** Método 3 de acoplamiento de aminoácido (3A).

etapa	reactivos	operación	tiempo (min) x nº repeticiones
1	Fmoc-Aa(X)-OH:TBTU:DIEA 3:2.9:6 eq. en DMF	acoplamiento	90 x 1
2	DMF	lavado	1 x 3
3	comprobar mediante el test de ninhidrina la ausencia de grupos amino libres (test negativo)		

A medida que la longitud de la cadena se incrementa, también aumenta el riesgo de agregación de las cadenas crecientes, dificultando todavía más los acoplamientos. En estos casos, antes de la adición del aminoácido y los agentes de condensación, se emplearon agentes cautrópicos, como son las sales de litio, que pueden contribuir a la ruptura de los puentes de hidrógeno que se hayan podido formar entre las cadenas crecientes de péptido [229].

**Tabla 7.6.** Lavado de la peptidil-resina con sales de litio.

etapa	reactivos	operación	tiempo (min) x nº repeticiones
1	DMF	lavado	1 x 3
2	LiBr 0.4 M en DMF	disgregación cadenas	20 x 1
3	DMF	lavado	1 x 3

### 7.3.5 Acetilación

En los casos en que tras varias repeticiones del acoplamiento, éste seguía siendo incompleto se procedió al bloqueo de los grupos amina que todavía quedaban libres con la finalidad de evitar la formación de cadenas de péptidos no deseados.

Para llevar a cabo la acetilación se dejó reaccionar por espacio de 30 minutos la peptidil-resina con 1 eq de anhídrido acético en presencia de 2 eq de DIEA en DMF. Una vez realizados los lavados posteriores con DMF para eliminar los restos de reactivos se comprobó la ausencia de grupos amina libres mediante el test de ninhidrina.

**Tabla 7.7.** Acetilación de los grupos amino libres.

etapa	reactivos	operación	tiempo (min) x nº repeticiones
1	Ac <sub>2</sub> O:DIEA 1:2 eq. en DMF	acetilación	30 x 1
2	DMF	lavado	1 x 3
3	comprobar mediante el test de ninhidrina la ausencia de grupos amino libres (test negativo)		

### 7.3.6 Eliminación de los grupos protectores ivDde y Dmab

El grupo ivDde utilizado para proteger la función amina de la cadena lateral de la Lys y el grupo Dmab que protege el grupo α-carboxilo del Asp se eliminaron con hidracina. En el caso del grupo Dmab, la eliminación puede ser incompleta y requiere el tratamiento de la peptidil-resina con agua para la completa eliminación del aminobencil que queda unido al Asp.

**Tabla 7.8.** Eliminación de los grupos ivDde y Dmab

etapa	reactivos	operación	tiempo (min) x n <sup>o</sup> repeticiones
1	3% hidracina monohidrato en DMF	eliminación ivDde / Dmab	1 x 1
2	3% hidracina monohidrato en DMF	eliminación ivDde / Dmab	10 x 2
3	20% agua en DMF	eliminación Dmab	10 x 2
4	20% agua en DMF	eliminación Dmab	16 horas
5	DMF	lavado	1 x 3

### 7.3.7 Tratamiento final y secado de la peptidil-resina

Una vez completada la síntesis de la secuencia peptídica, y antes de proceder al desanclaje y simultánea desprotección de las cadenas laterales de los aminoácidos, se eliminó el grupo Fmoc del aminoácido N-terminal empleando piperidina. Después se lavó la peptidil-resina con DMF. Las resinas que contienen polietilenglicol (tipo NovaSyn<sup>®</sup>) tienen tendencia a retener fuertemente DMF y la presencia de restos de base tiene efectos inhibitorios en el tratamiento acidolítico, por lo que se lavó la peptidil-resina con un ácido débil, como el ácido acético, sin riesgo de que se produjera la escisión del péptido del soporte sólido. Posteriormente se lavó con DCM y finalmente se lavó con éter o MeOH y se secó la resina aplicando vacío.

**Tabla 7.9.** Tratamiento previo a la liberación del péptido de la resina.

etapa	reactivos	operación	tiempo (min) x n <sup>o</sup> repeticiones
1	DMF	lavado	1 x 5
2	ácido acético	lavado	1 x 5
3	DCM	lavado	1 x 5
4	éter o MeOH	secado	1 x 10
5	aplicar vacío	secado	hasta peso constante

### 7.3.8 Liberación del péptido de la resina y eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos

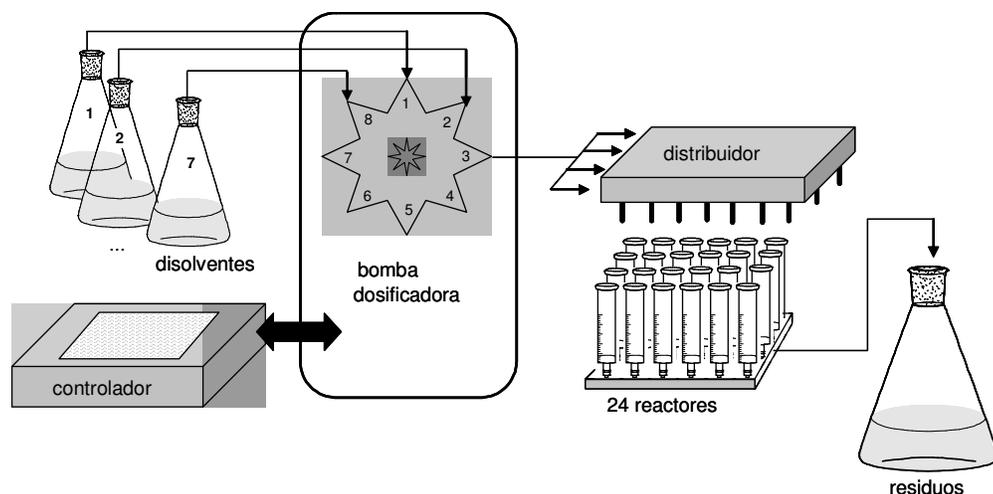
Una vez se ha completado la síntesis del péptido, éste se encuentra unido al soporte sólido con la mayoría de los aminoácidos con las cadenas laterales protegidas. La liberación del péptido de la resina y de los grupos protectores se realizó en una sola etapa en medio ácido en presencia de capturadores de carbocationes dependiendo del tipo de grupos protectores presentes en la cadena. Los capturadores de los carbocationes empleados fueron el 1,2-etanoditiol (EDT), el triisopropilsilano (TIS), y el agua. El agua actúa como agente quelante de los cationes tBu, mientras que el EDT y el TIS intervienen en la eliminación del grupo trifenilmetil de los residuos de His y Gln.

Para liberar el péptido de la resina y de los grupos protectores, se trató la peptidil-resina con una mezcla de ácido trifluoroacético (TFA), EDT, TIS y agua (94:2.5:1:2.5). El volumen de la mezcla osciló entre 2 y 5 ml, dependiendo de la cantidad de peptidil-resina a tratar. Transcurridas 3 horas de reacción, se filtró la resina para obtener el péptido en disolución. Se evaporó el TFA bajo una corriente de N<sub>2</sub>. Tras reducir el volumen de TFA un mínimo del 75% se añadió éter frío para producir la precipitación del péptido. Se centrifugó durante 5 minutos a 2500 rpm y se decantó el éter. Este proceso de lavado se repitió 10 veces. Terminados los lavados, se evaporó el éter con N<sub>2</sub> y se disolvió el residuo seco en una disolución acuosa de ácido acético al 10%. Se congeló y se liofilizó. Los péptidos, una vez liofilizados se conservaron a -20°C.

## 7.4 Síntesis semiautomática de péptidos

La síntesis de las secuencias solapadas se llevó a cabo en un sintetizador semiautomático fabricado por Multisynth GmbH. El instrumento está equipado con un bloque reactor con capacidad para 24 reactores, lo que permite la síntesis múltiple de 24 péptidos simultáneamente. La bomba incorporada permite una dosificación exacta de los disolventes y reactivos, mientras que gracias a un plato distribuidor especial, éstos son repartidos simultáneamente a todos los reactores. Dispone de un agitador que garantiza la mezcla homogénea de todos los reactivos. Una vez terminadas las reacciones, los reactores son vaciados por aplicación de vacío mediante una bomba externa controlada por el instrumento.

El sintetizador semiautomático consta, además, de un controlador externo que permite la programación de las operaciones de llenado, tiempo de reacción, intervalos de agitación de los reactores, lavados y tiempo de aplicación de vacío. La única etapa que no permite la automatización es la adición de los aminoácidos y reactivos. En la Figura 7.4 se muestra un dibujo esquemático de los componentes del instrumento.



**Figura 7.4.** Esquema ilustrativo de los componentes del instrumento semiautomático para la síntesis múltiple de péptidos en fase sólida Multisynthtech.

El protocolo seguido en la síntesis múltiple de péptidos se encuentra detallado en la Tabla 7.10. Las incorporaciones de los aminoácidos se realizaron sistemáticamente por duplicado. En el primer ciclo de incorporación se emplearon los reactivos de acoplamiento habituales (DIPCDI/HOBt), mientras que para el segundo ciclo se emplearon agentes de condensación más reactivos (PyBOP/HOBt/DIEA). Únicamente se controló el grado de incorporación del aminoácido después del segundo ciclo y solamente se llevaron a cabo los test en 2 de los 24 reactores de manera aleatoria. Finalizada la síntesis de las secuencias, las peptidil-resinas se lavaron con DMF, DCM, éter y se secaron.

La etapa de liberación y eliminación de los grupos protectores de los aminoácidos se llevó a cabo de manera manual para las 24 peptidil-resinas como se detalla en el apartado 7.3.8. Una vez obtenidos los productos, éstos fueron caracterizados por espectrometría de masas y por cromatografía líquida de alta resolución.

**Tabla 7.10.** Protocolo seguido para la incorporación de los aminoácidos en la síntesis múltiple de péptidos utilizando el sintetizador semiautomático Multisynthtech.

etapa	reactivos	operación	tiempo (min) x nº repeticiones
1	piperidina:DMF 2:8	eliminación grupo Fmoc	10 x 2
2	DMF	lavados	1 x 5
3	Fmoc-Aa(X)-OH:DIPCDI:HOBt 3:3:3 eq. en DMF	acoplamiento	120 x 1
4	DMF	lavado	1 x 5

5	Fmoc-Aa(X)-OH:PyBOP:HOBt:DIEA 1.5:1.5:1.5:3 eq. en DMF	acoplamiento	90 x 1
6	DMF	lavado	1 x 5
7	comprobar mediante el test de ninhidrina la ausencia de grupos amino libres (test negativo)		

### 7.5 Derivatización hidrófoba de péptidos: obtención de los derivados di-palmitoil

Los derivados di-palmitoil son aquellos péptidos a los que se les ha añadido dos cadenas hidrófobas de ácido palmítico ( $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$ ) en el extremo N-terminal de la secuencia.

La derivatización hidrófoba se llevó a cabo con el péptido unido a la resina y con las cadenas laterales de los aminoácidos protegidas. Para poder llevar a cabo este doble acoplamiento se incorporó a la cadena peptídica un residuo de lisina previo a la incorporación del ácido palmítico. En la Tabla 7.11 se muestra el protocolo seguido para la obtención de los derivados hidrófobos.

**Tabla 7.11.** Protocolo seguido para obtener los derivados di-palmitoil.

etapa	reactivos	operación	tiempo (min) x nº repeticiones
1	Fmoc-Lys(Fmoc)-OH:DIPCDI:HOBt 3:3:3 eq. en DMF	acoplamiento	90 x 1
2	DMF	lavado	1 x 3
3	comprobar mediante el test de ninhidrina la ausencia de grupos amino libres (test negativo)		
4	piperidina:DMF 2:8	eliminación grupo Fmoc	1 x 1
5	piperidina:DMF 2:8	eliminación grupo Fmoc	10 x 2
6	DMF	lavado	1 x 3
7	comprobar mediante el test de ninhidrina la presencia de grupos amino libres (test positivo)		
8	Ácido palmítico:DIPCDI:HOBt 6:6:6 eq. en DMF:DCM 1:1	acoplamiento	90 x 1
9	DMF	lavado	1 x 3
10	comprobar mediante el test de ninhidrina la ausencia de grupos amino libres (test negativo)		

## **7.6 Purificación de los péptidos**

Los péptidos obtenidos se purificaron por cromatografía líquida de alta eficacia hasta obtener el grado de pureza deseado para realizar tanto los ensayos de dicroísmo circular como los ensayos inmunoenzimáticos. Previa a la purificación se establecieron las mejores condiciones de elución de cada péptido a escala analítica.

Para la purificación de los péptidos se empleó un cromatógrafo Shimadzu compuesto por dos bombas modelo LC-8A, un detector SPD-10A y un sistema de inyección manual. Se emplearon, dependiendo del carácter hidrófobo del péptido, columnas de fase reversa C-8 ó C-18 con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ .

Los péptidos purificados se caracterizaron por cromatografía líquida a escala analítica, espectrometría de masas, y en algunos casos, por análisis de aminoácidos.

## **7.7 Caracterización y cuantificación de los péptidos**

La pureza de los péptidos se determinó por HPLC y por espectrometría de masas se confirmó la presencia del producto.

Se empleó un cromatógrafo Perkin-Elmer constituido por un sistema binario de bombas LC-250, un detector Diodo Array LC-235 e inyector manual. Se utilizaron columnas de fase reversa Kromasil<sup>®</sup> C-8 o C-18 de 25 x 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$  (Tecnokroma). Los péptidos se eluyeron a un flujo de 1 ml min<sup>-1</sup> y un gradiente lineal de los disolventes A y B (A: agua con un 0.05% de TFA; B: MeCN con un 0.05% de TFA). La detección se realizó a 215 y 280 nm.

### **7.7.1 Espectrometría de masas**

La masa molecular de los péptidos sintetizados se determinó por espectrometría de MALDI-TOF o electrospray. Los análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF se realizaron en el Servicio de Espectrometría de Masas de la Facultad de Químicas de la Universidad de Barcelona, mientras que los análisis de espectrometría de masas por electrospray fueron realizados por el Servicio de Espectrometría de Masas del IIQAB del CSIC.

### **7.7.2 Análisis de aminoácidos**

Para la cuantificación de los péptidos purificados se realizó el análisis de aminoácidos. Estos ensayos fueron realizados en servicio de Análisis de Aminoácidos de la Facultad de Químicas de la Universidad de Barcelona. Para realizar los análisis, las muestras se sometieron a una hidrólisis con HCl 6N con un 1% de fenol durante 1 hora a 155°C.

## 8. ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO: ELISA

### 8.1 Disoluciones tamponadas

#### Tampón de unión

Tampón carbonato/bicarbonato 0.05 M pH 9.6.

Tampón fosfato 0.2 M pH 7.0.

#### Tampón de bloqueo

Tampón carbonato/bicarbonato 0.05 M con un 3% de leche en polvo.

#### Tampón de lavado: PBS-T

Tampón fosfato salino (PBS) con un 0.05% v/v de Tween 20. Se utilizó un PBS 0.15 M pH 7.2 compuesto de las sales NaCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaHPO}_4$ , KCl, disueltas en agua milli-Q.

#### Tampón de lavado CovaBuffer

Compuesto de tampón PBS 0.15 M pH 7.2 al que se le han añadido NaCl 2 M y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  40 mM.

#### Tampón de dilución de las muestras y conjugado enzimático

El tampón de dilución de las muestras y del conjugado enzimático está compuesto por tampón PBS-T con un 3% de leche en polvo.

#### Tampón de dilución del sustrato enzimático

Tampón citrato-fosfato 0.1 M a pH 5.0. Compuesto por ácido cítrico monohidratado y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .

### Disolución de cromógeno y sustrato

Al tampón citrato-fosfato se le añadió un 4% de cromógeno, dihidrocloruro de orto-fenilendiamina (OPD), y justo antes de su utilización, se le añadió el sustrato, 4% de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

## **8.2 Sueros**

Se estudió un primer panel de 100 sueros procedentes de pacientes diagnosticados de hepatitis crónica, proporcionados por el Servicio de Inmunología del Hospital Clínico de Barcelona. El segundo panel de sueros estudiado estaba constituido también por 100 sueros de pacientes sometidos a tratamientos de hemodiálisis. Parte de estos sueros fueron cedidos por el Instituto de Hemodiálisis de Barcelona y parte se obtuvieron del Servicio de Inmunología del Hospital Clínico de Barcelona. 35 sueros de cada panel fueron testados por el test comercial anti-HGV<sub>env</sub> de los laboratorios Roche Diagnostics GmbH. Este test, que ya no se encuentra disponible en el mercado, estaba basado en la proteína de envoltura E2 recombinante.

Para determinar el punto de corte o *cut-off* a partir del cual se consideraron positivas las muestras, se analizaron 80 sueros procedentes de donantes voluntarios sanos.

También se analizó la presencia de anticuerpos anti-GBV-C/HGV en un panel de sueros infectados con el virus HIV. En total se estudiaron 164 sueros procedentes del Servicio de microbiología del Hospital de Bellvitge. Del mismo hospital procedían las 46 muestras de donantes voluntarios que se utilizaron como controles negativos en el mismo estudio.

## **8.3 Protocolo de ELISA no competitivo**

### **8.3.1 Unión de los péptidos a las microplacas de microensayo**

#### 8.3.1.1 Unión a través de los grupos amino del péptido. Microplacas Covalink NH™

Para unir los péptidos a la superficie de la placa Covalink NH a través de sus grupos amino, debe activarse previamente la placa antes de añadir la disolución de péptido. Se preparó una disolución de 16 mg ml<sup>-1</sup> de cloruro de cianurilo en acetona. Esta disolución es estable durante una semana. A esta disolución se le añadieron 15 ml de tampón fosfato 0.2 M. Esta disolución es muy inestable y debe utilizarse dentro de los cinco minutos posteriores a su preparación. Se añadieron 100 µl de esta disolución en cada pocillo y se incubaron las placas durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se lavaron las placas tres veces con tampón fosfato. La disolución

madre de péptido se diluyó en tampón carbonato/bicarbonato 0.05 M pH 9.6 hasta las concentraciones deseadas, 5, 10 y 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de la disolución de péptido a cada pocillo y se incubaron las placas toda la noche a temperatura ambiente en un agitador orbital. Terminada la incubación, se hicieron tres lavados de 5 minutos cada uno con tampón CovaBuffer.

#### 8.3.1.2 Unión a través de los grupos carboxilo del péptido. Microplacas Covalink NH™

En este caso, para unir el péptido a la microplaca, deben activarse los grupos carboxilo del péptido. Éstos pueden ser tanto el grupo carboxilo C-terminal como los grupos carboxílicos de las cadenas laterales de los residuos de ácido aspártico o glutámico. Mediante este método se consigue establecer un enlace amida entre el grupo ácido y la amina secundaria de la superficie de la placa. Para llevar a cabo la reacción se empleó una carbodiimida soluble en agua (EDC) para activar el grupo carboxílico en presencia de sulfo-N-hidroxisuccinimida (sulfo-NHS). La sulfo-NHS evita la pérdida de péptido activado por hidrólisis. La disolución acuosa de EDC debe ser preparada recientemente para evitar la hidrólisis de la carbodiimida.

A partir de la disolución madre, se prepararon las diluciones de péptido el doble de concentradas de las deseadas para ensayar: 10, 20 y 40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . En cada pocillo se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de la disolución diluida de péptido, 50  $\mu\text{l}$  de una disolución acuosa de sulfo-NHS 0.8 mM y, finalmente, 50  $\mu\text{l}$  de una disolución acuosa de EDC 6.4 mM. Las placas se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente en un agitador orbital. Una vez terminado el periodo de incubación se lavaron las microplacas tres veces con tampón de lavado CovaBuffer.

#### 8.3.1.3 Unión a través de los grupos amino del péptido. Microplacas DNA-Bind™

En la unión de los péptidos a las microplacas Costar intervienen los grupos amino primarios de los péptidos. A partir de una disolución madre de péptido de 1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  se prepararon las diluciones en el tampón de unión. Los péptidos se diluyeron hasta concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de la disolución de péptido en cada pocillo. En los pocillos control que no contenían péptido se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de tapón bloqueo. Las microplacas se incubaron tapadas toda la noche (aproximadamente 16 horas) a 4°C. Transcurrido este tiempo se vaciaron los pocillos antes de llevar a cabo el bloqueo.

### **8.3.2 Bloqueo de los lugares no saturados**

Para evitar que moléculas no específicas se unan a la fase sólida es recomendable añadir alguna proteína irrelevante que se una a la fase sólida en lugares donde los componentes del sistema de detección podrían unirse inespecíficamente. La vía más sencilla para conseguir la inactivación es añadir a los pocillos una gran concentración de moléculas que contengan grupos amino reactivos, e incubar. Existen distintas disoluciones que pueden funcionar como agentes bloqueantes, y entre las más utilizadas están la caseína presente en la leche o la albúmina bovina sérica diluidas en una disolución tampón de pH básico.

Para bloquear los posibles lugares activos se añadieron 300  $\mu$ l de tampón bloqueo en cada pocillo de la microplaca. Éstas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda. Transcurrido el tiempo se vaciaron los pocillos.

### **8.3.3 Reacción con el inmunoreactivo soluble**

Los sueros se diluyeron 50 y 100 veces en tampón PBS-T con un 3% de leche en polvo. Se añadieron 100  $\mu$ l en cada pocillo. Se incubaron las microplacas durante dos horas a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda.

### **8.3.4 Lavados**

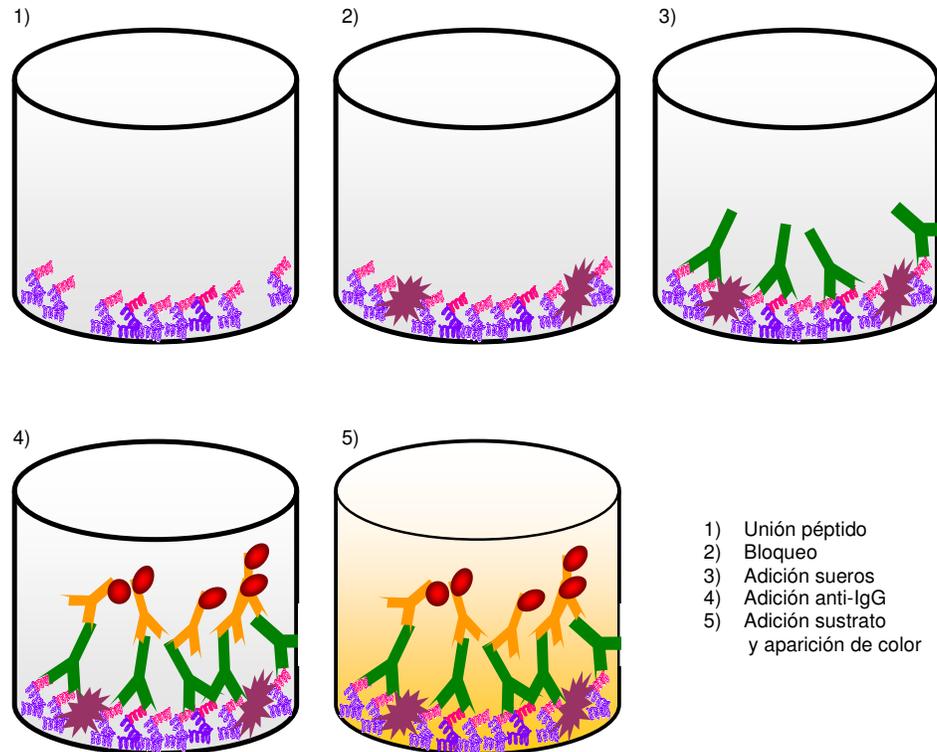
Después de cada etapa del ensayo de ELISA se realizó un proceso de lavado de la microplaca, con la finalidad de detener la reacción que está teniendo lugar a la vez que se eliminan los reactivos que no han intervenido en la reacción. Estos lavados se realizaron seis veces con tampón PBS-T.

### **8.3.5 Reacción con el conjugado enzimático**

Este conjugado consta de dos partes unidas covalentemente: una de ellas inmunoreactiva, por donde se fijará a la sustancia problema; y otra de ellas enzimática, que, mediante su actividad para degradar el sustrato, facilitará la visualización de la reacción que ha tenido lugar en la fase sólida. Las enzimas más comúnmente utilizadas en ELISA son la peroxidasa de rábano picante (HRP, del inglés horseradish peroxidase), la fosfatasa alcalina y la  $\beta$ -galactosidasa.

En todos los ensayos de ELISA realizados en este trabajo, se empleó como anticuerpo de detección una anti-inmunoglobulina G (anti-IgG) humana de conejo conjugada a peroxidasa. Se

diluyó la anti-IgG 1000 veces en tampón PBS-T con un 3% de leche en polvo y se añadieron 100  $\mu$ l en cada pocillo. Se incubaron las microplacas durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Transcurrido este tiempo se realizó una etapa de lavado.



**Figura 8.1.** Esquema en el que se representan las diferentes etapas del ensayo de ELISA indirecto.

### 8.3.6 Adición del sustrato enzimático

Para visualizar la reacción antígeno-anticuerpo, se añade un sustrato que en presencia del enzima se hidrolizará y dará lugar a un producto coloreado. El color se podrá valorar con un lector de microplacas de ELISA.

En este caso, la peroxidasa de rábano, cataliza la reacción de la reducción del peróxido de hidrógeno con la consiguiente oxidación de un cromógeno. Los cromógenos más empleados para la HRP son el dihidrocloruro de orto-fenilendiamina (OPD), la tetrametilbencidina, el ácido 5-aminosalicílico y el ácido 2,2'-acino-di(3-etil)benzotiazolin sulfónico. Una vez aparecido el color, se detendrá la reacción enzimática añadiendo ácido sulfúrico diluido.

Se añadieron 100  $\mu$ l de la disolución de sustrato y cromógeno en cada pocillo. Se incubaron las microplacas durante 30 minutos en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, se detuvo la reacción

enzimática añadiendo 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico 2N a cada pocillo. Posteriormente se procedió a la lectura de la microplaca en un lector espectrofotométrico a 492 nm. En este ensayo no competitivo la cantidad de color es proporcional a la concentración de anticuerpo de la muestra problema.

### **8.3.7 Protocolo de ELISA para el análisis de las muestras de suero infectadas por HIV**

El protocolo del ensayo de ELISA utilizado para el análisis de los sueros infectados por HIV fue similar al que se ha descrito, únicamente se variaron dos de los tampones empleados. Como tampón de bloqueo se utilizó una disolución de carbonato/bicarbonato 0.05 M al que se le añadió un 2% de BSA en lugar de utilizar la leche en polvo. Por otro lado, el tampón de dilución de las muestras y del conjugado enzimático también fue distinto en este caso. En lugar de utilizar el tampón PBS-T-leche, se utilizó tampón RIA compuesto por NaCl 350 mM, TRIS 10 mM, 1% BSA, 0.5% deoxicolato sódico, 0.1% dodecilsulfato sódico y un 1% Tritón X-100, disuelto en agua milli-Q. Para la dilución de las muestras de suero, el tampón RIA se suplementó con un 10% de suero bovino fetal.

## **8.4 Control de los ensayos**

Con la finalidad de asegurar la validez de los experimentos, en cada microplaca se incluyeron pocillos control. En unos pocillos se incluyeron todos los reactivos excepto las muestras de suero para poder evaluar la absorbancia residual producida por los reactivos. En otros pocillos se incluyeron todos los reactivos a excepción de los péptidos para poder evaluar así las reacciones no específicas entre las proteínas de la leche de vaca y los sueros analizados. También se incluyeron en las microplacas un suero con reactividad positiva frente a los péptidos (control positivo) y suero que no presentara ningún tipo de reactividad frente a los péptidos (control negativo). Y por último, a modo de control negativo, todas las microplacas contenían un péptido irrelevante para el virus GBV-C/HGV para poder controlar así la especificidad de las interacciones péptido-anticuerpo. Todas las medidas se realizaron por duplicado.

## **8.5 Estimación del punto de corte**

El valor del punto de corte (*cut-off*, CO) para cada uno de los péptidos que permitió diferenciar un suero negativo de uno positivo se estableció como el promedio de los valores de absorbancia de los sueros procedentes de donantes voluntarios más dos desviaciones estándar. Sueros con señales de absorbancia por encima de este valor fueron considerados positivos. En las gráficas se muestra el valor de absorbancia dividido entre el valor del punto de corte para poder comparar mejor los

resultados. Los sueros se consideraron positivos cuando el valor resultante de dividir la absorbancia entre el punto de corte fue igual o mayor que 1.

## 8.6 Tratamiento estadístico de los datos

Las reactividades de cada construcción peptídica con los diferentes paneles de sueros así como las reactividades de los péptidos obtenidas empleando las diferentes estrategias de unión de los péptidos a las placas de microensayo fueron comparadas empleando el test *t*. Para los cálculos se empleó el software Prism 4.0. Valores de probabilidad menores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

Para elaborar curvas ROC, se empleó el software MedCalc® v 8.0. El programa permite el cálculo del área bajo la curva (AUC) que es el parámetro más utilizado como indicador de rendimiento diagnóstico. El mismo software permite realizar la comparación de las áreas de distintas curvas ROC. Comparar el área bajo la curva ROC obtenida para cada péptido puede ayudar a seleccionar cual de los péptidos estudiados es el más preciso y exacto para el diagnóstico de la infección por el virus GBV-C/HGV. Cuanto mayor sea al área bajo la curva, mayor utilidad diagnóstica del péptido, además es conveniente que las diferencias entre las áreas sean estadísticamente significativas. Si el péptido es completamente indiscriminativo, la curva coincidirá con una línea recta que se corresponderá con una sensibilidad y una especificidad del 50%. Una prueba diagnóstica perfecta tendría un área bajo la curva de 1. Pruebas muy precisas tienen valores de área mayores que 0.9 y las moderadamente precisas valores de área entre 0.7-0.9.

## 8.7 Protocolo de ELISA indirecto para el análisis de las muestras de suero de ratón

### 8.7.1 Adsorción de los péptidos a las microplacas

Los lipopéptidos se diluyeron hasta concentraciones de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  en tampón carbonato/bicarbonato 0.05 M pH 9.6 con un 1% de DMSO para facilitar la disolución. Como control negativo se utilizó ácido palmítico diluido en las mismas condiciones. Se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de la disolución de lipopéptido y ácido palmítico en los pocillos. Se utilizaron placas de microensayo Maxisorp® F de 96 pocillos. Las microplacas se incubaron tapadas toda la noche (aproximadamente 16 horas) a temperatura ambiente en el interior de una cámara húmeda. Transcurrido este tiempo se vaciaron los pocillos y se lavaron con tampón PBS pH 7.2 tres veces.

### **8.7.2 Bloqueo de los lugares no saturados**

Para bloquear los posibles lugares activos se añadieron 300  $\mu$ l de tampón bloqueo en cada pocillo de la microplaca. Las placas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda. Transcurrido el tiempo se vaciaron los pocillos y se lavaron las placas tres veces con tampón de lavado (PBS-T).

### **8.7.3 Reacción con el inmunoreactivo soluble**

Los sueros de los ratones se diluyeron 100 y 200 veces en tampón PBS-T con un 3% de leche en polvo. Se añadieron 100  $\mu$ l en cada pocillo. Se incubaron las microplacas durante dos horas a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda. Transcurrido este tiempo se lavaron las microplacas tres veces con tampón de lavado.

### **8.7.4 Reacción con el conjugado enzimático**

En todos los ensayos de ELISA realizados con sueros de ratón, se empleó como anticuerpo de detección una anti-inmunoglobulina G (anti-IgG) de ratón procedente de cabra y conjugada a peroxidasa (Caltag). Se diluyó la anti-IgG 1000 veces en tampón PBS-T con un 3% de leche en polvo y se añadieron 100  $\mu$ l en cada pocillo. Se incubaron las microplacas durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Transcurrido este tiempo se realizaron tres lavados con tampón de lavado.

### **8.7.5 Adición del sustrato enzimático**

Como ya se ha comentado en el apartado 8.3.6 de esta memoria, la peroxidasa de rábano, cataliza la reacción de la reducción del peróxido de hidrógeno con la consiguiente oxidación de un cromógeno. Se añadieron 100  $\mu$ l de la disolución de sustrato y cromógeno en cada pocillo. Se incubaron las placas durante 30 minutos en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, se detuvo la reacción enzimática añadiendo 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico 2N a cada pocillo. Posteriormente se procedió a la lectura de la microplaca en un lector espectrofotométrico a 492 nm. En este ensayo no competitivo la cantidad de color es proporcional a la concentración de anticuerpo de la muestra problema.

## 9 Dicroísmo circular y espectroscopia de infrarrojo por la transformada de Fourier

### 9.1 Instrumentación

Las medidas dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro Jasco 810 equipado con un Peltier que permite mantener las cubetas termostatzadas. Se emplearon cubetas de cuarzo de 1 mm de paso óptico y 300  $\mu$ l de volumen. (Hellma).

Para las medidas de espectroscopia de infrarrojo se utilizó un espectrómetro de infrarrojo por la transformada de Fourier Bomen MB-120. Se utilizaron celdas de fluoruro de calcio.

### 9.2 Dicroísmo circular

#### 9.2.1 Condiciones experimentales

Para todas las medidas de CD se mantuvieron constantes los siguientes parámetros:

Temperatura	5°C
Ancho de banda	1.0 nm
Tiempo de respuesta	4 s
Rango de longitud de onda	190-260 nm
Resolución	0.2 nm
Velocidad de barrido	10 nm min <sup>-1</sup>
Número de acumulaciones	3

#### 9.2.2 Preparación de las muestras

Los péptidos, con una pureza superior al 95%, se disolvieron en agua milli-Q. La concentración exacta de cada péptido se determinó espectrofotométricamente a 280 nm utilizando los coeficientes de extinción molar de los aminoácidos aromáticos y aplicando la ley de Lambert-Beer. En el caso del péptido NS4b(8-22), que no contiene ningún aminoácido aromático, la concentración se determinó por análisis de aminoácidos. Las disoluciones madre de los péptidos fueron diluidas justo antes de realizar las medidas en tampón Hepes 5 mM pH 7.4 hasta tener concentraciones comprendidas en un rango entre 30 y 60  $\mu$ M, que fueron las utilizadas en los análisis de CD.

Para los análisis de las muestras en presencia de agentes estructurantes, TFE y HFIP, la disolución madre de péptido se diluyó en el volumen requerido de tampón HEPES y alcohol halogenado para obtener porcentajes de TFE ó HFIP de 25, 50 y 75%.

Con la finalidad de eliminar el ruido de fondo, antes de cada análisis se realizó un blanco, compuesto por las mismas proporciones de disolvente que la muestra a estudiar pero sin el péptido, que se restó al espectro obtenido de la muestra.

### **9.2.3 Procesado de los espectros**

El equipo de espectroscopia Jasco-810 está controlado por el software Spectra Manager™. Este software, además de controlar la adquisición de los espectros, permite realizar el suavizado, sustraer la línea de base, etc. Todos los resultados están expresados en términos de elipticidad molar ( $\theta$ , mdeg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>).

Se cuantificó el porcentaje de estructura secundaria ( $\alpha$ -hélice, lámina  $\beta$ , giro  $\beta$  y “random coil” o estructura desordenada) utilizando programas informáticos de deconvolución (Contin y K2D) a través del servidor Dichroweb [230]. Además, se calculó la elipticidad empleando los formalismos de Yang [160].

## **9.3 Espectroscopia de de infrarrojo**

### **9.3.1 Condiciones experimentales**

Para las medidas de FT-IR se utilizaron celdas de CaF<sub>2</sub> separadas por un espaciador de 100  $\mu$ m. Para cada muestra se realizaron 50 escaneados y se trabajó con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>.

### **9.3.2 Preparación de las muestras**

Los péptidos se disolvieron en D<sub>2</sub>O hasta obtener la concentración de 1.3 mM, que fue la empleada en los análisis. Para los análisis en presencia de agente estructural la dilución de péptido se mezcló con el volumen requerido de agente estructurante para obtener porcentajes de alcohol halogenado de 25, 50 y 75%. A cada espectro obtenido se le restó el espectro de referencia correspondiente obtenido al medir una disolución igual a la muestra pero sin péptido.

### 9.3.3 Procesado de los espectros

Los datos obtenidos fueron procesados utilizando el programa PeakFit versión 4 (AISN Software Inc.).

La asignación de las señales se llevó a cabo utilizando los datos de absorbancia correspondientes a la zona comprendida entre 1600 y 1700  $\text{cm}^{-1}$ . En primer lugar se suavizaron los espectros mediante una función de filtrado de ruido tipo Savitzky-Golay. El análisis de la segunda y la cuarta derivada de la curva muestran los valores máximos de las componentes individuales de la curva.

Tras aplicar una corrección de la línea base tipo lineal D2, se fijan los valores de cada componente según los valores máximos obtenidos mediante el análisis de la segunda derivada (utilizando los valores obtenidos con la cuarta derivada para corroborar éstos). El tipo de curva utilizado para las componentes es de tipo Gaussiano. Los restantes parámetros se calculan automáticamente mediante sucesivas iteraciones del programa utilizando el método del mínimo cuadrado. Una vez alcanzada una solución adecuada (el sistema converge al obtener un resultado gráfico correcto, con valores de  $r^2 \geq 0.99$ ) se elimina la restricción impuesta sobre los valores centrales de las componentes y se itera nuevamente hasta converger, siendo éste el resultado final (se da el resultado como válido si los valores de las componentes son iguales a los estimados previamente  $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ) [167].

## 10. Tecnología de resonancia del plasmón de superficie

### 10.1 Instrumentación

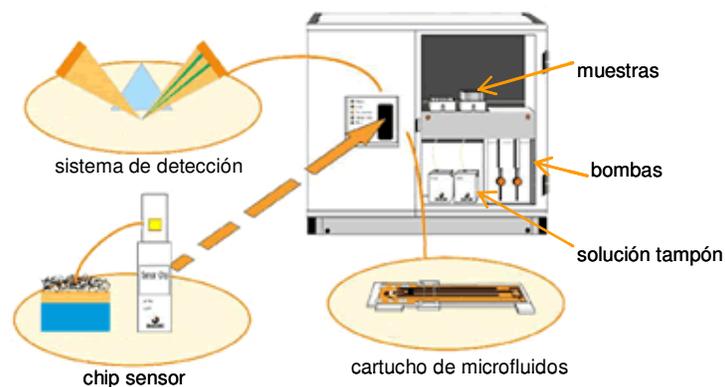
Los análisis de las interacciones bioespecíficas en tiempo real basados en la resonancia del plasmón de superficie se realizaron en dos modelos de instrumentos BIAcore. Los ensayos en los que se emplearon los chips sensores HPA para estudiar la capacidad inmunogénica de los lipopéptidos sintetizados (Capítulo 5) se realizaron en un instrumento BIAcore™ 1000. Los ensayos en los que los péptidos seleccionados se unieron covalentemente a los chips CM5 para analizar su capacidad para reconocer anticuerpos anti-GBV-C/HGV presentes en muestras de sueros humanos se llevaron a cabo tanto en un instrumento BIAcore™ 1000 como en un BIAcore™ T100. Las unidades de proceso para ambos instrumentos son las mismas y se detallan a continuación:

- El chip sensor, extraíble.
- Dos bombas dispensadoras de líquidos, una de ellas para mantener el flujo constante de tampón sobre el chip y la otra para transferir, diluir, mezclar e inyectar las muestras.
- Un inyector de muestras, para inyecciones pre-programadas incluyendo mezclado e inyección a la unidad de detección así como la recuperación de la muestra.

- Un cartucho integrado de microfluidos. Éste consiste en una serie de canales y válvulas neumáticas encastadas en un estuche de plástico, y sirve como control de la dispensación de líquidos sobre la superficie del chip sensor. Las muestras se inyectan desde el inyector al cartucho de microfluidos, conectado directamente sobre las celdas de flujo del chip.
- Una unidad de detección, que incluye los componentes ópticos y electrónicos para la detección de la señal de resonancia en el plasmón de superficie.
- Cuatro celdas de flujo, formadas por la presión del cartucho de microfluidos sobre el chip sensor.
- Microprocesadores para controlar las bombas, el inyector y las válvulas del cartucho de microfluidos, así como para procesar la señal de SPR.

El chip se inserta en la unidad de detección y encaja en el instrumento formando uno de los lados de la celda de flujo del detector. El cartucho de microfluidos está conectado al inyector a través de un bloque conector. Este bloque consta de un puerto de inyección para cargar las muestras y un puerto para la recuperación de éstas. Los microprocesadores se controlan desde un software de control.

La diferencia más destacable entre los instrumentos BIAcore™ 1000 y BIAcore™ T100 en cuanto al análisis de las muestras, es que éste último permite que con una única inyección, la muestra circule de manera secuencial por las cuatro celdas que se forman en el chip sensor, mientras que debido a la posición de éstos en el BIAcore™ 1000, ésta opción no es posible y se debe inyectar la muestra cuatro veces, lo que conlleva que se consuma un volumen cuatro veces superior de la muestra a analizar.

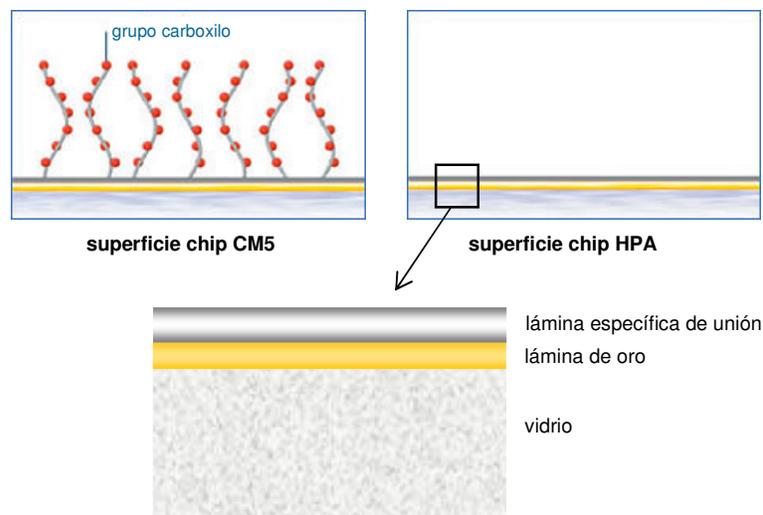


**Figura 10.1** Configuración del detector de resonancia de plasmón superficial, chip sensor y la unidad de microfluidos en el sistema BIAcore.

### 10.1.1 Chips sensores

El chip sensor se inserta en el instrumento con su superficie biosensora en contacto con las celdas de flujo. La superficie biosensora está compuesta por tres láminas: una de vidrio, otra de oro y una lámina que queda expuesta cuya composición varía dependiendo del tipo de chip. La lámina de oro queda en contacto con el prisma de vidrio siendo iluminada por la luz polarizada. El chip se encuentra unido a un soporte de poliestireno y protegido dentro de una vaina de plástico que se retira al ser insertado en el instrumento. En este proyecto se han llevado a cabo experimentos con dos tipos distintos de chips.

- *Chip sensor CM5*. La lámina de oro en estos chips está recubierta por dextrano carboximetilado sobre el que se pueden unir biomoléculas de forma covalente mediante distintos métodos químicos. El enlace más ampliamente utilizado es la formación de un enlace amida entre los grupos carboxilo de la superficie del chip y los grupos amina de la molécula a inmovilizar. Otros métodos de unión no tan extensamente utilizados son la unión mediante grupos tiol o aldehído.
- *Chip sensor HPA*. En este chip la lámina de oro se encuentra recubierta por moléculas de alcano tiol de cadena larga, lo que convierte la superficie del chip en una superficie muy hidrófoba de manera que se facilita la adsorción de monocapas de lípidos para el análisis de interacciones en las que se ven envueltas los lípidos.



**Figura 10.2.** Ilustración de la superficie de los chips sensores CM5 y HPA.

Un chip sensor puede utilizarse para varias medidas, normalmente entre 50 y 100 ciclos dependiendo de las propiedades del ligando inmovilizado y de las condiciones de regeneración, y puede permanecer en la unidad de proceso más de una semana. Una vez retirado, puede volver a insertarse posteriormente para realizar otros experimentos.

## **10.2 Unión covalente de los péptidos al chip sensor CM5. Formación de enlaces amida**

### **10.2.1 Preparación de las muestras**

Como tampón de flujo del sistema se utilizó HBS-EP cuya composición es Hepes 10 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3.4 mM y 0.05% de surfactante P20.

Los péptidos se diluyeron en una disolución 10 mM de acetato sódico. El pH de esta disolución varió dependiendo del punto isoeléctrico del péptido a inmovilizar. Para favorecer la unión, la matriz debe estar cargada negativamente, mientras que el péptido debe tener carga positiva, de este modo, se facilita la atracción electrostática para que pueda darse la unión. Para que esto suceda es recomendable trabajar con disoluciones que tengan un pH por debajo del punto isoeléctrico (pI) de la molécula que se desea unir. Puede hacerse una estimación preliminar si se conoce el punto isoeléctrico de la molécula a inmovilizar, según la siguiente regla:

- moléculas con un  $pI > 7$  → trabajar con disoluciones de pH 6.
- moléculas con un  $pI$  5.5-7 trabajar con disoluciones de pH 1-2 unidades por debajo del  $pI$ .
- moléculas con  $pI$  3.5-5.5 trabajar con disoluciones de pH 0.5 unidades por debajo del  $pI$ .

Los reactivos utilizados para activar los grupos carboxilos de la matriz de dextrano fueron N-hidroxisuccinimida (NHS) 0.05 M en agua y clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) 0.2 M en agua.

Para desactivar los grupos carboxilo que no habían reaccionado con los grupos amina del péptido, se empleó una disolución de etanolamina 1M de pH 8.5. Todos estos reactivos fueron adquiridos en BIAcore.

Se utilizó NaOH 100 mM como disolución regeneradora después de cada ciclo de análisis de una muestra de suero.

Todas las disoluciones utilizadas en BIAcore fueron filtradas a través de filtros de 0.22 micras y desgasadas. Todos los experimentos se realizaron a 25°C.

### 10.2.2 Protocolo de unión

Para que la inmovilización del péptido sobre la superficie del chip fuera óptima, antes de activar la superficie sensora, se realizaron estudios de preconcentración a distintas concentraciones de péptido diluido en disoluciones de acetato sódico con distintos pH. Las condiciones en que la unión electrostática dio mejores niveles de unión fueron las que se emplearon posteriormente en la inmovilización.

En todos los chips, uno de los canales se utilizó como canal control. En este canal, se realizaron las operaciones de activación y desactivación de la matriz, pero no se hizo circular ningún péptido.

**Tabla 10.1.** Protocolo seguido para inmovilizar los péptidos en los chips sensores CM5.

etapa	operación	reactivos
0	estudios preconcentración	péptido a distintas concentraciones y a distintos pH
	inmovilización del péptido en el chip CM5	
1	activación superficie	NHS 0.05 M: EDC 0.2 M 1:1
2	unión del péptido	péptido a concentración y pH óptimos
3	desactivación superficie	etanolamina 1M
4	eliminación restos de reactivos no unidos	NaOH 100 mM

### 10.2.3 Análisis de los sueros

Las muestras de suero que se analizaron empleando la SPR fueron las mismas que las utilizadas en ELISA. Tanto las características de los sueros como su procedencia están detalladas en el apartado 8.2 de esta memoria.

Para diluir las muestras de suero se utilizó el tampón HBS-EP, que es el tampón de flujo del sistema, al que se añadió un 0.1% de carboximetildextrano. Las diluciones de suero estudiadas fueron de 1/50, 1/100 y 1/200. El tiempo de contacto de la muestra de suero con el péptido fue de 20 minutos a un flujo de  $10 \mu\text{l min}^{-1}$ .

La señal de resonancia (respuesta absoluta en RU) se registró continuamente durante la circulación de la muestra. Posteriormente, a cada muestra se le restó la señal obtenida por ella al circular sobre el canal control (activado y desactivado). Una vez restadas las curvas, la diferencia entre las señales ópticas medidas antes y después de la inyección del suero se relacionó con la cantidad de anticuerpos anti-GBV-C/HGV unidos al péptido inmovilizado en la matriz.

### 10.3 Adsorción de los lipopéptidos al chip sensor HPA

En este caso, el protocolo de trabajo fue distinto al utilizado cuando se trabajó con los chips CM5. En los HPA, solo se pueden adsorber moléculas a la superficie que son fácilmente eliminadas con unos lavados. En cada análisis se preparó la superficie del chip “*de novo*” y ésta se eliminó una vez analizado el suero.

En primer lugar, se debe preparar la monocapa de la molécula que se utiliza como antígeno, en este caso los lipopéptidos. Seguidamente, se inyecta la muestra a analizar, en este caso los sueros, debidamente diluidos. Una vez finalizada la inyección de ambas disoluciones, debe limpiarse la superficie del chip, con la finalidad de eliminar, tanto el suero, como la monocapa de lipopéptido, y dejar la superficie del chip limpia y lista para el siguiente análisis.

#### 10.3.1 Preparación de las muestras

Como tampón de flujo del sistema se utilizó tampón fosfato 20 mM. Para trabajar correctamente con estas superficies hidrófobas es muy importante trabajar con muestras y disoluciones que no contengan ningún resto de detergente, ya que la presencia de éste dificultaría la adsorción de las moléculas lipídicas a la superficie del chip sensor. Antes de iniciar un ciclo de análisis, ésta se limpió inyectando una disolución de n-octil- $\beta$ -D-glucopiranosido 40 mM en agua.

Tanto los lipopéptidos como los sueros se diluyeron en el tampón de flujo del sistema, tampón fosfato 20 mM. Para eliminar posibles multicapas de lipopéptido sobre la superficie del chip éstos se lavaron a flujos elevados con disoluciones de gran fuerza iónica, como el NaOH. La temperatura de trabajo fue en todos los experimentos de 25°C.

#### 10.3.2 Formación de las monocapas

Una vez insertado el chip dentro del sistema, se seleccionó un canal de trabajo sobre el que se hicieron circular 25  $\mu$ l de la disolución de n-octil- $\beta$ -D-glucopiranosido 40 mM a un flujo constante de 5  $\mu$ l  $\text{min}^{-1}$ . A continuación, la inyección del lipopéptido se realizó a un flujo más bajo. Se inyectaron 30  $\mu$ l de la suspensión de lipopéptido a un flujo de 2  $\mu$ l  $\text{min}^{-1}$ . Para asegurar la correcta adsorción del lipopéptido en la superficie debía observarse un incremento en la señal de resonancia de entre 1000 y 1500 RU. Con el fin de eliminar posibles multicapas de lipopéptido se inyectaron 30  $\mu$ l de una disolución de NaOH 10 mM a un flujo de 50  $\mu$ l.

Con la finalidad de comprobar que la superficie del chip estaba totalmente recubierta de lipopéptido y no quedaba superficie libre, se inyectaron 10  $\mu\text{l}$  (a un flujo de 5  $\mu\text{l min}^{-1}$ ) de una disolución de BSA 0.1  $\text{mg ml}^{-1}$ . En caso que la superficie del chip no estuviera totalmente cubierta de lipopéptido, la BSA se adsorbería fácilmente a ella, debido a su gran hidrofobicidad. Esta unión inespecífica de la BSA se traduce en un incremento en la señal de resonancia superior a 100 RU. Si por el contrario, el incremento es menor, nos indica una buena formación de la monocapa y que se puede proseguir con el análisis de la muestra.

### 10.3.3 Análisis de los sueros

Los sueros con los que se llevó a cabo el estudio en estos chips fueron los obtenidos de los ratones tras la inmunización con lipopéptidos.

Para la inyección de las muestras el flujo de trabajo fue de 5  $\mu\text{l min}^{-1}$ . Las muestras de suero diluidas 1/200 o más en tampón fosfato se hicieron circular sobre la monocapa de lipopéptido.

Antes de iniciar un nuevo ciclo de análisis se inyectaron 25  $\mu\text{l}$  (5  $\mu\text{l min}^{-1}$ ) de la disolución de n-octil- $\beta$ -D-glucopiranosido 40 mM para asegurarse la correcta eliminación de la superficie del chip de lipopéptido como de sueros.

## 11. Inmunización: producción de anticuerpos policlonales

### 11.1 Protocolo de inmunización

Para llevar a cabo este estudio se inmunizaron ratones hembra Balb/c. Se inmunizaron un total de veinte ratones, cuatro ratones con cada péptido a estudiar. La pauta de inmunización fue la misma para los cinco péptidos del estudio y está detallada en la Tabla 11.1. Se realizaron un total de seis inoculaciones de lipopéptido en intervalos de dos semanas. Se realizaron extracciones de muestras antes de empezar las inmunizaciones, una semana después de la tercera inoculación y finalmente, una semana después de la sexta inoculación.

En cada inyección, se inocularon en la zona intraperitoneal, 100  $\mu\text{g}$  de lipopéptido disuelto en 50  $\mu\text{l}$  de tampón PBS y 50  $\mu\text{l}$  de adyuvante de Freund. Para la primera y cuarta inoculación se empleó el adyuvante completo de Freund (ACF) y para el resto de inyecciones el adyuvante incompleto de Freund (AIF). Estos adyuvantes son emulsiones A/O que tienen la propiedad de retardar la liberación

del antígeno además de aumentar la actividad de los macrófagos. El ACF, al contener micobacteria muerta tiene la capacidad de inducir coestimuladores en macrófagos.

**Tabla 11.1** Pauta de inmunización seguida en ratones Balb/c. ACF: adyuvante completo de Freund. AIF: Adyuvante incompleto de Freund.

día	descripción	muestra inoculada
0	extracción muestra (control pre-inmune)	
0	1 <sup>a</sup> inoculación	100 µg lipopéptido + 50 µl PBS + 50 µl ACF
14	2 <sup>a</sup> inoculación	100 µg lipopéptido + 50 µl PBS + 50 µl AIF
28	3 <sup>a</sup> inoculación	100 µg lipopéptido + 50 µl PBS + 50 µl AIF
35	extracción muestra	
49	4 <sup>a</sup> inoculación	100 µg lipopéptido + 50 µl PBS + 50 µl ACF
63	5 <sup>a</sup> inoculación	100 µg lipopéptido + 50 µl PBS + 50 µl AIF
77	6 <sup>a</sup> inoculación	100 µg lipopéptido + 50 µl PBS + 50 µl AIF
84	extracción muestra	

## 11.2 Obtención de las muestras de suero

Para la obtención de la muestra de sangre se realizó una punción intracardiaca y posteriormente el animal fue sacrificado. La muestra de sangre tras la tercera inmunización se obtuvo de uno de los cuatro ratones de cada grupo. Las muestras obtenidas después de la sexta inmunización de los tres ratones fueron mezcladas en el mismo tubo de manera que se trabajó con una mezcla de la sangre procedente de tres ratones.

Para la obtención de los sueros, las muestras de sangre se centrifugaron durante 10 minutos (2 x 10 minutos) a 3000 rpm.

Durante todo el periodo experimental los animales fueron manipulados siguiendo las guías internacionales establecidas para la experimentación con animales.

## **BIBLIOGRAFÍA**



## Bibliografía

- [1] Simmonds, P. (2001), The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *J.Gen.Virol.* 82, 693-712.
- [2] Alter, H. J. (1996), The cloning and clinical implications of HGV and HGBV-C. *N.Engl.J Med.* 334, 1536-1537.
- [3] Simons, J. N., Pilot-Matias, T. J., Leary, T. P., Dawson, G. J., Desai, S. M., Schlauder, G. G., Muerhoff, A. S., Erker, J. C., Buijk, S. L., Chalmers, M. L., and . (1995), Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 3401-3405.
- [4] Muerhoff, A. S., Leary, T. P., Simons, J. N., Pilot-Matias, T. J., Dawson, G. J., Erker, J. C., Chalmers, M. L., Schlauder, G. G., Desai, S. M., and Mushahwar, I. K. (1995), Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J Virol.* 69, 5621-5630.
- [5] Schaluder, G. G., Dawson, G. J., Simons, J. N., Pilot-Matias, T. J., Gutierrez, R. A., Heynen, C. A., Knigge, M. F., Kurpiewski, G. S., Buijk, S. L., Leary, T. P., and . (1995), Molecular and serologic analysis in the transmission of the GB hepatitis agents. *J Med.Virol.* 46, 81-90.
- [6] Simons, J. N., Leary, T. P., Dawson, G. J., Pilot-Matias, T. J., Muerhoff, A. S., Schlauder, G. G., Desai, S. M., and Mushahwar, I. K. (1995), Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat.Med.* 1, 564-569.
- [7] Alter, M. J., Gallagher, M., Morris, T. T., Moyer, L. A., Meeks, E. L., Krawczynski, K., Kim, J. P., and Margolis, H. S. (1997), Acute non-A-E hepatitis in the United States and the role of hepatitis G virus infection. Sentinel Counties Viral Hepatitis Study Team. *N.Engl.J Med.* 336, 741-746.
- [8] Linnen, J., Wages, J., Jr., Zhang-Keck, Z. Y., Fry, K. E., Krawczynski, K. Z., Alter, H., Koonin, E., Gallagher, M., Alter, M., Hadziyannis, S., Karayiannis, P., Fung, K., Nakatsuji, Y., Shih, J. W., Young, L., Piatak, M., Jr., Hoover, C., Fernandez, J., Chen, S., Zou, J. C., Morris, T., Hyams, K. C., Ismay, S., Lifson, J. D., Hess, G., Fong, S. K., Thomas, H., Bradley, D., Margolis, H., and Kim, J. P. (1996), Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 271, 505-508.
- [9] Leary, T. P., Muerhoff, A. S., Simons, J. N., Pilot-Matias, T. J., Erker, J. C., Chalmers, M. L., Schlauder, G. G., Dawson, G. J., Desai, S. M., and Mushahwar, I. K. (1996), Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis. *J Med.Virol.* 48, 60-67.
- [10] Smith, D. B., Basaras, M., Frost, S., Haydon, D., Cuceanu, N., Prescott, L., Kamenka, C., Millband, D., Sathar, M. A., and Simmonds, P. (2000), Phylogenetic analysis of GBV-C/hepatitis G virus. *J.Gen.Virol.* 81, 769-780.
- [11] Muerhoff, A. S., Leary, T. P., Sathar, M. A., Dawson, G. J., and Desai, S. M. (2005), African origin of GB virus C determined by phylogenetic analysis of a complete genotype 5 genome from South Africa. *J Gen.Virol.* 86, 1729-1735.
- [12] Naito, H., Win, K. M., and Abe, K. (1999), Identification of a novel genotype of hepatitis G virus in Southeast Asia. *J Clin.Microbiol.* 37, 1217-1220.
- [13] Sathar, M. A., Soni, P. N., Pegoraro, R., Simmonds, P., Smith, D. B., Dhillon, A. P., and Dusheiko, G. M. (1999), A new variant of GB virus C/hepatitis G virus (GBV-C/HGV) from South Africa. *Virus Res.* 64, 151-160.
- [14] Muerhoff, A. S., Dawson, G. J., and Desai, S. M. (2006), A previously unrecognized sixth genotype of GB virus C revealed by analysis of 5'-untranslated region sequences. *J Med.Virol.* 78, 105-111.

- [15] Schmolke, S., Tacke, M., Schmitt, U., Engel, A. M., and Ofenloch-Haehnle, B. (1998), Identification of hepatitis G virus particles in human serum by E2-specific monoclonal antibodies generated by DNA immunization. *J Virol.* 72, 4541-4545.
- [16] Xiang, J., Klinzman, D., McLinden, J., Schmidt, W. N., LaBrecque, D. R., Gish, R., and Stapleton, J. T. (1998), Characterization of hepatitis G virus (GB-C virus) particles: evidence for a nucleocapsid and expression of sequences upstream of the E1 protein. *J Virol.* 72, 2738-2744.
- [17] Belyaev, A. S., Chong, S., Novikov, A., Kongpachith, A., Masiarz, F. R., Lim, M., and Kim, J. P. (1998), Hepatitis G virus encodes protease activities which can effect processing of the virus putative nonstructural proteins. *J.Virol.* 72, 868-872.
- [18] Laxton, C. D., McMillan, D., Sullivan, V., and Ackrill, A. M. (1998), Expression and characterization of the hepatitis G virus helicase. *Journal of Viral Hepatitis* 5, 21-26.
- [19] Sbardellati, A., Scarselli, E., Amati, V., Falcinelli, S., Kekule, A. S., and Traboni, C. (2000), Processing of GB virus B non-structural proteins in cultured cells requires both NS3 protease and NS4A cofactor. *J.Gen.Virol.* 81, 2183-2188.
- [20] Xiang, J., Martinez-Smith, C., Gale, M., Jr., Chang, Q., LaBrecque, D. R., Schmidt, W. N., and Stapleton, J. T. (2005), GB virus type C NS5A sequence polymorphisms: association with interferon susceptibility and inhibition of PKR-mediated eIF2alpha phosphorylation. *J Interferon Cytokine Res.* 25, 261-270.
- [21] Nordbo, S. A., Krokstad, S., Winge, P., Skjeldestad, F. E., and Dalen, A. B. (2000), Prevalence of GB virus C (also called hepatitis G virus) markers in Norwegian blood donors. *J Clin.Microbiol.* 38, 2584-2590.
- [22] Saitoh, H., Moriyama, M., Matsumura, H., Goto, I., Tanaka, N., and Aarakawa, Y. (2002), The clinical significance of GBV-C/HGV exposure in C-viral chronic liver disease and blood donors. *Hepatol.Res.* 22, 288-296.
- [23] Wiwanitkit, V. (2005), Hepatitis G virus RNA positivity among the voluntary blood donors: a summary. *Ann.Hepatol.* 4, 43-46.
- [24] Feucht, H. H., Zollner, B., Polywka, S., Knodler, B., Schroter, M., Nolte, H., and Laufs, R. (1997), Prevalence of hepatitis G viremia among healthy subjects, individuals with liver disease, and persons at risk for parenteral transmission. *J Clin.Microbiol.* 35, 767-768.
- [25] Roth, W. K., Waschk, D., Marx, S., Tschauder, S., Zeuzem, S., Bialleck, H., Weber, H., and Seifried, E. (1997), Prevalence of hepatitis G virus and its strain variant, the GB agent, in blood donations and their transmission to recipients. *Transfusion* 37, 651-656.
- [26] Perez-Gracia, T., Galan, F., Giron-Gonzalez, J. A., Lozano, A., Benavides, B., Fernandez, E., and Rodriguez-Iglesias, M. (2000), Detection of hepatitis G virus (HGV) RNA and antibodies to the HGV envelope protein E2 in a cohort of hemodialysis patients. *J Clin.Microbiol.* 38, 4277-4279.
- [27] Busch, M. P., Kleinman, S. H., and Nemo, G. J. (2003), Current and emerging infectious risks of blood transfusions. *JAMA* 289, 959-962.
- [28] Lunel, F., Frangeul, L., Chuteau, C., Fretz, C., Thiers, V., Azar, N., Bidet, J. M., Huraux, J. M., Brechot, C., Valla, D., and Opolon, P. (1998), Transfusion-associated or nosocomial hepatitis G virus infection in patients undergoing surgery. *Transfusion* 38, 1097-1103.
- [29] Frey, S. E., Homan, S. M., Sokol-Anderson, M., Cayco, M. T., Cortorreal, P., Musial, C. E., and Di Bisceglie, A. (2002), Evidence for probable sexual transmission of the hepatitis g virus. *Clin.Infect.Dis.* 34, 1033-1038.
- [30] Bourlet, T., Berthelot, P., Grattard, F., Genin, C., Lucht, F. R., and Pozzetto, B. (2002), Detection of GB virus C/hepatitis G virus in semen and saliva of HIV type-1 infected men. *Clin.Microbiol.Infect.* 8, 352-357.
- [31] Siebert, D. J., Bowden, D. S., Tracy, S. L., and Hardikar, W. (2002), Prevalence of Hepatitis g/GBV-C in a Healthy Paediatric Population. *J Paediatr.Child Health* 38, 423

- [32] Lefrere, J. J., Sender, A., Mercier, B., Mariotti, M., Pernot, F., Soulie, J. C., Malvoisin, A., Berry, M., Gabai, A., Lattes, F., Galiay, J. C., Pawlak, C., de Lachaux, V., Chauveau, V., Hreiche, G., Larsen, M., Ferec, C., Parnet-Mathieu, F., Roudot-Thoraval, F., and Brossard, Y. (2000), High rate of GB virus type C/HGV transmission from mother to infant: possible implications for the prevalence of infection in blood donors. *Transfusion* 40, 602-607.
- [33] Alter, H. J. (1997), G-pers creepers, where'd you get those papers? A reassessment of the literature on the hepatitis G virus. *Transfusion* 37, 569-572.
- [34] Nunnari, G., Nigro, L., Palermo, F., Attanasio, M., Berger, A., Doerr, H. W., Pomerantz, R. J., and Cacopardo, B. (2003), Slower progression of HIV-1 infection in persons with GB virus C co-infection correlates with an intact T-helper 1 cytokine profile. *Ann.Intern.Med.* 139, 26-30.
- [35] Polgreen, P. M., Xiang, J., Chang, Q., and Stapleton, J. T. (2003), GB virus type C/hepatitis G virus: a non-pathogenic flavivirus associated with prolonged survival in HIV-infected individuals. *Microbes.Infect.* 5, 1255-1261.
- [36] Kaiser, T. and Tillmann, H. L. (2005), GB virus C infection: is there a clinical relevance for patients infected with the human immunodeficiency virus? *AIDS Rev.* 7, 3-12.
- [37] Williams, C. F., Klinzman, D., Yamashita, T. E., Xiang, J., Polgreen, P. M., Rinaldo, C., Liu, C., Phair, J., Margolick, J. B., Zdunek, D., Hess, G., and Stapleton, J. T. (2004), Persistent GB virus C infection and survival in HIV-infected men. *N.Engl.J Med.* 350, 981-990.
- [38] Heringlake, S., Osterkamp, S., Trautwein, C., Tillmann, H. L., Boker, K., Muerhoff, S., Mushahwar, I. K., Hunsmann, G., and Manns, M. P. (1996), Association between fulminant hepatic failure and a strain of GBV virus C. *Lancet* 348, 1626-1629.
- [39] Anastassopoulou, C. G., Delladetsima, J. K., Anagnostopoulos, G., Katsoulidou, A., Papachristopoulos, A., Tassopoulos, N. C., Theodoridou, M., and Hatzakis, A. (2002), Fulminant hepatic failure in a pediatric patient with active GB virus C (GBV-C)/hepatitis G virus (HGV) infection. *HepatoL.Res.* 23, 85-89.
- [40] Tanaka, E., Alter, H. J., Nakatsuji, Y., Shih, J. W., Kim, J. P., Matsumoto, A., Kobayashi, M., and Kiyosawa, K. (1996), Effect of hepatitis G virus infection on chronic hepatitis C. *Ann.Intern.Med.* 125, 740-743.
- [41] Sallie, R., Shaw, J., and Mutimer, D. (1996), GBV-C virus and fulminant hepatic failure. *Lancet* 347, 1552
- [42] Seifried, C., Weber, M., Bialleck, H., Seifried, E., Schrezenmeier, H., and Roth, W. K. (2004), High prevalence of GBV-C/HGV among relatives of GBV-C/HGV-positive blood donors in blood recipients and in patients with aplastic anemia. *Transfusion* 44, 268-274.
- [43] Gutierrez, R. A., Dawson, G. J., and Mushahwar, I. K. (1997), ELISA for detection of antibody to the E2 protein of GB virus C. *J Virol.Methods* 69, 1-6.
- [44] Dille, B. J., Surowy, T. K., Gutierrez, R. A., Coleman, P. F., Knigge, M. F., Carrick, R. J., Aach, R. D., Hollinger, F. B., Stevens, C. E., Barbosa, L. H., Nemo, G. J., Mosley, J. W., Dawson, G. J., and Mushahwar, I. K. (1997), An ELISA for detection of antibodies to the E2 protein of GB virus C. *J Infect.Dis.* 175, 458-461.
- [45] Tacke, M., Kiyosawa, K., Stark, K., Schlueter, V., Ofenloch-Haehnle, B., Hess, G., and Engel, A. M. (1997), Detection of antibodies to a putative hepatitis G virus envelope protein. *Lancet* 349, 318-320.
- [46] Toniutto, P., Fabris, C., Barbone, F., Tisminetzky, S. G., Liani, D., Galai, T., Barillari, G., Biffoni, F., Gasparini, V., and Pirisi, M. (1999), Immunoreactivity to putative B-cell epitopes of hepatitis G virus polyprotein in viremic and nonviremic subjects. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 6, 573-576.
- [47] Stapleton, J. T. (2003), GB Virus Type C/Hepatitis G Virus. *Semin.Liver Dis.* 23, 137-148.
- [48] Maidana, M. T., Sabino, E. C., and Kallas, E. G. (2005), GBV-C/HGV and HIV-1 coinfection. *Braz.J Infect.Dis.* 9, 122-125.

- [49] Tillmann, H. L., Heiken, H., Knapik-Botor, A., Heringlake, S., Ockenga, J., Wilber, J. C., Goergen, B., Detmer, J., McMorrow, M., Stoll, M., Schmidt, R. E., and Manns, M. P. (2001), Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N.Engl.J.Med.* 345, 715-724.
- [50] Van der Bij, A. K., Kloosterboer, N., Prins, M., Boeser-Nunnink, B., Geskus, R. B., Lange, J. M., Coutinho, R. A., and Schuitemaker, H. (2005), GB virus C coinfection and HIV-1 disease progression: The Amsterdam Cohort Study. *J Infect.Dis.* 191, 678-685.
- [51] Bjorkman, P., Flamholz, L., Naucner, A., Molnegren, V., Wallmark, E., and Widell, A. (2004), GB virus C during the natural course of HIV-1 infection: viremia at diagnosis does not predict mortality. *AIDS* 18, 877-886.
- [52] Tillmann, H. L., Stoll, M., Manns, M. P., Schmidt, R. E., and Heiken, H. (2002), Chemokine receptor polymorphisms and GB virus C status in HIV-positive patients. *AIDS* 16, 808-809.
- [53] Andoniou, C. E., Andrews, D. M., and Degli-Esposti, M. A. (2006), Natural killer cells in viral infection: more than just killers. *Immunol.Rev.* 214, 239-250.
- [54] Kiessling, R., Petranyi, G., Klein, G., and Wigzel, H. (1975), Genetic variation of in vitro cytolytic activity and in vivo rejection potential of non-immunized semi-syngeneic mice against a mouse lymphoma line. *Int.J Cancer* 15, 933-940.
- [55] Ljunggren, H. G. and Karre, K. (1985), Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp.Med.* 162, 1745-1759.
- [56] Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and Spies, T. (1999), Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727-729.
- [57] Rouse, B. T., Sarangi, P. P., and Suvas, S. (2006), Regulatory T cells in virus infections. *Immunol.Rev.* 212, 272-286.
- [58] Tsai, J. F., Margolis, H. S., Jeng, J. E., Ho, M. S., Chang, W. Y., Hsieh, M. Y., Lin, Z. Y., and Tsai, J. H. (1996), Increased IgM class circulating immune complexes in acute hepatitis A virus infection. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 78, 291-295.
- [59] Weston, S. R. and Martin, P. (2001), Serological and molecular testing in viral hepatitis: an update. *Can.J Gastroenterol.* 15, 177-184.
- [60] Zaaijer, H. L., Leentvaar-Kuijpers, A., Rotman, H., and Lelie, P. N. (1993), Hepatitis A antibody titres after infection and immunization: implications for passive and active immunization. *J Med.Virol.* 40, 22-27.
- [61] Gerlich, W. H., Luer, W., and Thomssen, R. (1980), Diagnosis of acute and inapparent hepatitis B virus infections by measurement of IgM antibody to hepatitis B core antigen. *J Infect.Dis.* 142, 95-101.
- [62] Comanor, L. and Holland, P. (2006), Hepatitis B virus blood screening: unfinished agendas. *Vox Sang.* 91, 1-12.
- [63] Hashimoto, F. (1982), Cost effectiveness of serotesting before hepatitis vaccination. *N.Engl.J Med.* 307, 503
- [64] Jacobs, R. J., Saab, S., Meyerhoff, A. S., and Koff, R. S. (2003), An economic assessment of pre-vaccination screening for hepatitis A and B. *Public Health Rep.* 118, 550-558.
- [65] da Silveira, J. F., Umezawa, E. S., and Luquetti, A. O. (2001), Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol.* 17, 286-291.
- [66] Noya, O., Patarroyo, M. E., Guzman, F., and Alarcon, de Noya (2003), Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. *Curr.Protein Pept.Sci.* 4, 299-308.
- [67] Alcaro, M. C., Peroni, E., Rovero, P., and Papini, A. M. (2003), Synthetic peptides in the diagnosis of HIV infection. *Curr.Protein Pept.Sci.* 4, 285-290.

- [68] El Awady, M., El Demellawy, M., Khalil, S., Galal, D., and Goueli, S. (2002), Synthetic peptide-based immunoassay as a supplemental test for HCV infection. *Clin.Chim.Acta* 325, 39
- [69] Schellekens, G. A., Visser, H., de Jong, B. A., van den Hoogen, F. H., Hazes, J. M., Breedveld, F. C., and van Venrooij, W. J. (2000), The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 43, 155-163.
- [70] Fabrizi, F., Martin, P., Dixit, V., Quan, S., Brezina, M., Kaufman, E., Sra, K., Mousa, M., DiNello, R., Polito, A., and Gitnick, G. (2001), Automated RIBA HCV strip immunoblot assay: a novel tool for the diagnosis of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients. *Am.J Nephrol.* 21, 104-111.
- [71] Tam, J. P. (1996), Recent advances in multiple antigen peptides. *J Immunol.Methods* 196, 17-32.
- [72] Li, S. C., Kim, P. K., and Deber, C. M. (1995), Manipulation of peptide conformations by fine-tuning of the environment and/or the primary sequence. *Biopolymers* 35, 667-675.
- [73] Koppke, K. D. (1972), Synthesis of Cyclic Peptides. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 61, 1345-&.
- [74] Wright-Minogue, J., Yao, N., Zhang, R., Butkiewicz, N. J., Baroudy, B. M., Lau, J. Y., and Hong, Z. (2000), Cross-genotypic interaction between hepatitis C virus NS3 protease domains and NS4A cofactors. *J.Hepatol.* 32, 497-504.
- [75] Pilot-Matias, T. J., Muerhoff, A. S., Simons, J. N., Leary, T. P., Buijk, S. L., Chalmers, M. L., Erker, J. C., Dawson, G. J., Desai, S. M., and Mushahwar, I. K. (1996), Identification of antigenic regions in the GB hepatitis viruses GBV-A, GBV-B, and GBV-C. *J Med.Virol.* 48, 329-338.
- [76] Hopp, T. P. and Woods, K. R. (1981), Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78, 3824-3828.
- [77] Welling, G. W., Weijer, W. J., van der Zee R., and Welling-Wester, S. (1985), Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Lett.* 188, 215-218.
- [78] Chou, P. Y. and Fasman, G. D. (1979), Prediction of beta-turns. *Biophys.J* 26, 367-373.
- [79] Merrifield, R. B. (1963), Solid Phase Peptide Synthesis .1. Synthesis of A Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* 85, 2149-&.
- [80] Konig, W. and Geiger, R. (1970), A New Method for Synthesis of Peptides - Activation of Carboxyl Group with Dicyclohexylcarbodiimide Using 1-Hydroxybenzotriazoles As Additives. *Chemische Berichte-Recueil* 103, 788-&.
- [81] Martinez, J., Bali, J. P., Rodriguez, M., Castro, B., Magous, R., Laur, J., and Lignon, M. F. (1985), Synthesis and Biological-Activities of Some Pseudo-Peptide Analogs of Tetragestrin - the Importance of the Peptide Backbone. *Journal of Medicinal Chemistry* 28, 1874-1879.
- [82] Knorr, R., Trzeciak, A., Bannwarth, W., and Gillissen, D. (1989), New Coupling Reagents in Peptide Chemistry. *Tetrahedron Letters* 30, 1927-1930.
- [83] Poulain, R. F., Tartar, A. L., and Deprez, B. P. (2001), Parallel synthesis of 1,2,4-oxadiazoles from carboxylic acids using an improved, uronium-based, activation. *Tetrahedron Letters* 42, 1495-1498.
- [84] Hernandez, M., Selles, M. E., Pozo, Pena L., Gomez, I., and Melchor, A. (2000), Antigenicity of chimeric synthetic peptides based on HTLV-1 antigens and the impact of epitope orientation. *Biochem.Biophys.Res.Commun* 276, 1085-1088.
- [85] Hernandez, Marin M., Marquez, Bocalandro Y., Vallejo, R. V., Rodriguez, Tanty C., Higginson, Clark D., Pozo, Pena L., and Silva, Leon C. (2003), Use of a chimeric synthetic peptide from the core p19 protein and the envelope gp46 glycoprotein in the immunodiagnosis of HTLV-II virus infection. *Prep.Biochem.Biotechnol.* 33, 29-38.

- [86] Hernandez, Marin M., Hernandez, Spengler, I, Ramos, Martinez G., and Pozo, Pena L. (2006), Chimeric synthetic peptides as antigens for detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. *Biochem.Biophys.Res.Commun* 339, 89-92.
- [87] Gomara, M. J., Girona, V., Ercilla, G., Reig, F., Alsina, M. A., and Haro, I. (2001), Differences in secondary structure of HAV-synthetic peptides induced by the sequential order of T- and B-cell epitopes. *Biopolymers* 58, 117-128.
- [88] Ahlborg, N and Andersson, R (1994), Immunogenicity of chimeric multiple antigen peptides based on *Plasmodium falciparum* antigens: impact of epitope orientation. *Vaccine* 16, 38-44.
- [89] Denton, G, Hudecz, F., and Price, M. R. (1994), Sequential order of T and B cell Epitopes affects immunogenicity but not antibody recognition of the b cell epitope. *Pept.Res.* 7, 258-264.
- [90] Sumar, Nazira (2003) in: *Epitope mapping* (Olwyn Westwood and Frank Hay, Eds), pp.17-45, London.
- [91] Rojo, N. Péptidos sintéticos aplicados al diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis G (GBV-C/HGV) y al estudio de su interacción con membranas modelo. Tesis Doctoral. Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Universidad de Barcelona, 2003.
- [92] Rojo, N., Ercilla, G., and Haro, I. (2003), GB virus C (GBV-C) / hepatitis G virus (HGV): towards the design of synthetic peptides-based biosensors for immunodiagnosis of GBV-C/HGV infection. *Curr.Protein Pept.Sci.* 4, 291-298.
- [93] Carter, J. M. (1994), Epitope mapping of a protein using the Geysen (PEPSCAN) procedure. *Methods Mol.Biol.* 36, 207-223.
- [94] Williamson, M. P., Handa, B. K., and Hall, M. J. (1986), Secondary structure of a herpes simplex virus glycoprotein D antigenic domain. *Int.J Pept.Protein Res.* 27, 562-568.
- [95] Emmel, E. A., Verweij, C. L., Durand, D. B., Higgins, K. M., Lacy, E., and Crabtree, G. R. (1989), Cyclosporin A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T cell activation. *Science* 246, 1617-1620.
- [96] Schwyzer, R. and Sieber, P. (1957), Die Synthese Von Gramacidin-S. *Helvetica Chimica Acta* 40, 624-639.
- [97] Brugghe, H. F., Timmermans, H. A., van Unen, L. M., ten Hove, G. J., Van de, Werken G., Poolman, J. T., and Hoogerhout, P. (1994), Simultaneous multiple synthesis and selective conjugation of cyclized peptides derived from a surface loop of a meningococcal class 1 outer membrane protein. *Int.J Pept.Protein Res.* 43, 166-172.
- [98] Katsara, M., Tselios, T., Deraos, S., Deraos, G., Matsoukas, M. T., Lazoura, E., Matsoukas, J., and Apostolopoulos, V. (2006), Round and round we go: cyclic peptides in disease. *Curr.Med.Chem* 13, 2221-2232.
- [99] Dutta, A. S. (1989), Small Peptides - New Targets for Drug Research. *Chemistry in Britain* 25, 159-162.
- [100] Kroot, E. J., de Jong, B. A., van Leeuwen, M. A., Swinkels, H., van den Hoogen, F. H., van't Hof, M., van de Putte, L. B., van Rijswijk, M. H., van Venrooij, W. J., and van Riel, P. L. (2000), The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43, 1831-1835.
- [101] Kates, S. A. and Albericio, F. (2000), *Solid-phase synthesis: a practical guide*, 331-364.
- [102] Li, P. and Roller, P. P. (2002), Cyclization strategies in peptide derived drug design. *Curr.Top.Med.Chem* 2, 325-341.
- [103] Lambert, J. N., Mitchell, J. P., and Roberts, K. D. (2001), The synthesis of cyclic peptides. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions* 1, 471-484.
- [104] Davies, J. S. (2003), The cyclization of peptides and depsipeptides. *J Pept.Sci.* 9, 471-501.

- [105] Rovero, P., Quartara, L., and Fabbri, G. (1991), Synthesis of Cyclic-Peptides on Solid Support. *Tetrahedron Letters* 32, 2639-2642.
- [106] McMurray, J. S. (1991), Solid-Phase Synthesis of A Cyclic Peptide Using Fmoc Chemistry. *Tetrahedron Letters* 32, 7679-7682.
- [107] Cabrele, C., Langer, M., and Beck-Sickinger, A. G. (1999), Amino acid side chain attachment approach and its application to the synthesis of tyrosine-containing cyclic peptides. *Journal of Organic Chemistry* 64, 4353-4361.
- [108] Kates, S. A., Sole, N. A., Johnson, C. R., Hudson, D., Barany, G., and Albericio, F. (1993), A Novel, Convenient, 3-Dimensional Orthogonal Strategy for Solid-Phase Synthesis of Cyclic-Peptides. *Tetrahedron Letters* 34, 1549-1552.
- [109] Chan, Weng C., Bycroft, Barrie W., Evans, David J., and White, Peter D. (1995), A novel 4-aminobenzyl ester-based carboxy-protecting group for synthesis of atypical peptides by Fmoc-But solid-phase chemistry. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 2209-2210.
- [110] Cudic, Mare, Wade, John D., and Otvos, Laszlo (2000), Convenient synthesis of a head-to-tail cyclic peptide containing an expanded ring. *Tetrahedron Letters* 41, 4527-4531.
- [111] Chan, Weng C., White, Peter D., Beythien, Joerg, and Steinauer, Rene (1995), Facile synthesis of protected C-terminal peptide segments by Fmoc/But solid-phase procedures on N-Fmoc-9-amino-xanthen-3-yloxymethyl polystyrene resin. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 589-592.
- [112] Johnson, Tony, Liley, Mark, Cheeseright, Timothy J., and Begum, Farida (2000), Problems in the synthesis of cyclic peptides through use of the Dmab protecting group. *Perkin* 1, 2811-2820.
- [113] Yoshida, C. F., Rouzere, C. D., Nogueira, R. M., Lampe, E., Travassos-da-Rosa, M. A., Vanderborght, B. O., and Schatzmayr, H. G. (1992), Human antibodies to dengue and yellow fever do not react in diagnostic assays for hepatitis C virus. *Braz.J Med.Biol.Res.* 25, 1131-1135.
- [114] Engvall, E. and Perlmann, P. (1972), Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol.* 109, 129-135.
- [115] Gregorius, K., Dalum, I., Freisleben, M., Mouritsen, S., and Elsner, H. I. (1999), A novel microtiter plate based method for identification of B-cell epitopes. *J Pept.Sci.* 5, 75-82.
- [116] Niveleau, A., Bruno, C., Drouet, E., Brebant, R., Sergeant, A., and Troalen, F. (1995), Grafting peptides onto polystyrene microplates for ELISA. *J Immunol.Methods* 182, 227-234.
- [117] Kim, P. and Pau, C. P. (2001), Comparing tandem repeats and multiple antigenic peptides as the antigens to detect antibodies by enzyme immunoassay. *J Immunol.Methods* 257, 51-54.
- [118] Briand, J. P., Muller, S., and Van Regenmortel, M. H. (1985), Synthetic peptides as antigens: pitfalls of conjugation methods. *J Immunol.Methods* 78, 59-69.
- [119] Bocher, M., Boldicke, T., Kiess, M., and Bilitewski, U. (1997), Synthesis of mono- and bifunctional peptide-dextran conjugates for the immobilization of peptide antigens on ELISA plates: properties and application. *J Immunol.Methods* 208, 191-202.
- [120] Fargeas, C., Hommel, M., Maingon, R., Dourado, C., Monsigny, M., and Mayer, R. (1996), Synthetic peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin.Microbiol.* 34, 241-248.
- [121] Zegers, N., Gerritse, K., Deen, C., Boersma, W., and Claassen, E. (1990), An improved conjugation method for controlled covalent coupling of synthetic peptides to proteins using glutaraldehyde in a dialysis method. *J Immunol.Methods* 130, 195-200.
- [122] Perez, Teresa, Gómez, Antoni, Sanmarti, Raimon, Viñas, Odette, Ercilla, Guadalupe, and Haro, Isabel (2003), Use of [Cit312,314] filaggrin (306-324) analogue for the diagnosis of

- rheumatoid arthritis. Conformational study by circular dichroism and fourier transformed infrared spectroscopy. *Letters in Peptide Science* 9, 291-300.
- [123] Griesmann, G. E., McCormick, D. J., and Lennon, V. A. (1991), An avidin-biotin-peroxidase assay to detect synthetic peptides bound to polystyrene plates. *J Immunol.Methods* 138, 25-29.
- [124] Fischer, P. M. and Howden, M. E. (1990), Direct enzyme-linked immunosorbent assay of anti-peptide antibodies using capture of biotinylated peptides by immobilized avidin. *J Immunoassay* 11, 311-327.
- [125] Sondergard-Andersen, J., Lauritzen, E., Lind, K., and Holm, A. (1990), Covalently linked peptides for enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol.Methods* 131, 99-104.
- [126] Johnson, D (1974), Cyanuric Chloride - a new coupling reagent for affinity chromatography. *Fed.Proc.* 33, 1502
- [127] Nunc (2003), Covalent Binding. Covalink™ NH
- [128] Stapleton, J. T., Williams, C. F., and Xiang, J. (2004), GB virus type C: a beneficial infection? *J Clin.Microbiol.* 42, 3915-3919.
- [129] Infante, D., Pich, M., Tormo, R., Sauleda, S., Montane, C., Esteban, J. I., and Esteban, R. (2000), Prevalence of hepatitis G virus in healthy children in liver disease, and human immunodeficiency virus-1 infection: response to interferon. *J Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 30, 385-390.
- [130] Quiros, E., Piedrola, G., and Maroto, M. C. (1998), GBV-C RNA presence in several high-risk groups of Spain. *Eur.J Epidemiol.* 14, 617-619.
- [131] Puig-Basagoiti, F., Cabana, M., Guilera, M., Gimenez-Barcons, M., Sirera, G., Tural, C., Clotet, B., Sanchez-Tapias, J. M., Rodes, J., Saiz, J. C., and Martinez, M. A. (2000), Prevalence and route of transmission of infection with a novel DNA virus (TTV), hepatitis C virus, and hepatitis G virus in patients infected with HIV. *J Acquir.Immune.Defic.Syndr.* 23, 89-94.
- [132] Soffredini, R., Rumi, M., Lampertico, P., Aroldi, A., Tarantino, A., Ponticelli, C., and Colombo, M. (1996), Increased detection of antibody to hepatitis C virus in renal transplant patients by third-generation assays. *Am.J Kidney Dis.* 28, 437-440.
- [133] Kuo, G., Choo, Q. L., Alter, H. J., Gitnick, G. L., Redeker, A. G., Purcell, R. H., Miyamura, T., Dienstag, J. L., Alter, M. J., Stevens, C. E., and . (1989), An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244, 362-364.
- [134] Anandarao, R., Swaminathan, S., and Khanna, N. (2005), The identification of immunodominant linear epitopes of dengue type 2 virus capsid and NS4a proteins using pin-bound peptides. *Virus Res.* 112, 60-68.
- [135] Rosa, C., Osborne, S., Garetto, F., Griva, S., Rivella, A., Calabresi, G., Guaschino, R., and Bonelli, F. (1995), Epitope mapping of the NS4 and NS5 gene products of hepatitis C virus and the use of a chimeric NS4-NS5 synthetic peptide for serodiagnosis. *J Virol.Methods* 55, 219-232.
- [136] Vanniasinkam, T., Barton, M. D., and Heuzenroeder, M. W. (2001), B-Cell epitope mapping of the VapA protein of *Rhodococcus equi*: implications for early detection of *R. equi* disease in foals. *J Clin.Microbiol.* 39, 1633-1637.
- [137] Gomara, M. J., Riedemann, S., Vega, I., Ibarra, H., Ercilla, G., and Haro, I. (2000), Use of linear and multiple antigenic peptides in the immunodiagnosis of acute hepatitis A virus infection. *J Immunol.Methods* 234, 23-34.
- [138] Gruber, P., Suhr, M., Frey, A., Becker, W. M., and Hofmann, T. (2004), Development of an epitope-specific analytical tool for the major peanut allergen Ara h 2 using a high-density multiple-antigenic peptide strategy. *Mol.Nutr.Food Res.* 48, 449-458.

- [139] Ndongmo, C. B., Switzer, W. M., Pau, C. P., Zeh, C., Schaefer, A., Pieniazek, D., Folks, T. M., and Kalish, M. L. (2004), New multiple antigenic peptide-based enzyme immunoassay for detection of simian immunodeficiency virus infection in nonhuman primates and humans. *J Clin.Microbiol.* 42, 5161-5169.
- [140] Saravanan, P., Kumar, S., and Kataria, J. M. (2004), Use of multiple antigenic peptides related to antigenic determinants of infectious bursal disease virus (IBDV) for detection of anti-IBDV-specific antibody in ELISA--quantitative comparison with native antigen for their use in serodiagnosis. *J Immunol.Methods* 293, 61-70.
- [141] Bewick, V., Cheek, L., and Ball, J. (2004), Statistics review 13: receiver operating characteristic curves. *Crit Care* 8, 508-512.
- [142] Obuchowski, N. A., Lieber, M. L., and Wians, F. H., Jr. (2004), ROC curves in clinical chemistry: uses, misuses, and possible solutions. *Clin.Chem* 50, 1118-1125.
- [143] Eng, J. (2005), Receiver operating characteristic analysis a primer. *Acad.Radiol.* 12, 909-916.
- [144] Pepe, M. S. (2003) in: *The statistical evaluation of medical test for classification and prediction* (Atkinson, A. C. and Pierce, D. A., Eds), pp.66-95, Oxford University Press, Oxford, UK.
- [145] Lasko, T. A., Bhagwat, J. G., Zou, K. H., and Ohno-Machado, L. (2005), The use of receiver operating characteristic curves in biomedical informatics. *J Biomed.Inform.* 38, 404-415.
- [146] Nunez, M. and Soriano, V. (2005), Hepatitis C virus (HCV) genotypes and disease progression in HIV/HCV-coinfected patients. *J Infect.Dis.* 191, 1-3.
- [147] Ockenga, J., Tillmann, H. L., Trautwein, C., Stoll, M., Manns, M. P., and Schmidt, R. E. (1997), Hepatitis B and C in HIV-infected patients. Prevalence and prognostic value. *J Hepatol.* 27, 18-24.
- [148] Tillmann, H., Berning-Haag, A, and Elze, M (2002), Longer survival of liver transplant recipients with multiple hepatitis virus infections. *Hepatology* 36, 659A
- [149] Toyoda, H., Fukuda, Y., Hayakawa, T., Takamatsu, J., and Saito, H. (1998), Effect of GB virus C/hepatitis G virus coinfection on the course of HIV infection in hemophilia patients in Japan. *J Acquir.Immune.Defic.Syndr.Hum.Retrovirol.* 17, 209-213.
- [150] Heringlake, S., Ockenga, J., Tillmann, H. L., Trautwein, C., Meissner, D., Stoll, M., Hunt, J., Jou, C., Solomon, N., Schmidt, R. E., and Manns, M. P. (1998), GB virus C/hepatitis G virus infection: a favorable prognostic factor in human immunodeficiency virus-infected patients? *J Infect.Dis.* 177, 1723-1726.
- [151] Tillmann, H. L., Heringlake, S., Trautwein, C., Meissner, D., Nashan, B., Schlitt, H. J., Kratochvil, J., Hunt, J., Qiu, X., Lou, S. C., Pichlmayr, R., and Manns, M. P. (1998), Antibodies against the GB virus C envelope 2 protein before liver transplantation protect against GB virus C de novo infection. *Hepatology* 28, 379-384.
- [152] Silini, E., Belli, L., Alberti, A. B., Asti, M., Cerino, A., Bissolati, M., Rondinara, G., De Carlis, L., Forti, D., Mondelli, M. U., and Ideo, G. (1998), HGV/GBV-C infection in liver transplant recipients: antibodies to the viral E2 envelope glycoprotein protect from de novo infection. *J Hepatol.* 29, 533-540.
- [153] Larios, C. Péptidos de fusión del virus de la hepatitis G: definición, síntesis y caracterización biofísica. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona-Consejo Superior de Investigaciones Científicas., 2005.
- [154] Cubero, M. Síntesis, estudios conformacionales y de antigenicidad de péptidos quiméricos relacionados con el virus de la hepatitis G. Máster Experimental. Consejo Superior de Investigaciones Científicas., 2004.
- [155] Perez, M. L., Gomara, M. J., Kasi, D., Alonso, A., Vinas, O., Ercilla, G., Sanmarti, R., and Haro, I. (2006), Synthesis of overlapping fibrin citrullinated peptides and their use for diagnosing rheumatoid arthritis. *Chem Biol.Drug Des* 68, 194-200.

- [156] Greenfield, N. J. (1996), Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal.Biochem.* 235, 1-10.
- [157] Toniolo, C. and Benedetti, E. (1991), The polypeptide 310-helix. *Trends Biochem.Sci.* 16, 350-353.
- [158] Lau, S. Y., Taneja, A. K., and Hodges, R. S. (1984), Synthesis of a model protein of defined secondary and quaternary structure. Effect of chain length on the stabilization and formation of two-stranded alpha-helical coiled-coils. *J Biol.Chem* 259, 13253-13261.
- [159] Manning, M. C. and Woody, R. W. (1991), Theoretical CD studies of polypeptide helices: examination of important electronic and geometric factors. *Biopolymers* 31, 569-586.
- [160] Chen, Y. H., Yang, J. T., and Chau, K. H. (1974), Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry* 13, 3350-3359.
- [161] Provencher, S. W. and Glockner, J. (1981), Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20, 33-37.
- [162] Bohm, G., Muhr, R., and Jaenicke, R. (1992), Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng* 5, 191-195.
- [163] Andrade, M. A., Chacon, P., Merelo, J. J., and Moran, F. (1993), Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng* 6, 383-390.
- [164] Formaggio, F., Crisma, M., Rossi, P., Scrimin, P., Kaptein, B., Broxterman, Q. B., Kamphuis, J., and Toniolo, C. (2000), The first water-soluble 3(10)-helical peptides. *Chemistry* 6, 4498-4504.
- [165] Perczel, A. and Hollosi, M. (1996) in: *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules* (G.D.Fasman, Eds), pp.285-380, Plenum Press, New York.
- [166] ELLIOTT, A. and AMBROSE, E. J. (1950), Structure of synthetic polypeptides. *Nature* 165, 921-922.
- [167] Seshadri, S., Khurana, R., and Fink, A. L. (1999), Fourier transform infrared spectroscopy in analysis of protein deposits. *Methods Enzymol.* 309, 559-576.
- [168] Bandekar, J. (1992), Amide modes and protein conformation. *Biochim.Biophys.Acta* 1120, 123-143.
- [169] Arrondo, J. L., Muga, A., Castresana, J., and Goni, F. M. (1993), Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* 59, 23-56.
- [170] Cabiaux, V., Goormaghtigh, E., Wattiez, R., Falmagne, P., and Ruyschaert, J. M. (1989), Secondary structure changes of diphtheria toxin interacting with asolectin liposomes: an infrared spectroscopy study. *Biochimie* 71, 153-158.
- [171] Cabiaux, V., Brasseur, R., Wattiez, R., Falmagne, P., Ruyschaert, J. M., and Goormaghtigh, E. (1989), Secondary structure of diphtheria toxin and its fragments interacting with acidic liposomes studied by polarized infrared spectroscopy. *J Biol.Chem* 264, 4928-4938.
- [172] Kennedy, D. F., Crisma, M., Toniolo, C., and Chapman, D. (1991), Studies of peptides forming 3(10)- and alpha-helices and beta-bend ribbon structures in organic solution and in model biomembranes by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 30, 6541-6548.
- [173] Inai, Y., Oshikawa, T., Yamashita, M., Tagawa, K., and Hirabayashi, T. (2003), Crystal structure of achiral nonapeptide Boc-(Aib-DeltaZPhe)4-Aib-OMe at atomic resolution: evidence for a 3(10)-helix. *Biopolymers* 70, 310-322.
- [174] Susi, H. and Byler, D. M. (1986), Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy of enzymes. *Methods Enzymol.* 130, 290-311.
- [175] Fivash, M., Towler, E. M., and Fisher, R. J. (1998), BIAcore for macromolecular interaction. *Curr.Opin.Biotechnol.* 9, 97-101.

- [176] Pattnaik, P. (2005), Surface plasmon resonance: applications in understanding receptor-ligand interaction. *Appl.Biochem.Biotechnol.* 126, 79-92.
- [177] Szabo, A., Stolz, L., and Granzow, R. (1995), Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA). *Curr.Opin.Struct.Biol.* 5, 699-705.
- [178] Jonsson, U., Fagerstam, L., Lofas, S., Stenberg, E., Karlsson, R., Frostell, A., Markey, F., and Schindler, F. (1993), Introducing a biosensor based technology for real-time biospecific interaction analysis. *Ann.Biol.Clin.(Paris)* 51, 19-26.
- [179] O'Shannessy, D. J., Brigham-Burke, M., and Peck, K. (1992), Immobilization chemistries suitable for use in the BIAcore surface plasmon resonance detector. *Anal.Biochem.* 205, 132-136.
- [180] Homola, J. (2003), Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Anal.Bioanal.Chem* 377, 528-539.
- [181] Rich, R. L. and Myszka, D. G. (2005), Survey of the year 2003 commercial optical biosensor literature. *J Mol.Recognit.* 18, 1-39.
- [182] Rich, R. L. and Myszka, D. G. (2005), Survey of the year 2004 commercial optical biosensor literature. *J Mol.Recognit.* 18, 431-478.
- [183] Biacore AB (2001) in: *Biacore Concentration Analysis Handbook*, pp.79-82, BIAcore, Uppsala, Sweden.
- [184] Huber, W. and Mueller, F. (2006), Biomolecular interaction analysis in drug discovery using surface plasmon resonance technology. *Curr.Pharm.Des* 12, 3999-4021.
- [185] Pattnaik, P. (2005), Surface plasmon resonance: applications in understanding receptor-ligand interaction. *Appl.Biochem.Biotechnol.* 126, 79-92.
- [186] Sota, H., Hasegawa, Y., and Iwakura, M. (1998), Detection of conformational changes in an immobilized protein using surface plasmon resonance. *Anal.Chem* 70, 2019-2024.
- [187] May, L. M. and Russell, D. A. (2002), The characterization of biomolecular secondary structures by surface plasmon resonance. *Analyst* 127, 1589-1595.
- [188] Lee, T. H., Mozsolits, H., and Aguilar, M. I. (2001), Measurement of the affinity of melittin for zwitterionic and anionic membranes using immobilized lipid biosensors. *J Pept.Res.* 58, 464-476.
- [189] Mozsolits, H. and Aguilar, M. I. (2002), Surface plasmon resonance spectroscopy: an emerging tool for the study of peptide-membrane interactions. *Biopolymers* 66, 3-18.
- [190] Jongerius-Gortemaker, B. G., Goverde, R. L., van Knapen, F., and Bergwerff, A. A. (2002), Surface plasmon resonance (BIAcore) detection of serum antibodies against Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium. *J Immunol.Methods* 266, 33-44.
- [191] Wei, D., Oyarzabal, O. A., Huang, T. S., Balasubramanian, S., Sista, S., and Simonian, A. L. (2007), Development of a surface plasmon resonance biosensor for the identification of *Campylobacter jejuni*. *J Microbiol.Methods*
- [192] Garcia-Ojeda, P. A., Hardy, S., Kozlowski, S., Stein, K. E., and Feavers, I. M. (2004), Surface plasmon resonance analysis of antipolysaccharide antibody specificity: responses to meningococcal group C conjugate vaccines and bacteria. *Infect.Immun.* 72, 3451-3460.
- [193] Cho, H. S. and Park, N. Y. (2006), Serodiagnostic comparison between two methods, ELISA and surface plasmon resonance for the detection of antibodies of classical swine fever. *J Vet.Med.Sci.* 68, 1327-1329.
- [194] Wittekindt, C., Fleckenstein, B., Wiesmuller, K., Eing, B. R., and Kuhn, J. E. (2000), Detection of human serum antibodies against type-specifically reactive peptides from the N-terminus of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 and type 2 by surface plasmon resonance. *J Virol.Methods* 87, 133-144.

- [195] Haro, I., Perez, S., Garcia, M., Chan, W. C., and Ercilla, G. (2003), Liposome entrapment and immunogenic studies of a synthetic lipophilic multiple antigenic peptide bearing VP1 and VP3 domains of the hepatitis A virus: a robust method for vaccine design. *FEBS Lett.* 540, 133-140.
- [196] Gomara, M. J., Ercilla, G., Alsina, M. A., and Haro, I. (2000), Assessment of synthetic peptides for hepatitis A diagnosis using biosensor technology. *J Immunol.Methods* 246, 13-24.
- [197] Van Regenmortel, M. H. and Choulier, L. (2001), Recognition of peptides by antibodies and investigations of affinity using biosensor technology. *Comb.Chem High Throughput.Screen.* 4, 385-395.
- [198] Cooper, M. A. (2003), Label-free screening of bio-molecular interactions. *Anal.Bioanal.Chem* 377, 834-842.
- [199] Van Regenmortel, M. H., Altschuh, D., Chatellier, J., Rauffer-Bruyere, N., Richalet-Secordel, P., and Saunal, H. (1997), Uses of biosensors in the study of viral antigens. *Immunol.Invest* 26, 67-82.
- [200] Richalet-Secordel, P. M., Zeder-Lutz, G., Plaue, S., Sommermeyer-Leroux, G., and Van Regenmortel, M. H. (1994), Cross-reactivity of monoclonal antibodies to a chimeric V3 peptide of HIV-1 with peptide analogues studied by biosensor technology and ELISA. *J Immunol.Methods* 176, 221-234.
- [201] Richalet-Secordel, P. M., Deslandres, A., Plaue, S., You, B., Barre-Sinoussi, F., and Van Regenmortel, M. H. (1994), Cross-reactive potential of rabbit antibodies raised against a cyclic peptide representing a chimeric V3 loop of HIV-1 gp120 studied by biosensor technique and ELISA. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 9, 77-87.
- [202] Biacore AB (2001), Buffer and Sample preparation for direct binding assay in DMSO using BIACORE, 1-2.
- [203] Schuck, P. (1997), Use of surface plasmon resonance to probe the equilibrium and dynamic aspects of interactions between biological macromolecules. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 26, 541-566.
- [204] Marsden, HS, Owsianka, AM, Graham, S, McLean, GW, and Robertson, CA (1992), Advantages of branched peptides in serodiagnosis. Detection of HIV-specific antibodies and the use of glycine spacers to increase sensibility. *J Immunol.Methods* 147, 65-72.
- [205] Mortara, L., Gras-Masse, H., Rommens, C., Venet, A., Guillet, J. G., and Bourgault-Villada, I. (1999), Type 1 CD4(+) T-cell help is required for induction of antipeptide multispecific cytotoxic T lymphocytes by a lipopeptidic vaccine in rhesus macaques. *J Virol.* 73, 4447-4451.
- [206] Gahery-Segard, H., Pialoux, G., Charmeteau, B., Sermet, S., Poncelet, H., Raux, M., Tartar, A., Levy, J. P., Gras-Masse, H., and Guillet, J. G. (2000), Multiepitopic B- and T-cell responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type 1 lipopeptide vaccine. *J Virol.* 74, 1694-1703.
- [207] Pialoux, G., Gahery-Segard, H., Sermet, S., Poncelet, H., Fournier, S., Gerard, L., Tartar, A., Gras-Masse, H., Levy, J. P., and Guillet, J. G. (2001), Lipopeptides induce cell-mediated anti-HIV immune responses in seronegative volunteers. *AIDS* 15, 1239-1249.
- [208] BenMohamed, L., Thomas, A., Bossus, M., Brahimi, K., Wubben, J., Gras-Masse, H., and Druilhe, P. (2000), High immunogenicity in chimpanzees of peptides and lipopeptides derived from four new *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic molecules. *Vaccine* 18, 2843-2855.
- [209] BenMohamed, L., Wechsler, S. L., and Nesburn, A. B. (2002), Lipopeptide vaccines--yesterday, today, and tomorrow. *Lancet Infect.Dis.* 2, 425-431.
- [210] BenMohamed, L., Thomas, A., and Druilhe, P. (2004), Long-term multiepitopic cytotoxic-T-lymphocyte responses induced in chimpanzees by combinations of *Plasmodium falciparum* liver-stage peptides and lipopeptides. *Infect.Immun.* 72, 4376-4384.
- [211] Wassef, N. M., Alving, C. R., and Richards, R. L. (1994), Liposomes as carriers for vaccines. *Immunomethods.* 4, 217-222.

- [212] Haro, I. and Gomara, M. J. (2004), Design of synthetic peptidic constructs for the vaccine development against viral infections. *Curr. Protein Pept. Sci.* 5, 425-433.
- [213] Lowell, G. H., Smith, L. F., Seid, R. C., and Zollinger, W. D. (1988), Peptides bound to proteosomes via hydrophobic feet become highly immunogenic without adjuvants. *J Exp. Med.* 167, 658-663.
- [214] Lovgren, K., Lindmark, J., Pipkorn, R., and Morein, B. (1987), Antigenic presentation of small molecules and peptides conjugated to a preformed iscom as carrier. *J Immunol. Methods* 98, 137-143.
- [215] Kalyan, N. K., Lee, S. G., Wilhelm, J., Pisano, M. R., Hum, W. T., Hsiao, C. L., Davis, A. R., Eichberg, J. W., Robert-Guroff, M., and Hung, P. P. (1994), Immunogenicity of recombinant influenza virus haemagglutinin carrying peptides from the envelope protein of human immunodeficiency virus type 1. *Vaccine* 12, 753-760.
- [216] Michel, E., Reich, K. A., Favier, R., Berche, P., and Cossart, P. (1990), Attenuated mutants of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* obtained by single amino acid substitutions in listeriolysin O. *Mol. Microbiol.* 4, 2167-2178.
- [217] Hopp, T. P. (1984), Immunogenicity of a synthetic HBsAg peptide: enhancement by conjugation to a fatty acid carrier. *Mol. Immunol.* 21, 13-16.
- [218] Wu, S. F., Liao, C. L., Lin, Y. L., Yeh, C. T., Chen, L. K., Huang, Y. F., Chou, H. Y., Huang, J. L., Shaio, M. F., and Sytwu, H. K. (2003), Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. *Vaccine* 21, 3919-3929.
- [219] Wu, H. C., Jung, M. Y., Chiu, C. Y., Chao, T. T., Lai, S. C., Jan, J. T., and Shaio, M. F. (2003), Identification of a dengue virus type 2 (DEN-2) serotype-specific B-cell epitope and detection of DEN-2-immunized animal serum samples using an epitope-based peptide antigen. *J Gen. Virol.* 84, 2771-2779.
- [220] Jiao, X., Wang, R. Y., Qiu, Q., Alter, H. J., and Shih, J. W. (2004), Enhanced hepatitis C virus NS3 specific Th1 immune responses induced by co-delivery of protein antigen and CpG with cationic liposomes. *J Gen. Virol.* 85, 1545-1553.
- [221] Kumar, P., Sulochana, P., Nirmala, G., Haridattatreya, M., and Satchidanandam, V. (2004), Conserved amino acids 193-324 of non-structural protein 3 are a dominant source of peptide determinants for CD4+ and CD8+ T cells in a healthy Japanese encephalitis virus-endemic cohort. *J Gen. Virol.* 85, 1131-1143.
- [222] Mozsolits, H., Wirth, H. J., Werkmeister, J., and Aguilar, M. I. (2001), Analysis of antimicrobial peptide interactions with hybrid bilayer membrane systems using surface plasmon resonance. *Biochim. Biophys. Acta* 1512, 64-76.
- [223] Cooper, M. A., Try, A. C., Carroll, J., Ellar, D. J., and Williams, D. H. (1998), Surface plasmon resonance analysis at a supported lipid monolayer. *Biochim. Biophys. Acta* 1373, 101-111.
- [224] Siguier, J. P., Major, M., and Balland, O. (2002), Development of a new method to characterize (SMBV) antigen formulations using surface plasmon resonance technology. *Int. J. Pharm.* 242, 411-415.
- [225] Yu, Y. Y., Van Wie, B. J., Koch, A. R., Moffett, D. F., and Davis, W. C. (1998), Real-time analysis of immunogen complex reaction kinetics using surface plasmon resonance. *Anal. Biochem.* 263, 158-168.
- [226] Kaiser, E., Colecott, R. L., Bossinger, C. D., and Cook, P. I. (1970), Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* 34, 595-598.
- [227] Christensen, T. (1979), Qualitative Test for Monitoring Coupling Completeness in Solid-Phase Peptide-Synthesis Using Chloranil. *Acta Chemica Scandinavica Series B-Organic Chemistry and Biochemistry* 33, 763-766.

- [228] Madder, Annemieke, Farcy, Nadia, Hosten, Noel G. C., De Muynck, Hilde, De Clercq, Pierre J., Barry, John, and Davis, Anthony P. (1999), A novel sensitive colorimetric assay for visual detection of solid-phase-bound amines. *European Journal of Organic Chemistry*, 2787-2791.
- [229] Thaler, A., Seebach, D., and Cardinaux, F. (1991), Lithium-Salt Effects in Peptide-Synthesis .2. Improvement of Degree of Resin Swelling and of Efficiency of Coupling in Solid-Phase Synthesis. *Helvetica Chimica Acta* 74, 628-643.
- [230] Lobley, A., Whitmore, L., and Wallace, B. A. (2002), DICHROWEB: An Interactive Website for the analysis of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Data. *Bioinformatics* 18, 211-212.