

## Tesis de Posgrado

# Uso de bibliotecas sintéticas combinatorias para el desarrollo de vacunas y antirretrovirales para el tratamiento y prevención del SIDA

Boggiano, César

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en ciencias biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Boggiano, César. (2003). Uso de bibliotecas sintéticas combinatorias para el desarrollo de vacunas y antirretrovirales para el tratamiento y prevención del SIDA. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3617\\_Boggiano.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3617_Boggiano.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Boggiano, César. "Uso de bibliotecas sintéticas combinatorias para el desarrollo de vacunas y antirretrovirales para el tratamiento y prevención del SIDA". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3617\\_Boggiano.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3617_Boggiano.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**Tesis doctoral**  
**Universidad de Buenos Aires**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Uso de Bibliotecas Sintéticas Combinatorias**  
**para el Desarrollo de Vacunas y Antirretrovirales para el**  
**Tratamiento y Prevención del SIDA**

Autor: Lic. César Boggiano

Directora: Sylvie Blondelle Ph.D.

Desarrollado en: Torrey Pines Institute for Molecular Studies (TPIMS)  
3550 General Atomics Ct.  
San Diego, CA 92121  
EE.UU.

3617

Buenos Aires, Julio 2003

Dedicado a mis padres,

**Agradecimientos:**

A los pacientes

A la Dra. Sylvie Blondelle  
por su apoyo, estímulo  
y orientación en la realización de esta tesis.

A Carol Cowing, Gastón Picchio,  
Alejandro Colman Lerner, Virginia Novaro,  
Javier Niño y Rosita Moya  
por discusiones  
y sabios consejos.

Al Dr. Bruce Walker  
por los valiosos clones T.

Título:

Uso de Bibliotecas Sintéticas Combinatorias para el Desarrollo de Vacunas y Antirretrovirales para el Tratamiento y Prevención del SIDA

Resumen:

En el año 2002, 3 millones de personas murieron como consecuencia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y se estima que 5 millones se infectaron con el virus de la inmunodeficiencia adquirida humana (HIV). Hasta la fecha no existe un tratamiento que pueda erradicar la infección en todos los pacientes HIV<sup>+</sup> y tampoco una vacuna efectiva profiláctica o terapéutica. Las bibliotecas sintéticas combinatorias (BSCs) son colecciones de compuestos orgánicos, peptidomiméticos o peptídicos. Debido a su alta complejidad (miles a millones de compuestos diferentes) son excelentes herramientas para la identificación de compuestos capaces de alterar diferentes eventos biológicos. En primer lugar, se estudió la capacidad de las bibliotecas de inhibir el primer evento del ciclo replicativo de HIV-1, adsorción y entrada, en un sistema de fusión de membranas dependiente de HIV-1 Env y receptores celulares. Los compuestos individuales derivados de bibliotecas de piperazinas y triaminas, mostraron actividad inhibitoria de la fusión aunque con elevada toxicidad. También se identificaron D-decapéptidos capaces de inhibir en el rango micromolar, la replicación de cepas de laboratorio HIV-1 y un aislamiento clínico resistente a AZT. El mecanismo inhibitorio de la replicación involucra la entrada viral. Además, se descubrieron compuestos antagonistas de la quimiotaxis inducida por SDF-1 $\alpha$  en células CXCR4<sup>+</sup>, aunque este mecanismo no parece estar involucrado en la inhibición de la replicación. Por otra parte, una BSC de L-nonapéptidos fue utilizada para identificar inmunógenos naturales y sintéticos específicos para un clon de células T citotóxicas derivadas de un paciente HIV<sup>+</sup>. Se identificaron superagonistas capaces de estimular no sólo el clon original mejor que el péptido natural (Gag<sub>77-85</sub>), sino también clones con la misma especificidad aislados de otro paciente HIV<sup>+</sup>. También se identificaron por primera vez, secuencias derivadas de virus heterólogos que son capaces de estimular un clon específico para HIV-1 Gag<sub>77-85</sub>.

## Indice

*Página*

<u>Portada</u>	<u>i</u>
<u>Dedicatoria</u>	<u>ii</u>
<u>Agradecimientos</u>	<u>iii</u>
<u>Resumen</u>	<u>iv</u>
<u>Indice</u>	<u>v</u>
<b><u>Introducción general</u></b>	<b><u>1</u></b>
<u>Virus de la inmunodeficiencia adquirida humana</u>	<u>2</u>
<u>Ciclo de vida</u>	<u>2</u>
<u>Entrada</u>	<u>4</u>
<u>Reconocimiento de gp120 y correceptores</u>	<u>6</u>
<u>Tratamiento de la infección por HIV-1</u>	<u>7</u>
<u>Vacunas para HIV-1</u>	<u>8</u>
<u>Bibliotecas Sintéticas Combinatorias (BSC)</u>	<u>10</u>
<u>¿Qué son las BSCs?</u>	<u>10</u>
<u>¿Cómo se sintetizan las BSCs?</u>	<u>10</u>
<u>¿Cómo se identifican los compuestos individuales?</u>	<u>11</u>
<u>Objetivos</u>	<u>13</u>
<u>Bibliografía</u>	<u>14</u>
<b><u>Capítulo 1</u></b>	<b><u>17</u></b>
<b><u>Desarrollo de nuevos antagonistas de Anclaje-Fusión-Entrada (AFE) de HIV-1</u></b>	
<b><u>Introducción</u></b>	<b><u>18</u></b>
<b><u>Métodos</u></b>	<b><u>21</u></b>
<u>Medios de cultivo</u>	<u>21</u>
<u>Líneas celulares</u>	<u>21</u>
<u>Bibliotecas de pequeñas moléculas</u>	<u>21</u>
<u>Nomenclatura de los aminoácidos</u>	<u>22</u>
<u>Biblioteca peptídica</u>	<u>22</u>
<u>Ensayo de fusión de membranas</u>	<u>23</u>
<u>Ensayo de replicación</u>	<u>26</u>
<u>Ensayo de entrada con virus pseudotipado</u>	<u>27</u>

<u>Ensayo de toxicidad</u>	<u>28</u>
<u>Citometría de flujo</u>	<u>29</u>
<u>Ensayo de quimiotaxis</u>	<u>30</u>
<u>Prueba estadística de Mann Whitne</u>	<u>31</u>
<b><u>Resultados</u></b>	<b><u>32</u></b>
<u>Bibliotecas de triaminas y piperazinas</u>	
<u>Tamizado</u>	<u>32</u>
<u>Compuestos individuales de triamina</u>	<u>34</u>
<u>Compuestos individuales de piperazinas</u>	<u>34</u>
<u>Bibliotecas de D-decapéptidos</u>	
<u>Tamizado</u>	<u>35</u>
<u>Inhibición de la fusión de membranas</u>	<u>39</u>
<u>Inhibición de la replicación</u>	<u>40</u>
<u>Inhibición de la entrada viral con virus pseudotipados</u>	<u>41</u>
<u>Desplazamiento de anticuerpos para receptores celulares</u>	<u>43</u>
<u>Inhibición de la quimiotaxis</u>	<u>45</u>
<b><u>Discusión y conclusiones</u></b>	<b><u>46</u></b>
<b><u>Bibliografía</u></b>	<b><u>52</u></b>
<b><u>Capítulo 2</u></b>	<b><u>58</u></b>
<u>Disección de la especificidad de un clon T CD8<sup>+</sup> específico para HIV-1 Gag<sub>77-85</sub></u>	
<b><u>Introducción</u></b>	<b><u>59</u></b>
<b><u>Estrategia y Métodos</u></b>	<b><u>64</u></b>
<u>Nomenclatura de los aminoácidos</u>	<u>64</u>
<u>Medios de cultivo</u>	<u>64</u>
<u>Células presentadoras de antígeno</u>	<u>64</u>
<u>Clones T CD8<sup>+</sup></u>	<u>64</u>
<u>Ensayo de citotoxicidad</u>	<u>65</u>
<u>Biblioteca peptídica</u>	<u>66</u>
<u>Análisis biométrico</u>	<u>67</u>
<u>Estrategia</u>	<u>69</u>
<u>Predicción de la unión a HLA-A*0201</u>	<u>70</u>
<b><u>Resultados</u></b>	<b><u>71</u></b>
<u>Tamizado</u>	<u>71</u>

<u>Deconvolución de las mezclas más activas</u>	<u>74</u>
<u>Deconvolución del análisis biométrico</u>	<u>75</u>
<u>Actividad de péptidos individuales en el clon original</u>	<u>77</u>
<u>Actividad de péptidos individuales en diferentes clones</u>	<u>81</u>
<u>Optimización de péptidos</u>	<u>83</u>
<b><u>Discusión y conclusiones</u></b>	<b><u>85</u></b>
<b><u>Bibliografía</u></b>	<b><u>91</u></b>
<b><u>Conclusiones generales</u></b>	<b><u>96</u></b>



# **Introducción general**

### Virus de la inmunodeficiencia humana (HIV):

El virus de Inmunodeficiencia Adquirida Humana (HIV) es un lentivirus conocido en los últimos 20 años por su asociación con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)<sup>1</sup>. Los lentivirus constituyen una subfamilia de la familia *Retroviridae* la cual incluye un gran número de diferentes virus que infectan un diverso grupo de especies animales.<sup>2</sup>

El material genético de HIV está compuesto por dos moléculas idénticas de ácido ribonucleico (ARN) (+) de 9.8 kilobases, dentro de un core proteico de forma cónica rodeado por una membrana viral (bicapa lipídica) derivada de la célula huésped. Embebidas en esta membrana se encuentran las glicoproteínas (Env) organizadas en trímeros. Env está compuesta por dos sub-unidades: gp120, la sub-unidad externa que reconoce los receptores celulares; y gp41, la sub-unidad transmembrana que es capaz de insertarse en la membrana celular y promover la fusión de membranas. Una vez en el citoplasma, la ribonucleocápside se desorganiza y comienza la retrotranscripción del ARN por medio de la transcriptasa reversa con actividad ARNasa H, formando una molécula de ADN bicatenario. Estas moléculas de ADN migran al núcleo donde se integran al cromosoma celular. A partir de este provirus se generan ARN mensajeros y ARN genómico viral que más tarde integrarán nuevas partículas virales. Las proteínas de HIV son traducidas de los ARN mensajeros, algunas proteínas requieren reordenamiento (splicing) de la molécula de ARN original. Otras proteínas son traducidas como precursores de alto peso molecular y luego son cortadas por proteasas. En el caso de las glicoproteínas de membrana, el virus usa una proteasa celular, en cambio las proteínas del core se generan por acción de una proteasa viral. La nucleocápside es liberada a través de la membrana celular con la incorporación de las glicoproteínas de envoltura viral, presente en la superficie celular. (Fig. 1)

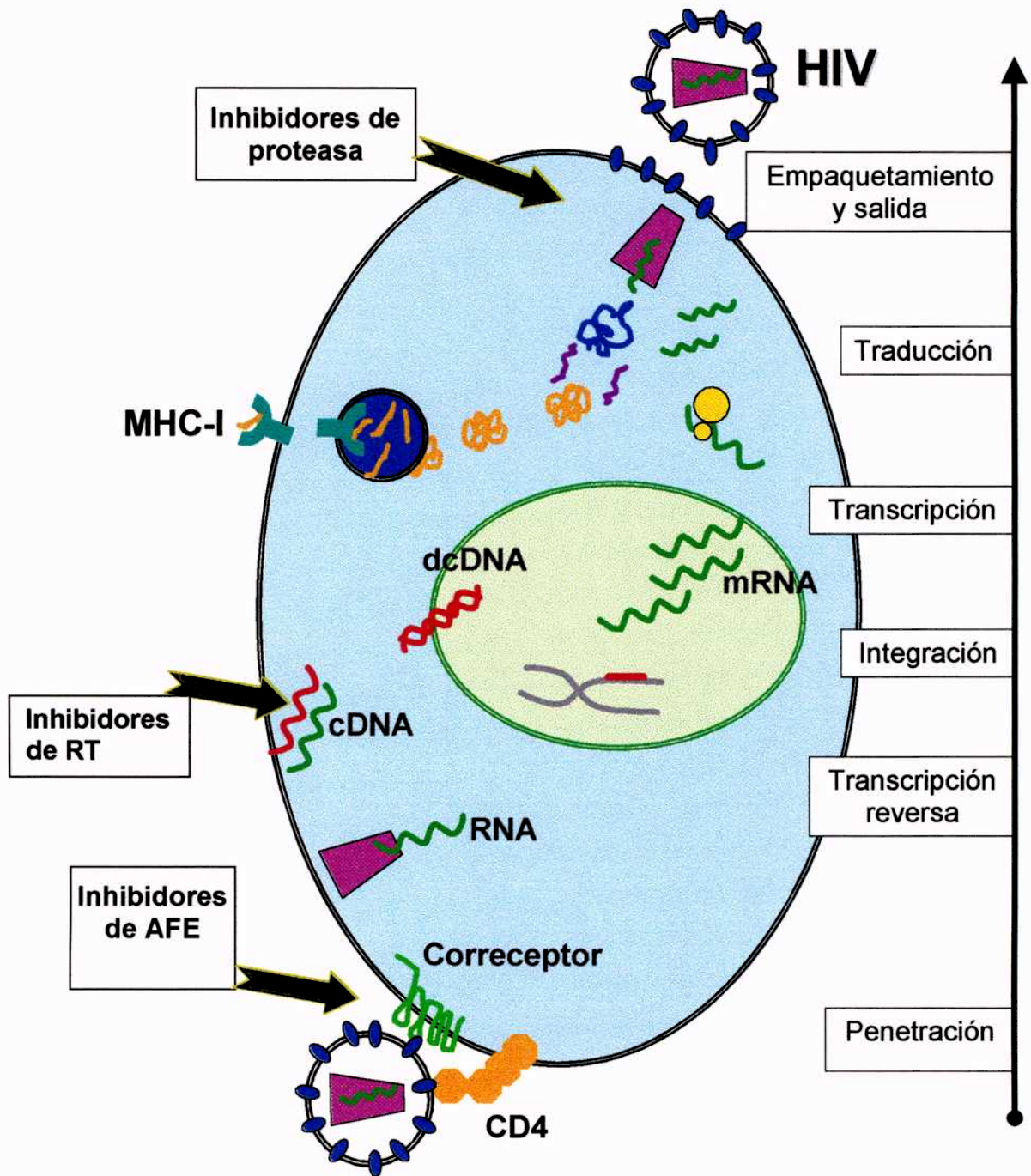
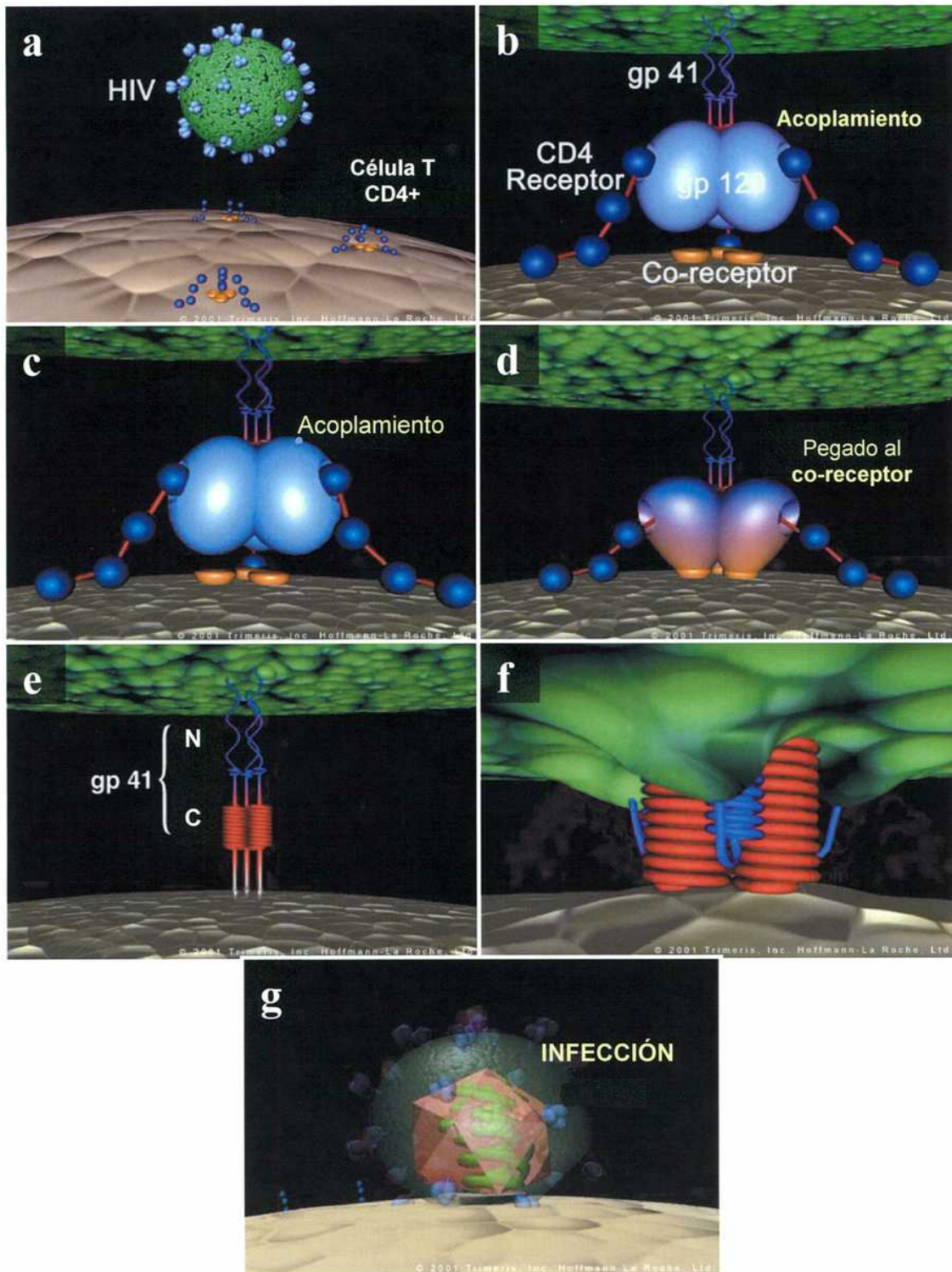


Figura 1: Ciclo de vida de HIV y puntos de intervención para su tratamiento

## Entrada de HIV:

La entrada de HIV-1 es el primer paso de la infección y comprende interacciones entre la glicoproteína de membrana virales y receptores celulares. La glicoproteínas de membrana gp120 y gp41 se encuentran no-covalentemente asociadas formando trímeros en la superficie del virión (Fig. 2a-b). La adsorción viral es consecuencia del reconocimiento de diferentes moléculas en la superficie viral: DC-SIGN, heparán sulfato, LFA-1 e ICAM-1<sup>3-4</sup>. Este evento, independiente de CD4 esta mediado por gp120 de HIV-1. Ha sido demostrada la importancia de estas moléculas tanto para la infección de células dendríticas como así también para la transferencia de partículas virales a células T CD4<sup>+</sup>. El reconocimiento específico de gp120 por CD4(Fig. 2c) dispara cambios conformacionales en la proteína viral que exponen el dominio de reconocimiento de los correceptores. La molécula CD4 se una a gp120 con mayor afinidad que su ligando natural, el Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (MHC-II) <sup>5</sup>. La zona de gp-120 que reconoce al correceptor está compuesto de residuos tanto variables como constantes y posee un centro hidrofóbico rodeado por una corona de carga positiva. La unión a los co-receptores(Fig. 2d) genera un nuevo cambio conformacional pero esta vez en gp41 <sup>6</sup>. El ectodominio de gp41 contiene dos hélices, una cerca del amino terminal (hélice N) y otra cerca del carboxi terminal (hélice C) (Fig. 2e). Cuando gp41 adopta la conformación fusogénica, las hélices N y C interaccionan en forma antiparalela, formando una horquilla. Así se provoca un acercamiento entre las regiones amino y carboxi del ectodominio que facilita la yuxtaposición de las membranas viral y celular y la concomitante fusión (Fig. 2f-g) <sup>7</sup>.

Figura 2.



### Reconocimiento de gp120 y correceptores:

Los receptores de quimioquinas CC o CXC, de la familia de receptores acoplados a proteína G con siete dominios transmembrana, actúan como correceptores de HIV-1 tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>6</sup>; específicamente, CCR5 y CXCR4 son los más utilizados en la mayoría de los aislamientos clínicos. El uso selectivo de CCR5 y/o CXCR4 determina en la mayoría de los casos el tropismo celular de diferentes aislamientos virales. CCR5 es el correceptor principal y persiste durante casi toda la infección (aislamientos R5). La aparición de variantes virales que usan CXCR4 o ambos correceptores se encuentra asociada a una marcada reducción en células CD4<sup>+</sup> y el concomitante avance de la enfermedad.

El reconocimiento de gp120 y CCR5 fue estudiado extensivamente con quimeras que comprende dominios de CCR5 y otros receptores como CCR5 murino y CCR2b que no median la entrada de HIV-1. Se determinó que varios dominios de CCR5 contribuyen directamente con su actividad de correceptor, destacándose el rol privilegiado del dominio amino-terminal (Nt). Con estudios de mutagénesis dirigida, se determinó que la presencia de aminoácidos con cargas negativas y tirosinas en CCR5 Nt (aspártico-2, tirosina-3, tirosina-10, aspártico-11, tirosina-14, tirosina-15 y glutámico-18) son importantes para la entrada viral dependiente de CCR5. La sulfatación de estas tirosinas es determinante para la interacción entre CCR5 y gp120 y la entrada viral. Péptidos derivados de CCR5 Nt ricos en sulfotirosinas, pero no tirosinas o fosfotirosinas se unen específicamente al complejo gp120-CD4. Otros dominios de CCR5 tienen funciones que son necesarias para que la entrada y fusión viral se concrete, expresando sitios de unión secundarios a CCR5 y/o sitios necesarios para la oligomerización de CCR5<sup>8</sup>.

En estudios de quimera y mutaciones puntuales de CXCR4 se determinó que Nt y el segundo rulo extracelular son esenciales para la función de correceptor, pero no son usados uniformemente por diferentes aislamientos



virales de HIV-1 y HIV-2. CXCR4 con mutaciones en los residuos con carga Asparragina-193, Arginina-183 y Arginina-188 en el segundo rulo extracelular, pierde la capacidad de mediar la entrada viral. También mutaciones en Nt abolieron la entrada viral<sup>9</sup>, donde sustituciones en aminoácidos con carga negativa y tirosinas deprimieron la entrada viral, similarmente a lo observado en las mutantes de Nt de CCR5<sup>10</sup>.

### Tratamiento de la infección por HIV-1

En la actualidad es de consenso general que el efecto de la asociación de dos o más medicamentos antirretrovirales es superior al empleo de uno sólo (monoterapia), e incluso que el tratamiento combinado con tres drogas es superior a la combinación de sólo dos. No existen sin embargo estudios claros que demuestren cuál es la combinación de antirretrovirales más idónea. Se están utilizando combinaciones de 2 inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos solos o combinados con un inhibidor de la proteasa. Las combinaciones que se utilizan en la actualidad son numerosas; muchas de ellas incluyen 3TC con otro inhibidor de la transcriptasa o con un inhibidor de la proteasa; algunas combinaciones mantienen AZT o d4T por su buena penetración en el sistema nervioso central. También se están ensayando combinaciones diferentes de 2 inhibidores de la proteasa. La evolución de los marcadores de progresión, especialmente la carga viral y el número de linfocitos CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> de sangre, y los tratamientos con antirretrovirales que previamente haya recibido son de trascendental importancia en el momento de decidir cuál es la terapia apropiada para un paciente<sup>11</sup>. Desde el comienzo del uso de las drogas que antagonizan específicamente la transcriptasa reversa y la proteasa viral, las muertes por HIV han declinado marcadamente<sup>12</sup>. Además del costo del tratamiento combinado, existe una acentuada preocupación por la aparición de cepas resistentes a estas drogas, como así también por los efectos a largo plazo del uso de los inhibidores de proteasa, específicamente, debido a la pobremente elucidada alteración en el metabolismo de lípidos.

El tratamiento con estas drogas aún no puede erradicar el virus permanentemente en todos los pacientes, por lo tanto es necesario generar nuevos compuestos que permitan tratamientos a largo plazo minimizando efectos colaterales en los pacientes. Nuevas drogas están siendo desarrolladas para bloquear diferentes pasos del ciclo viral. Por ejemplo: inhibidores de entrada y fusión, desnudamiento del virión, retrotranscripción, actividad de ARNasa, importación al núcleo del ADN, integración del ADN y clivaje de proteínas por la proteasa viral <sup>13</sup> (Figura 1). En marzo de 2003 fue aprobada por el Food and Drug Administration (FDA) la primera droga que antagoniza la entrada de HIV-1, un polipéptido de 36 amino ácidos, llamado T20, que debe ser inyectado dos veces al día <sup>13</sup>.

#### Vacunas para HIV:

Más allá de los grandes avances en el tratamiento antirretroviral de pacientes HIV<sup>+</sup>, el desarrollo de una vacuna que permita prevención y tratamiento es inminente para una efectiva intervención global.

Actualmente, diferentes tipos de estrategias son usados para el desarrollo de vacunas para HIV. Todas ellas buscan generar una respuesta inmune específica para las proteínas de HIV. Esta respuesta inmune puede ser mediada por anticuerpos neutralizantes, virólisis, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y/o citotoxicidad producida por células T. Para generar esta respuesta inmune se usan partículas (virus inactivado o pseudo-virus), proteínas recombinantes, péptidos sintéticos, vectores virales y bacterianos recombinantes (vaccinia Ankara modificado (MVA), canarypox, fowlpox, adenovirus, Semiliki Forest Virus, Salmonella, VSV, Venezuelan Equine Encephalitis, etc), virus vivos atenuados, inmunización mediada por ADN y también combinaciones de proteínas y vectores, ambos recombinantes.<sup>14</sup> Sin embargo, la frecuencia y potencia de la respuesta humoral y celular generada por estas vacunas no es suficiente para controlar la infección o prevenir nuevas infecciones <sup>15</sup>.



A principios de 2003 se conocieron los primeros resultados del primer estudio clínico de fase III de una vacuna para HIV. El principal componente de esta vacuna, llamada AidsVax, es gp120 producida en células de ovario de hámster genéticamente modificadas. Fue diseñada para generar anticuerpos neutralizantes dirigidos contra la proteína de envoltura de sólo dos cepas de subtipo B, el cual es el más prevalente en Norteamérica y Europa. En Argentina, se encuentra polarizado entre subtipo B en hombres que tienen sexo con hombres y el subtipo F que es más prevalente en hombres y mujeres heterosexuales <sup>16</sup>. AidsVax fue ensayada en un grupo de más de 5000 individuos HIV negativos. Los resultados sugieren que la vacuna falló en reducir significativamente el número de infecciones en el grupo vacunado comparado con el grupo placebo.

Ha sido demostrado en reiteradas oportunidades que la respuesta inmune llevada a cabo por células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas (CTC) es de vital importancia para el control de la infección por HIV <sup>17</sup>. Por ejemplo, el 5% de la cohorte de prostitutas de Nairobi que se mantienen seronegativas, presentan una fuerte respuesta de CTCs <sup>18</sup>. Otras evidencias de la importancia de la respuesta inmune celular están dadas por la coincidencia en la aparición de CTCs y la desaparición de la viremia en la primer fase de la infección y más tarde, la desaparición de CTCs correlaciona con el avance final de la enfermedad <sup>19,20</sup>. Por otra parte, el aislamiento de mutantes de escape de CTCs, también demuestra que la respuesta inmune celular puede constreñir la replicación viral <sup>21</sup>. Recientemente, en un estudio de drogadictos endovenosos, expuestos mas no infectados, se detectó la presencia de una respuesta celular CD8<sup>+</sup> que correlaciona con la continua protección contra el virus <sup>22</sup>. Por lo tanto la inducción de una respuesta celular fuerte y sostenida es de capital importancia para el desarrollo de una vacuna efectiva para la prevención y tratamiento de la infección por HIV.

## **Bibliotecas sintéticas combinatorias**

### **¿Qué son las bibliotecas sintéticas combinatorias (BSC) ?**

Las BSCs son colecciones de compuestos orgánicos, peptidomiméticos o peptídicos que pueden ser ensayados como mezclas. Los compuestos individuales que conforman cada mezcla, no se encuentran anclados a ningún soporte sólido. Por lo tanto, el uso de estas bibliotecas es comparable a la búsqueda de compuestos activos en extractos naturales o en sobrenadantes de cultivos. Las bibliotecas peptídicas usan aminoácidos como unidades de síntesis y de diversidad, el número de residuos en cada colección es constante (biblioteca 4-mer, biblioteca 5-mer, etc.). Por otra parte, las bibliotecas peptidomiméticas, fueron generadas modificando enlaces peptídicos por alquilación y/o reducción, aumentando de esta manera la diversidad<sup>23,24-26</sup>. Las bibliotecas heterocíclicas fueron generadas ante la necesidad de descubrir nuevos compuestos de bajo peso molecular que sean capaces de ser incorporados vía oral y/o cruzar la barrera hematoencefálica.

### **¿Cómo se sintetizan las bibliotecas sintéticas combinatorias?**

El método utilizado para la síntesis de las BSCs, se denomina "bolsas de té", desarrollado originalmente por el Dr. Houghten<sup>27</sup>. La resina, el soporte sólido, se introduce dentro de una bolsa de polipropileno, (malla 74µm) que permite la entrada y salida de los reactivos y disolventes utilizados durante la síntesis. El procedimiento de síntesis consiste en realizar etapas sucesivas de lavados y desprotección del grupo  $\alpha$ -amino. Al final de la síntesis se procede a la escisión de los compuestos anclados a la resina utilizando un sistema de escisión múltiple de HF anhidro. Cada mezcla de la biblioteca que incluye miles a millones de compuestos individuales requiere de una bolsa de té para su síntesis.

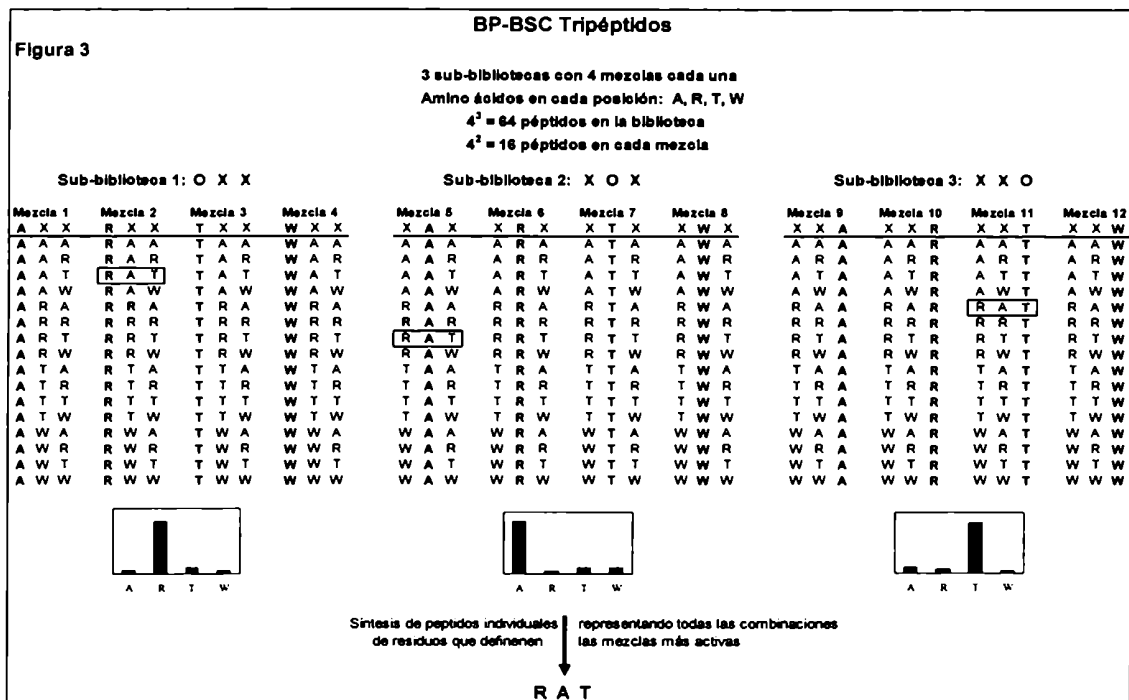
Los diferentes residuos deben ser incorporados durante la síntesis de manera equimolar. Para solucionar este problema se deben ajustar las

proporciones relativas de los diferentes compuestos a incorporar, añadiendo en la reacción una mayor cantidad de los residuos que se acoplan más lentamente.

Este método permite obtener alto número de compuestos en una única síntesis. Los ensayos biológicos se realizan con estas mezclas de compuestos. Luego de conocer qué mezclas son activas se procede a la deconvolución de la información usando un sistema de Barrido Posicional (BP), detallado a través de un ejemplo en la próxima sección.

### ¿Cómo se identifican los compuestos individuales?

Para poder identificar compuestos individuales dentro de las mezclas, se usa el formato de Barrido Posicional de BSC's (BP-BSC) <sup>28</sup> que consiste en organizar las bibliotecas de tal forma que una posición está definida y las otras n posiciones están compuestas por mezclas. Por lo tanto al hacer el BP se desenmascara cuales son los residuos óptimos en cada respectiva posición de la molécula. Para ilustrar la estrategia de barrido posicional, en la figura 3, se encuentra descrita una BP-BSC compuesta de tripéptidos. Cuatro diferentes aminoácidos (A, R, T y W) son incorporados en cada una de las tres diferentes posiciones. La diversidad entonces es 64 ( $4^3=64$ ). En cambio, cuando organizamos los mismos péptidos bajo una forma de BP queda reducido a sólo 12 mezclas (4 aminoácidos X 3 posiciones). Cada una de ellas compuesta por 16 péptidos individuales, tal como se muestra debajo de cada mezcla en la figura 3. La posición O está definida con uno de los 4 aminoácidos mientras que las otras dos posiciones son mezclas (X) de los mismos 4 aminoácidos. (Fig. 3)



En este ejemplo asumimos que RAT es el tripéptido más activo. En cada una de las tres sub-bibliotecas (OXX, XOX y XXO) RAT es responsable de la actividad medida. En consecuencia, RXX en la primera sub-biblioteca, XAX en la segunda y XXT en la tercera, serán las mezclas que mostrarán actividad. Entonces de acuerdo a los principios de selección de BP, R será el residuo elegido para la primera posición, A para la segunda y T para la tercera. Así, RAT será el péptido óptimo para la actividad medida. En la mayoría de los casos, más de una mezcla suele producir actividad, para una determinada posición. Por ejemplo si la mezcla número 12 (XXW) hubiese producido señal (W definida en la tercera posición), dos serían los péptidos a sintetizar: RAT y RAW. Este es un sencillo ejemplo de la organización de BP-BSC y la identificación de ligandos activos. El concepto descrito es aplicable a todas la BSC ordenadas en formato de Barrido Posicional, es decir con posiciones definidas y variables.

Para cumplir con los objetivos del trabajo se utilizarán diferentes bibliotecas de acuerdo a la necesidad de cada uno de los ensayos, todas ellas ordenadas en formato de BP.

## Objetivos

El principal objetivo de esta tesis es descubrir nuevos compuestos que sirvan para controlar y/o prevenir la infección por HIV usando bibliotecas sintéticas combinatorias.

En el primer capítulo se describe el uso de bibliotecas combinatorias para identificar inhibidores del evento de AFE de HIV<sup>29</sup>. Para obtener estos nuevos compuestos, se utilizó un ensayo de fusión de membranas basado en proteínas recombinantes expresadas por diferentes virus vaccinia. El sistema utiliza un gen reportero *Lac Z* que se activa cuando se produce la fusión entre las células efectoras y blanco. Estos nuevos compuestos, no sólo aportarán información sobre la interacción entre las proteínas virales de membrana, sus receptores y correceptores, sino también podrán ser utilizados terapéuticamente para el tratamiento de la infección por HIV.

Por otra parte, en el segundo capítulo del trabajo se utilizan bibliotecas combinatorias peptídicas (9mer) para diseccionar la especificidad de un clon CTLs CD8+ específicas para HIV-1 Gag77-85. Este clon reconoce específicamente células infectadas con HIV y fue aislado de un paciente HIV<sup>+</sup>. De esta manera se busca identificar péptidos naturales y sintéticos capaces de inducir una respuesta inmune más fuerte y duradera que la que se produce en la mayoría de los individuos HIV<sup>+</sup>.

## Bibliografia

1. 2000. The Durban Declaration. *Nature* **406**:15-16.
2. **Coffin, J. M.** 1992. Structure and classification of retroviruses *In* J. A. Levy (ed.), *The retroviridae*, Vol 1. Plenum Press, New York.
3. **Hioe, C. E., P. C. Chien, Jr., C. Lu, T. A. Springer, X. H. Wang, J. Bandres, and M. Tuen.** 2001. LFA-1 expression on target cells promotes human immunodeficiency virus type 1 infection and transmission. *J Virol.* **75**:1077-1082.
4. **Hioe, C. E., L. Bastiani, J. E. Hildreth, and S. Zolla-Pazner.** 1998. Role of cellular adhesion molecules in HIV type 1 infection and their impact on virus neutralization. *AIDS Res Hum. Retroviruses* **14 Suppl 3**:S247-S254.
5. **Lasky, L. A., G. Nakamura, D. H. Smith, C. Fennie, C. Shimasaki, E. Patzer, P. Berman, T. Gregory, and D. J. Capon.** 1987. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type I gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell* **50**:975-985.
6. **Berger, E. A.** 1997. HIV entry and tropism: The chemokine receptor connection. *AIDS* **11**:S3-S16.
7. **Sattentau, Q. J. and J. P. Moore.** 1991. Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J. Exp. Med.* **174**:407-415.
8. **Dragic, T.** 2001. An overview of the determinants of CCR5 and CXCR4 co-receptor function. *J Gen. Virol.* **82**:1807-1814.
9. **Lin, G., F. Baribaud, J. Romano, R. W. Doms, and J. A. Hoxie.** 2003. Identification of gp120 binding sites on CXCR4 by using CD4-independent human immunodeficiency virus type 2 Env proteins. *J Virol.* **77**:931-942.
10. **Brelot, A., N. Heveker, M. Montes, and M. Alizon.** 2000. Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine receptor activities. *J.*
11. **Dybul, M., A. S. Fauci, J. G. Bartlett, J. E. Kaplan, and A. K. Pau.** 2002. Guidelines for using antiretroviral agents among HIV-infected adults and adolescents. *Ann. Intern. Med* **137**:381-433.
12. **Palella, F. J., Jr., K. M. Delaney, A. C. Moorman, M. O. Loveless, J. Fuhrer, G. A. Satten, D. J. Aschman, and S. D. Holmberg.** 1998. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N. Engl. J Med* **3**:853-860.
13. **Moore, J. P. and M. Stevenson.** 2000. New Targets for inhibitors of HIV-1 replication. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **1**:40-49.
14. **Norley, S. and R. Kurth.** 1996. AIDS vaccination, p. 533-558. *In* S. H. E. Kaufmann (ed.), *Concepts in Vaccine Development*. Walter de Gruyter, New York, NY.
15. **Johnston, M. I. and J. Flores.** 2001. Progress in HIV vaccine development. *Curr. Opin. Pharmacol.* **1**:504-510.

16. **Avila, M. M., M. A. Pando, G. Carrion, L. M. Peralta, H. Salomon, M. G. Carrillo, J. Sanchez, S. Maulen, J. Hierholzer, M. Marinello, M. Negrete, K. L. Russell, and J. C. Carr.** 2002. Two HIV-1 epidemics in Argentina: different genetic subtypes associated with different risk groups. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **29**:422-426.
17. **Brander, C. and B. D. Walker.** 1999. T lymphocyte responses in HIV-1 infection: Implications for vaccine development. *Curr. Opin. Immunol.* **11**:451-459.
18. **Rowland-Jones, S. L., T. Dong, K. R. Fowke, J. Kimani, P. Krausa, H. Newell, T. Blanchard, K. Ariyoshi, J. Oyugi, E. Ngugi, J. Bwayo, K. S. MacDonald, A. J. McMichael, and F. A. Plummer.** 1998. Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi. *J. Clin. Invest.* **102**:1758-1765.
19. **Klein, M. R., C. A. van Baalen, A. M. Holwerda, S. R. Kerhof Garde, R. J. Bende, I. P. M. Keet, J. K. M. Eeftink-Schattenkerk, A. D. Osterhaus, H. Schuitemaker, and F. Miedema.** 1995. Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during clinical course of HIV-1 infection: A longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *J. Exp. Med.* **181**:1365-1372.
20. **Carmichel, A., X. Jin, P. Sissons, and L. Borysiewicz.** 1993. Quantitative analysis of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response at different stages of HIV-1 infection: Differential CTL responses to HIV-1 and Epstein-Barr Virus in late disease. *J. Exp. Med.* **177**:249-256.
21. **Borrow, P., H. Lewicki, X. Wei, M. S. Horwitz, N. Pfeffer, H. Meyers, J. A. Nelson, J. E. Gairin, B. H. Hahn, M. B. A. Oldstone, and G. M. Shaw.** 1997. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat. Med.* **3**:205-211.
22. **Makedonas, G., J. Bruneau, H. Lin, R. P. Sekaly, F. Lamothe, and N. F. Bernard.** 2002. HIV-specific CD8 T-cell activity in uninfected injection drug users is associated with maintenance of seronegativity. *AIDS* **16**:1595-1602.
23. **Ostresh, J. M., G. M. Husar, S. E. Blondelle, B. Dörner, P. A. Weber, and R. A. Houghten.** 1994. "Libraries from libraries": Chemical transformation of combinatorial libraries to extend the range and repertoire of chemical diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:11138-11142.
24. **Dörner, B., J. M. Ostresh, G. M. Husar, and R. A. Houghten.** 1996. Generation of peralkylated peptidomimetic combinatorial libraries. *Methods Mol. Cell. Biol.* **6**:35-40.
25. **Cuervo, J. H., F. Weigl, J. M. Ostresh, V. T. Hamashin, A. L. Hannah, and R. A. Houghten.** 1995. Polyalkylamine chemical combinatorial libraries, p. 465-466. *In* H. L. S. Maia (ed.), *Peptides 94: Proceedings of the 23rd European Peptide Symposium*. ESCOM, Leiden.
26. **Nefzi, A., J. M. Ostresh, J.-P. Meyer, and R. A. Houghten.** 1997. Solid phase synthesis of heterocyclic compounds from linear peptides: Cyclic ureas and thioureas. *Tetrahedron Lett.* **38**:931-934.
27. **Houghten, R. A.** 1985. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:5131-5135.

28. **Pinilla, C., J. R. Appel, P. Blanc, and R. A. Houghten.** 1992. Rapid identification of high affinity peptide ligands using positional scanning synthetic peptide combinatorial libraries. *Biotechniques* **13**:901-905.
29. **Nussbaum, O., C. C. Broder, and E. A. Berger.** 1994. Fusogenic mechanisms of enveloped-virus glycoproteins analyzed by a novel recombinant vaccinia virus-based assay quantitating cell fusion-dependent reporter gene activation. *J. Virol.* **68**:5411-5422.



# **Capítulo 1**

## **Desarrollo de nuevos antagonistas de Anclaje-Fusión-Entrada (AFE) de HIV-1**

## Introducción

La mayoría de las terapias para el control de la infección por HIV-1 están dirigidas hacia la transcriptasa reversa (RT) y la proteasa viral. Por lo tanto, es necesario el descubrimiento de nuevas drogas que bloqueen la inhibición de otros pasos del ciclo de vida del virus. Esta necesidad de nuevas terapias antirretrovirales se refuerza por el hecho de que los inhibidores de RT y proteasa no pueden erradicar totalmente HIV-1 en todos los pacientes infectados <sup>1</sup>, como así también por sus efectos colaterales y la creciente transmisión de cepas resistentes <sup>2,3</sup>.

El anclaje y fusión son los primeros eventos del ciclo infeccioso de HIV-1. Los inhibidores de AFE, pueden actuar directamente desorganizando el complejo formado por gp120/CD4/correceptor, como así también impidiendo los cambios conformacionales en el complejo trimérico de gp41 <sup>4-6</sup>. En los últimos años varios inhibidores de AFE para HIV-1 han sido descritos. Éstos incluyen compuestos polianiónicos <sup>7</sup>, derivados de lectinas <sup>8</sup>, de albúmina <sup>9</sup>, de triterpenos <sup>10</sup>; como así también, péptidos lineares <sup>11-16</sup> o pseudopéptidos, modificados para presentar una estructura más rígida <sup>17</sup>. También han sido descubiertos inhibidores específicos de la interacción entre gp120 y los correceptores. Inhibidores de la interacción de gp120 con CXCR4 incluyen compuestos de características catiónica, ALX 40-4C (poli-9 D-arginina) <sup>18</sup>, AMD3100 <sup>19</sup>, D-péptidos derivados de SDF-1 $\alpha$ <sup>20</sup>, el L-péptido T22 (RRWCYRKGYYCYRKCR) <sup>21</sup> y un L-decapéptido (LGRFKHTDACCRTHD) derivado del veneno de abejas<sup>22</sup>. La interacción con CCR5 también puede ser bloqueada con: AOP-Rantes <sup>23</sup>, una quiomioquina modificada; PRO 140 <sup>24</sup>, un anticuerpo monoclonal; Tak-779 <sup>25</sup> o SCH-351125 <sup>26</sup>. Por otra parte, T20, un péptido compuesto por 36 L-aminoácidos derivado de gp41 previene los cambios conformacionales <sup>27</sup> necesarios para la fusión de la membrana celular con la viral impidiendo la interacción de las regiones N y C de gp41. T20 es un potente inhibidor de la replicación de HIV-1 *in vitro* <sup>11</sup> e *in vivo*. En pacientes HIV-1<sup>+</sup>, la terapia antirretroviral con T20 redujo los niveles de replicación a niveles

indetectables <sup>27</sup>. Además, su efectividad también fue demostrada en estudios clínicos que incluyeron pacientes HIV-1<sup>+</sup> infectados con cepas resistentes a inhibidores de proteasa y/o inhibidores de la transcriptasa reversa. El estudio TORO 2 (T-20 vs. sOlo Régimen Optimizado 2) comparó la efectividad de T-20 en conjunto con una terapia optimizada de inhibidores de proteasa y de transcriptasa reversa para cada paciente versus la terapia optimizada sola. Los pacientes que recibieron T-20 además de una terapia optimizada con antirretrovirales, presentaron reducción significativa en la carga viral y un incremento significativo en el número de células T CD4<sup>+</sup>, comparado con el grupo que recibió solamente la terapia optimizada <sup>28</sup>. Estos resultados clínicos refuerzan el interés por el descubrimiento de nuevos antirretrovirales inhibidores del AFE de HIV-1, ya que presentan efectividad aún en pacientes con cepas resistentes a otros antirretrovirales.

Ha sido demostrado que compuestos de bajo peso molecular son capaces de inhibir el proceso de AFE de HIV-1. La estructura cristalina de gp41 contiene tres importantes concavidades que pueden acomodar moléculas de aproximadamente 500 Daltons que bloquean la fusión de HIV-1 <sup>29</sup>. Recientemente, fueron también descubiertos, pequeños bolsillos dentro de la región transmembrana del correceptor CCR5, donde encastra TAK-779, un inhibidor de la formación del complejo gp120/CD4/CCR5 <sup>30,31</sup>. La mayoría de las drogas usadas clínicamente tienen un peso molecular menor a 1000 Daltons y muchas de ellas contienen múltiples funcionalidades amino <sup>32</sup>. En Torrey Pines Institute se han desarrollado diferentes bibliotecas de pequeñas moléculas derivadas de poliaminas sintetizadas en fase sólida. Dos de ellas, con estructura central de di-etilen-triamina o 2,3 di-oxo-piperazina 1,4,5-trisustituída <sup>33,34</sup>, con peso molecular de aproximadamente 500 Daltons, fueron usadas en este proyecto para el descubrimiento de nuevos inhibidores de la entrada de HIV-1. También debido al suceso clínico obtenido con el tratamiento con el péptido T20 de 36 L-aminoácidos, se usó una biblioteca de decapeptidos compuesta por D-aminoácidos. Una de las principales ventajas cuando se consideran D-péptidos

como potenciales agentes terapéuticos es su mayor biodisponibilidad debido a la resistencia a la degradación por proteasas en contraposición con L-péptidos. Hasta la fecha, T20 es la droga más cara para el tratamiento de HIV-1 con un costo de U\$D 20.000 por año. Debido a su longitud, su síntesis y purificación es cara y laboriosa. Por lo tanto, D-decapéptidos, por su reducido tamaño, son excelentes candidatos para el descubrimiento de nuevos compuestos terapéuticos con menor costo de producción <sup>35</sup>.

En este capítulo se describe el tamizado de diferentes bibliotecas peptídicas y no peptídicas con el objetivo identificar inhibidores de AFE de HIV-1. Se utilizaron dos sistemas de fusión de membranas dependientes de HIV-1 Env, uno con fusión dependiente de CD4-CXCR4 y el otro dependiente de CD4-CCR5. CCR5 y CXCR4 son receptores de quimioquinas, tienen siete dominios transmembrana y se encuentran acoplados a proteína G. CCR5 y CXCR4 son los correceptores observados más frecuentemente en aislamientos virales clínicos. Por lo tanto, usando ambos ensayos de fusión de membranas dependientes de gp120/CD4/CCR5 y gp120/CD4/CXCR4, para el tamizado permitirá identificar compuestos que bloquean los diferentes pasos de la entrada de HIV-1 desde la adsorción hasta la fusión de las membranas.

## **Métodos:**

### **Medios de cultivo**

**DMEM-8:** Dulbecco Modified Eagle Media suplementado con 8% suero fetal bovino, 2mM L-glutamina, 10mM HEPES, 50 $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoetanol, 5U/ml penicilina y 50 $\mu$ g/ml estreptomycin. **DMEM-2.5**, tiene la misma composición pero con sólo 2.5% de suero fetal bovino.

**RPMI-10:** RPMI 1640 suplementado con 10% suero fetal bovino, 2mM L-glutamina, 10mM HEPES, 50 $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoetanol, 5U/ml penicilina y 50 $\mu$ g/ml estreptomycin.

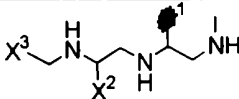
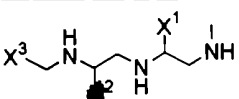
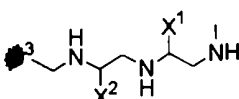
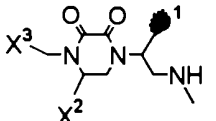
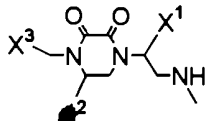
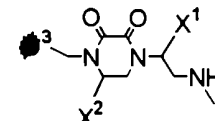

### **Líneas celulares**

HeLa, HeLa CD4<sup>+</sup> <sup>36</sup>, U87 CD4<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup>, U87 CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> <sup>37</sup> fueron obtenidas del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. 293T y HOS-CCR5 <sup>38</sup> fueron gentilmente proveídas por el Dr. Landau (Salk Institute). CCRF-CEM fueron compradas del American Type Culture Collection (ATCC). DMEM-8 fue utilizado para expandir las diferentes líneas celulares.

### **Bibliotecas de pequeñas moléculas:**

Di-etilen-triamina o 2,3 di-oxo-piperazina 1,4,5-trisustituída fueron usadas como esqueletos para construir dos bibliotecas de pequeñas moléculas (peso molecular ~500 daltons). En las posiciones de diversidad R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> fueron acoplados 29 y 27 aminoácidos (naturales y sintéticos), respectivamente (Tabla 1). En cambio para la posición R<sup>3</sup> fueron elegidos 40 ácidos carboxílicos. Cada biblioteca contiene 31.320 (29X27X40) compuestos individuales, agrupados en forma diferente en tres sub-bibliotecas, cada una integrada por los mismos 31.320 compuestos. Fueron tamizados un total de 96 mezclas (29+27+40) por biblioteca. Todos los compuestos de la biblioteca se encuentran en suspensión, en aproximadamente la misma concentración <sup>39</sup> y en formato de barrido

posicional <sup>40</sup>, tal como fue descrito en la introducción general.

Tabla 1. Bibliotecas no peptídicas.			
BP-BSC	Sub-biblioteca 1	Sub-biblioteca 2	Sub-biblioteca 3
di-etilen-triamina			
2,3 di-oxo-piperazina 1,4,5-trisustituída			
Número de mezclas	29	27	40
Número de compuestos por mezcla	27 x 40 = 1,080	29 x 40 = 1,160	27 x 29 = 783
<p><sup>n</sup> representa una funcionalidad definida, común a todos los compuestos presentes en una mezcla; X<sup>n</sup> representa una mezcla aproximadamente equimolar de todas las funcionalidades usadas para construir la biblioteca en una posición determinada.</p>			

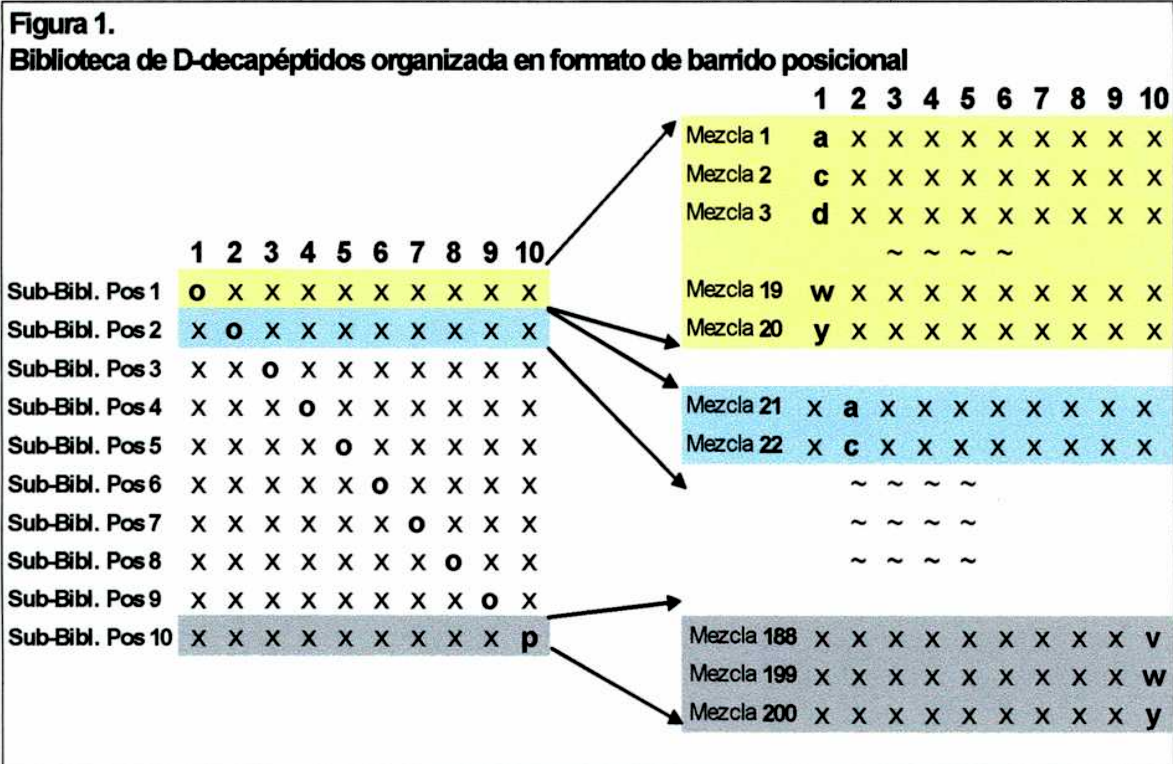
### Nomenclatura de los aminoácidos:

Para este trabajo se utilizó el código de una letra para denominar a los 20 aminoácidos naturales, en su conformación dextro-giro, se utilizaron letras minúsculas para diferenciarlos de los L-aminoácidos: **a**, D-alanina; **c**, D-cisteína; **d**, D-ácido aspártico; **e**, D-ácido glutámico; **f**, D-fenilalanina; **g**, glicina; **h**, D-histidina; **i**, D-isoleucina; **k**, D-lisina; **l**, D-leucina; **m**, D-metionina; **n**, D-asparagina; **p**, D-prolina; **q**, D-glutamina; **r**, D-arginina; **s**, D-seña; **t**, D-treonina; **v**, D-valina; **w**, D-triptofano e **y**, D-tirosina.

### Biblioteca peptídica (OX<sub>9</sub>):

La Biblioteca Sintética Combinatoria (BSC) de D-decapéptidos, está organizada también en formato de barrido posicional (BP) y está compuesta por 10 sub-bibliotecas. Cada una de ellas consiste en 20 mezclas separadas con una posición definida "o" y nueve posiciones no definidas "x" (oxxxxxxxx-NH<sub>2</sub> to xxxxxxxxo-NH<sub>2</sub>), en total de 200 (10X20) mezclas (Figura 1) <sup>40</sup>. Todos los 20 aminoácidos naturales en su conformación D, fueron usados en las posiciones definidas "o", sin embargo D-cisteína fue omitida en las posiciones no definidas

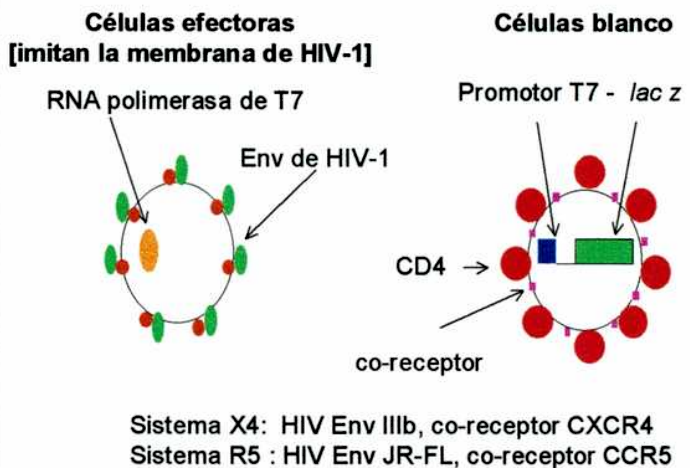
"x". Así, cada mezcla contiene  $19^9=3.2 \times 10^{11}$  diferentes decapeptidos individuales, cada uno presente en aproximadamente la misma concentración (5.2fM). La BP-BSC (10mer) contiene en total  $6.4 \times 10^{12}$  ( $20 \times 19^9$ ) diferentes decapeptidos. Cada péptido se encuentra acetilado en el amino-terminal y amidado en el carboxi-terminal.



Ensayo de fusión de membranas:

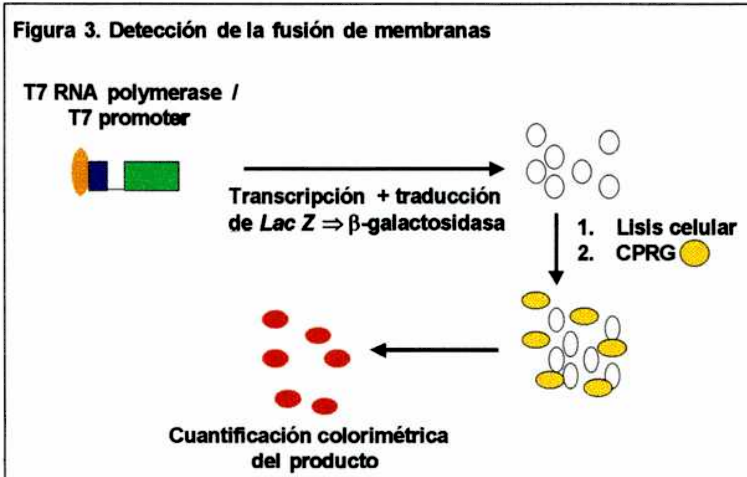
Para poder identificar inhibidores de la entrada de HIV-1 se utilizó un sistema de fusión dependiente de las proteínas Env de HIV-1

**Figura 2. Ensayo de fusión de membranas dependiente de Env HIV-1**





desarrollado por el Dr. Berger <sup>41</sup>. Este sistema consiste en dos diferentes poblaciones celulares; las efectoras que expresan HIV-1 gp120-gp41 y las células blanco que expresan CD4 y el correspondiente correceptor (CCR5 o CXCR4) (Figura 2). Cuando estas poblaciones entran en contacto luego del reconocimiento específico entre proteínas virales y receptores, se produce la fusión de las membranas. Dos diferentes genes *env* fueron expresados en dos grupos de células efectoras usando virus vaccinia como vector. Los virus vaccinia utilizados llevan el gen *env* de HIV-1 JRFL (R5) o HIV-1 IIIb (X4), río abajo de un promotor temprano de vaccinia. De esta manera el ensayo fue desdoblado en dos, que serán denominados sistema R5 y sistema X4. También usando virus vaccinia se introdujo en las células efectoras el gen de la RNA polimerasa del fago T7, río abajo un fuerte promotor de vaccinia. En cambio, en las células blanco se introdujo el gen *lac z* bajo el control del promotor T7. De esta manera la  $\beta$ -galactosidasa se expresará como gen reportero sólo después del evento de fusión de membranas (Figura 3). La cantidad de  $\beta$ -galactosidasa producida será cuantificada midiendo una reacción



colorimétrica, usando clorofenol rojo- $\beta$ -D-galactopiranosido (CPRG) como sustrato.

Para el ensayo de fusión de membranas X4 se utilizaron células HeLa como efectoras y HeLa CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>-</sup> como blanco, estas células expresan constitutivamente CXCR4. En el ensayo de fusión de membranas R5, también se usaron células HeLa como efectoras, pero como blanco se utilizaron HOS CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> CXCR4<sup>-</sup>, que es una línea de osteosarcoma CXCR4<sup>-</sup> transfectada con los genes codificantes de CD4 y CCR5. Como control negativo se usó un



<b>Tabla 2 .Virus vaccinia - Ensayo de fusión de membranas</b>			
	<b>Células</b>	<b>Vaccinia</b>	<b>Inserto</b>
<b>Sistema X4</b>	Efectoras	vSC-60	env HIV-1 IIIB
		vP11gene1	T7 RNA polimerasa
	Control no clivable	VCB-16	env UNC HIV-1 IIIB
		vP11gene1	T7 RNA polimerasa
Blanco	vCB-3	CD4 humano	
	vCB21R-LacZ	gen Lac Z	
<b>Sistema R5</b>	Efectoras	vCB-28	env JRFL
		vP11gene1	T7 RNA polimerasa
	Control no clivable	VCB-16	env UNC HIV-1 IIIB
		vP11gene1	T7 RNA polimerasa
Blanco	vCB21R-LacZ	gen Lac Z	

vaccinia que incluye el gen *env* de HIV-1 IIIB con una mutación puntual que no permite la escisión de gp160; impidiendo así, la expresión del complejo gp120 y gp41 en la superficie celular. Los virus vaccinia utilizados se encuentran detallados en la tabla 2.

Después de infectar las células con los correspondientes virus vaccinia y permitir la expresión de las proteínas recombinantes en las membranas celulares, incubándolas a 37°C por 14-20hs, las células efectoras y blanco fueron diluidas en DMEM-2.5 a una densidad final de  $2 \times 10^6$  células/ml para el sistema R5 y  $6 \times 10^5$  células/ml para el X4. Las células efectoras y blanco (25µl cada una) fueron dispensadas en los pocillos de una placa de poliestireno de 96 pocillos de ½ área (half area plates) de fondo plano. Estos pocillos habían sido cargados previamente con 50µl de las bibliotecas o compuestos individuales en diferentes concentraciones a ensayar. El control positivo (4 pocillos por placa) contiene solo las dos poblaciones celulares con medio de cultivo (100% fusión) y el control negativo (4 pocillos por placa) contiene además de las células blanco, efectoras que expresan el Env mutado no clivable (0% fusión). Las muestras fueron ensayadas en duplicados. Las placas fueron centrifugadas a 400g por 2min e incubadas por 3hs a 37°C. El tamizado o "screening" de las bibliotecas compuestas por di-etilen triaminas, 2,3 di-oxo-piperazina 1,4,5-trisustituídas y D-decapéptidos fueron ensayadas a 25, 2.5 y 100µg/ml, respectivamente.

Para ensayar la actividad de  $\beta$ -galactosidasa producida como consecuencia de la fusión de las células efectoras y blanco, 25 $\mu$ l de Tween-20 2% vol/vol fueron agregados a cada pocillo para lisar las células. Luego de mezclar por pipeteo, las placas fueron sometidas a dos ciclos de congelado y descongelado para facilitar la lisis celular. 25 $\mu$ l del lisado fueron transferidos a otra placa similar a las usadas en el ensayo, donde 25 $\mu$ l del sustrato para la  $\beta$ -galactosidasa CPRG 2X (16mM clorofenol rojo- $\beta$ -D-galactopiranosido, 0.12M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O, 0.08M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O, 0.02M KCl, 0.002M MgSO<sub>4</sub>) fueron agregados para generar una reacción colorimétrica. La densidad óptica a 570nm fue medida y el porcentaje de inhibición fue calculado relativo al control positivo en cada placa. La IC<sub>50</sub> (concentración en la mezcla o compuesto individual necesaria para inhibir 50% de la actividad fusogénica) fue determinada usando de cinco a ocho concentraciones de cada compuesto derivadas de diluciones seriales en dos y ajustando estos datos en una curva sigmoidea de pendiente variable con la ayuda de un programa de ajuste de curvas de gráficos científicos (GraphPad Prism).

#### Ensayo de replicación:

Las siguientes cepas de HIV-1 fueron usadas para los ensayos de replicación: IIIb (X4), JRCSF (R5), AB28 (R5)<sup>42</sup>, SF162 (R5) y SF2 (X4R5). Estos virus fueron propagados y cuantificados utilizando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de dadores HIV-1 negativos preactivadas con IL-2. Para cuantificarlos se utilizó el método de dilución límite, que expresa el resultado en dosis infectivas por ml (DI/ml). Dos líneas celulares de astrogloma, U87 CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup>, fueron usadas como blanco de la infección para los virus R5 y X4, respectivamente. Las células U87, en su fase logarítmica de crecimiento, fueron despegadas con tripsina/EDTA y resuspendidas a una concentración de 50.000 células/ml en DMEM-10. 200 $\mu$ l fueron sembrados en una placa de 96 pocillos de fondo plano e incubadas 37°C, 7% CO<sub>2</sub>, durante la noche. Al día siguiente, el medio fue removido de cada pocillo y las células fueron primero pre-incubadas por 1 h 37°C con diluciones

seriales de los compuestos a ensayar para luego ser infectadas con HIV-1 (multiplicidad de infección =  $moi = DI/n^{\circ}$  de células = 0.01). Al día siguiente cada pocillo fue lavado tres veces con 200 $\mu$ l de DMEM-10, a 37°C y se repusieron los inhibidores en las mismas concentraciones diluidos en DMEM-10 en un volumen de 200 $\mu$ l. El péptido T20 o AZT (1 $\mu$ M), fueron usados como control de la inhibición de la replicación. Las placas fueron incubadas por 7 días 37°C en una atmósfera de 7% CO<sub>2</sub>, y 50 $\mu$ l de los sobrenadantes fueron ensayados para detectar la presencia de la proteína de la región Gag de HIV-1, p24, usando un kit comercial de Elisa (Perkin Elmer, Life Sciences) y los valores de IC<sub>50</sub> fueron calculados ajustando estos datos en una curva sigmoidea de pendiente variable con la ayuda de un programa de ajuste de curvas de gráficos científicos (GraphPad Prism).

Los ensayos de replicación de compuestos individuales derivados de triaminas o piperazinas, fueron efectuados infectando PBMCs preactivadas en lugar de línea celular U87.

#### Ensayo de entrada con virus pseudotipado

Para poder evaluar el evento de fusión independientemente de los otros sucesos que ocurren durante el ciclo replicativo de HIV-1, se utilizó un método que incluye HIV-1 pseudotipados defectivos <sup>43</sup>. El virus NL4-3 sólo puede realizar un único ciclo de replicación ya que se le introdujo una mutación que cambia el marco de lectura de Env, también lleva una inserción de luciferasa en el gen nef que se expresa después de la entrada del virión. Para producir los virus pseudotipados, se transfectaron células 293T con 10 $\mu$ g del DNA del clon molecular de HIV-1 NL4-3 (pNL4-3-Luc-R-env-) y 10 $\mu$ g del correspondiente plásmido de expresión de Env. La transfección fue realizada en placas de Petri de 10mm de diámetro usando un kit (Pro-fection, Promega) basado en fosfato de calcio. 48hs después de la transfección los sobrenadantes fueron filtrados (0.2 $\mu$ m) y titulados cuantificando la proteína p24 de HIV-1 con un kit comercial de Elisa (Perkin Elmer, Life Sciences). Así, se generaron 4 grupos de virus NL4-

3 defectivos que difieren sólo en la proteína de envoltura: JRFL y ADA (R5), JC2 (X4) y VSV (envoltura del virus de la estomatitis vesicular vacuna) como control de especificidad. La entrada de VSV es dependiente de fosfatidil-serina e independiente de CD4 y de los receptores quimioquinas.

En una placa de 96 pocillos de fondo plano se sembraron 10,000 U87 CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> o 10,000 U87 CD4<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup>, de acuerdo al tropismo del virus a ser ensayado, en DMEM-8. Las infecciones con el virus pseudotipado con VSV, fueron efectuadas en las células U87 CD4<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup>. Las células fueron infectadas el día siguiente con (10-40ng de p24) con diluciones de los compuestos a ensayar. Como control para 100% entrada se usó sólo DMEM-8 y para 0% entrada se usó el péptido T20. 24hs más tarde los sobrenadantes fueron removidos y se agregaron 200µl de medio fresco DMEM-8. A diferencia de los experimentos de replicación aquí no se repusieron los inhibidores después de la infección ya que los virus son defectivos, por lo tanto incapaces de producir nuevas partículas virales. Luego de 48hs los sobrenadantes fueron aspirados con una pipeta automática multicanal y cada pocillo fue lavado con 200µl de solución salina balanceada Hank's y se agregaron 100µl del buffer de lisis (Promega), seguido por un ciclo de congelado y descongelado para favorecer la lisis celular. 20µl del lisado fueron transferidos a una placa negra de 96 pocillos con la adición de 75µl del sustrato de luciferasa (Promega) y la emisión de luz fue medida con un luminómetro (VICTOR - Wallac 1420 – Multilabel counter). Nuevamente, los valores de IC<sub>50</sub> fueron calculados ajustando estos datos en una curva sigmoidea de pendiente variable con la ayuda de un programa de ajuste de curvas de gráficos científicos (GraphPad Prism).

#### Ensayo de toxicidad:

La potencial toxicidad de las mezclas o compuestos individuales fue evaluada utilizando 3-[4,5-di-metil-tiasol-2-il]-2,5-di-feniltetrazolio (MTT) en un ensayo de reducción colorimétrico. En una reacción catalizada sólo por células vivas, MTT forma un precipitado de formazán que puede ser cuantificado

por absorbancia a 570nm. El ensayo se realizó en todas las células usadas en los diferentes ensayos. Una solución de 5mg/ml de MTT fue preparada en Dulbecco PBS (DPBS-pH 7.35), alicuotada y guardada a -20°C. Las condiciones de las células y de incubación fueron idénticas a las utilizadas en los ensayos de fusión de membranas y replicación. Las células fueron sembradas en una placas de 96 de fondo plano e incubadas con diferentes concentraciones de mezclas o compuestos. A cada pocillo se le agregó 20µl de la solución de MTT y las placas con células HeLa o HOS fueron incubadas por 3hs como en el ensayo de fusión de membranas y las placas con U87 o PBMCs por 24hs, a 37°C 5% CO<sub>2</sub>. 25µl del buffer de lisis (40% SDS en H<sub>2</sub>O:DMF (1:1), 4% ácido glacial acético glacial, 5% 1M HCl) fue agregado, no sólo para lisar las células sino también para solubilizar el precipitado de formazán. El porcentaje de toxicidad relativa fue determinado comparando la densidad óptica a 570nm de la muestras con respecto a la densidad de pocillos con células sin muestra (0%) y pocillos conteniendo solo el medio de cultivo (100%) de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{Tox.} = 100 \times ((\text{OD muestra} - \text{OD } 0\%) / (\text{OD } 100\% - \text{OD } 0\%))$$

La TX<sub>50</sub> es la concentración con 50% de toxicidad relativay fue calculada usando un programa de ajuste de curvas de gráficos científicos (GraphPad Prism).

#### Citometría de Flujo:

Con el fin de caracterizar la unión de los compuestos a los receptores celulares, se utilizó la técnica de citometría de flujo que permite detectar en cada célula ensayada la fluorescencia emitida por los anticuerpos monoclonales unidos específicamente a sus receptores de membrana. Se utilizaron anticuerpos monoclonales que bloquean la interacción entre gp120 HIV-1 Env con cada una de las tres moléculas de membrana con las que interactúa durante el evento de fusión: CD4, CXCR4 y CCR5. Los anticuerpos monoclonales de ratón, marcados con fluorocromos fueron comprados a Pharmingen y se

encuentran descriptos en la Tabla 3:

<b>Blanco</b>	<b>Clon</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Isotipo</b>
CD4	RPA-T4	FITC	Ratón IgG1,k
CXCR4	12G5	CY-Chrome	Ratón IgG2a,k
CCR5	2D7/CCR5	PE	Ratón IgG2a,k

Células mononucleares de sangre periférica de un dador sano, preactivadas por 7 a 14 días con IL-2 humana recombinante, incubadas en RPMI-10 a 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Preactivando las células sólo con IL-2 favorece la expresión de CCR5. Entre 1 y 3x10<sup>5</sup> células preactivadas fueron incubadas por 30min a 37°C, con o sin los compuestos a evaluar, para luego ser marcadas con los 10µl de cada anticuerpo simultáneamente e incubados a temperatura ambiente, en tubos de 2.5ml, por 30min, de acuerdo a las indicaciones de Pharmingen. Como control negativo del marcado se utilizaron anticuerpos de especificidad irrelevante del mismo isotipo, marcado con el mismo fluorocromo, referido como control de isotipo. La células fueron lavadas con 2ml de solución de FACS (PBS, 0.1% azida de sodio, 0.1% sero-albúmina bovina) y resuspendidos en 0.5ml de la misma solución para ser analizados en FACSCAN (citómetro de flujo). 10.000 eventos fueron adquiridos por cada tubo y usando el forward/side scatter se diferenciaron las células mononucleares del resto. Usando Cellquest Software, esta población celular fue luego analizada por su expresión de los fluorocromos correspondientes a cada anticuerpo y la mediana de la fluorescencia de los eventos positivos fue cuantificada.

#### Ensayo de quimiotaxis:

La línea celular de leucemia linfoblástica aguda CCRF-CEM expresa CXCR4 y es capaz de migrar en respuesta a SDF-1 $\alpha$  <sup>44</sup>. Las células en fase de crecimiento logarítmico, fueron centrifugadas a 1000rpm por 5min. y resuspendidas en una concentración de 10<sup>7</sup>células/ml. La respuesta quimiotáctica fue evaluada usando el sistema Transwell® (Corning-Costar) que comprende placas de 24 pocillos con insertos que permiten compartimentalizar

cada hueco con una membrana de policarbonato con poros de 5µm de diámetro. En la parte inferior se pusieron 600µl de medio de cultivo conteniendo diferentes concentraciones de SDF-1α. En la parte superior se colocaron 100µl de la suspensión celular. Las placas fueron incubadas por 2hs a 37°C. Las células que fueron capaces de atravesar la membrana fueron colectadas y contadas en cámaras de Neubauer luego de tñirlas con azul de tripán. En los experimentos que se buscaba examinar el efecto neutralizante de antagonistas, el inhibidor fue agregado en la parte superior junto con las células.

#### Prueba estadística de Mann-Whitney:

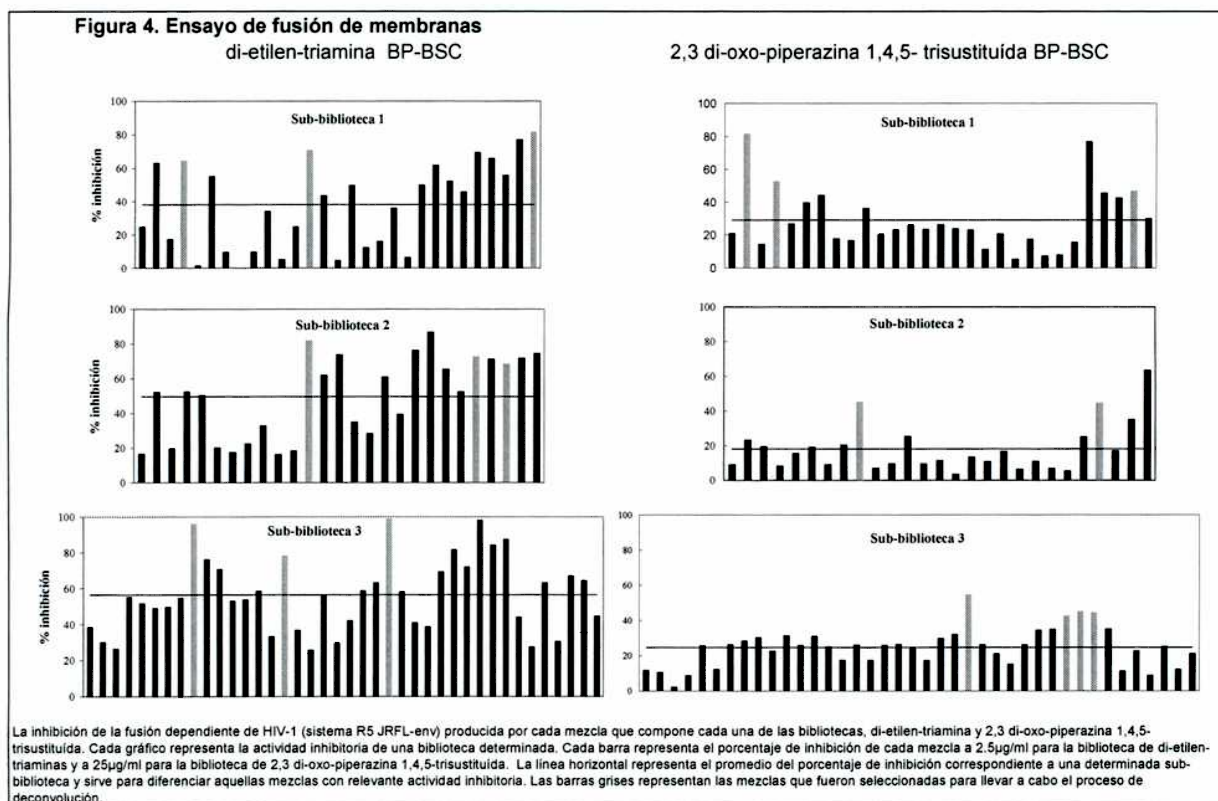
El t-student test se utiliza para comparar dos poblaciones con distribución normal. Cuando la distribución normal no es evidente, se usa la prueba estadística de Mann-Whitney para comparar las medianas de dos poblaciones. Esta prueba fue utilizada para evaluar la significación estadística de las diferencias en el efecto inhibitorio de los compuestos en los ensayos de entrada viral con virus pseudotipados.

## Resultados:

### **Bibliotecas de di-etilen-triamina y 2,3 di-oxo-piperazina 1,4,5-trisustituída**

#### Tamizado:

Todas las 96 mezclas de la biblioteca de di-etilen-triamina y las de la biblioteca 2,3 di-oxo-piperazina 1,4,5-trisustituída fueron ensayadas por su habilidad de inhibir la actividad fusogénica de HIV-1 en los sistemas de fusión de membranas R5 y X4. Una actividad general menor fue observada en el sistema X4 con relación al R5 para las dos bibliotecas (Tabla 4) y una actividad total reducida fue también observada en la biblioteca 2,3 di-oxo-piperazina 1,4,5-trisustituída comparado con la biblioteca de di-etilen-triamina (Figura 4). La naturaleza química de las mezclas más activas resultó muy semejante en los dos sistemas que evalúan diferentes tropismos (dato no presentado). Por el contrario, cuando se considera cada biblioteca individualmente, el perfil de





actividad observado fue muy diferente (Tabla 4). Estos resultados demuestran que tal como era esperado, la presencia de una estructura cíclica juega un rol importante en la actividad inhibitoria de la fusión de membranas dependiente de HIV-1 Env. Las mezclas de las bibliotecas que produjeron una mayor actividad inhibitoria (Tabla 4 y Figura 4, barras grises), y además poseían el menor efecto tóxico ensayado por MTT sobre las células, fueron seleccionadas para sintetizar compuestos individuales.

TABLE 4. Inhibición de la actividad fusogénica inducida por HIV-1 Env de las mezclas seleccionadas						
				% inhibición @ 25µg/ml		% toxicidad @ 50µg/ml
	R1	R2	R3	R5	X4	Cél. HeLa
<b>Di-etilen-triamina</b>	R-ciclohexil metil	X	X	64	58	16
	S-2-butil	X	X	71	41	27
	R-benzil	X	X	81	53	37
	X	R-bencil	X	81	31	17
	X	S-2-naftilmetil	X	73	39	20
	X	S-fenil	X	68	25	15
	X	X	ciclohexilbutil	96	43	33
	X	X	4-isobutil- metilfenilketil	78	0	16
X	X	heptil	99	31	29	
				% inhibición @ 2.5µg/ml		% toxicidad @ 5µg/ml
<b>2,3 di-oxo-piperazina 1,4,5 trisustituida</b>	S-bencil	X	X	82	24	23
	S-2-butil	X	X	53	41	28
	S-ciclohexil metil			47	30	18
	X	S-isopropil	X	45	28	7
	X	R-2-naftilmetil	X	45	30	31
	X	X	ciclohexilbutil	55	3	27
	X	X	4-t-butilciclohexil metil	42	8	5
	X	X	1-adamantilmetil	45	8	8
X	X	3,3-difenilpropil	44	19	8	

### Compuestos individuales derivados de la biblioteca di-etilen-triamina:

Un set de 27 (3X3X3) di-etilen-triaminas fue sintetizado, representando todas las combinaciones posibles de las funcionalidades definidas en las mezclas con mayor actividad en el sistema de fusión de membranas R5. Usando el mismo ensayo usado en el tamizado, se calculó el IC<sub>50</sub> de los compuestos más activos: entre 0.3 y 0.5 μM y 0.84–1.1 μM, respectivamente para los sistemas R5 y X4 (Tabla 5). Mientras que sólo los agentes con índices terapéuticos (TX<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>) superiores a 10 son considerados como potenciales agentes de utilidad farmacológica, estos índices oscilaron entre 1.3 y 2.4 para los compuestos identificados.

Todas las di-etilen-triaminas detalladas en la Tabla 5, fueron ensayadas en el ensayo de inhibición de la replicación de HIV-1-IIIb (X4) y HIV-1-SF162 (R5). El compuesto #5 fue el que tuvo menor efecto citotóxico lo que permitió

Compuesto	R1	R2	R3	IC <sub>50</sub> (μM)		TX <sub>50</sub> (μM)		Índice terapéutico	
				R5	X4	R5	X4	R5	X4
3	S-2-butil	S-fenil	ciclohexil butil	0.55	1.09	0.75	2.48	1.36	2.27
4	R-bencil	R-bencil	heptil	0.38	1.02	0.71	2.41	1.87	2.37
5	R-bencil	S-fenil	ciclohexil butil	0.31	0.84	0.52	1.65	1.66	1.96
6	R-ciclo hexilmetil	R-bencil	ciclohexil butil	0.32	0.86	0.51	1.23	1.6	1.43
7	R-ciclo hexilmetil	S-fenil	ciclohexil butil	0.34	0.84	0.71	1.19	2.06	1.41
8	R-ciclo hexilmetil	S-fenil	heptil	0.3	0.87	0.61	1.36	2.05	1.55

IC<sub>50</sub> fueron determinadas en el ensayo de fusión de membranas inducido por Env R5 y X4, inducido por Env de HIV-1 JRFL y IIIb, respectivamente.  
TX<sub>50</sub> fueron determinadas en el ensayo de toxicidad con MTT.  
Índice terapéutico = TX<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>

determinar su actividad inhibitoria (no tóxico a 3 μM). Así, fue posible detectar inhibición de la replicación de HIV-1-IIIb (X4) y HIV-1-SF162 (R5) de 44% y 62%, respectivamente a 3 μM.

### Compuestos individuales derivados de la biblioteca de piperazinas:

El tamizado de la fusión de membranas con los sistemas R5 y X4,

también generó un perfil similar con la biblioteca 2,3 di-oxo-piperazina 1,4,5-trisustituída. Por lo tanto, se generó una única colección de 24 (3x2x4) compuestos cuya actividad antagonista del proceso de fusión de membranas fue ensayada, tanto en el sistema de fusión R5 como en el X4. Como se muestra en la Tabla 6, los compuestos más activos tienen IC<sub>50</sub> de 13-36µM. Mientras que los índices terapéuticos variaron entre 0.36-3.18µM. No fue posible detectar inhibición de la replicación de HIV-1-IIIb (X4) y SF-162 (R5), a 10µM, la menor concentración carente de efectos tóxicos.

Tabla 6. Inhibición de la fusión de membranas (IC <sub>50</sub> ) y toxicidad (TX <sub>50</sub> ) de las 2,3 di-oxo-piperazina 1,4,5-trisustituída (µM)									
Compuesto	R1	R2	R3	IC <sub>50</sub> (µM)		TX <sub>50</sub> (µM)		índice terapéutico	
				R5	X4	R5	X4	R5	X4
9	S-bencil	S-isopropil	4-t-butílico hexilmetil	13	13	32	27	2.46	2.07
10	S-bencil	R-2-naftil metil	4-t-butílico hexilmetil	22	25	10	4	0.45	0.16
11	S-bencil	R-2-naftil metil	1-adamanbilitil	23	35	18	14	0.78	0.4
12	S-2-butil	S-isopropil	4-t-butílico hexilmetil	36	28	91	89	2.53	3.18
13	S-2-butil	R-2-naftil metil	cyclohexylbutyl	14	14	13	11	0.93	0.79

IC<sub>50</sub> fueron determinadas en el ensayo de fusión de membranas inducido por Env R5 y X4, inducido por Env de HIV-1 JRFL y IIIb, respectivamente.  
 TX<sub>50</sub> fueron determinadas en el ensayo de toxicidad con MTT.  
 Índice terapéutico = TX<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>

### Biblioteca de D- decapéptidos:

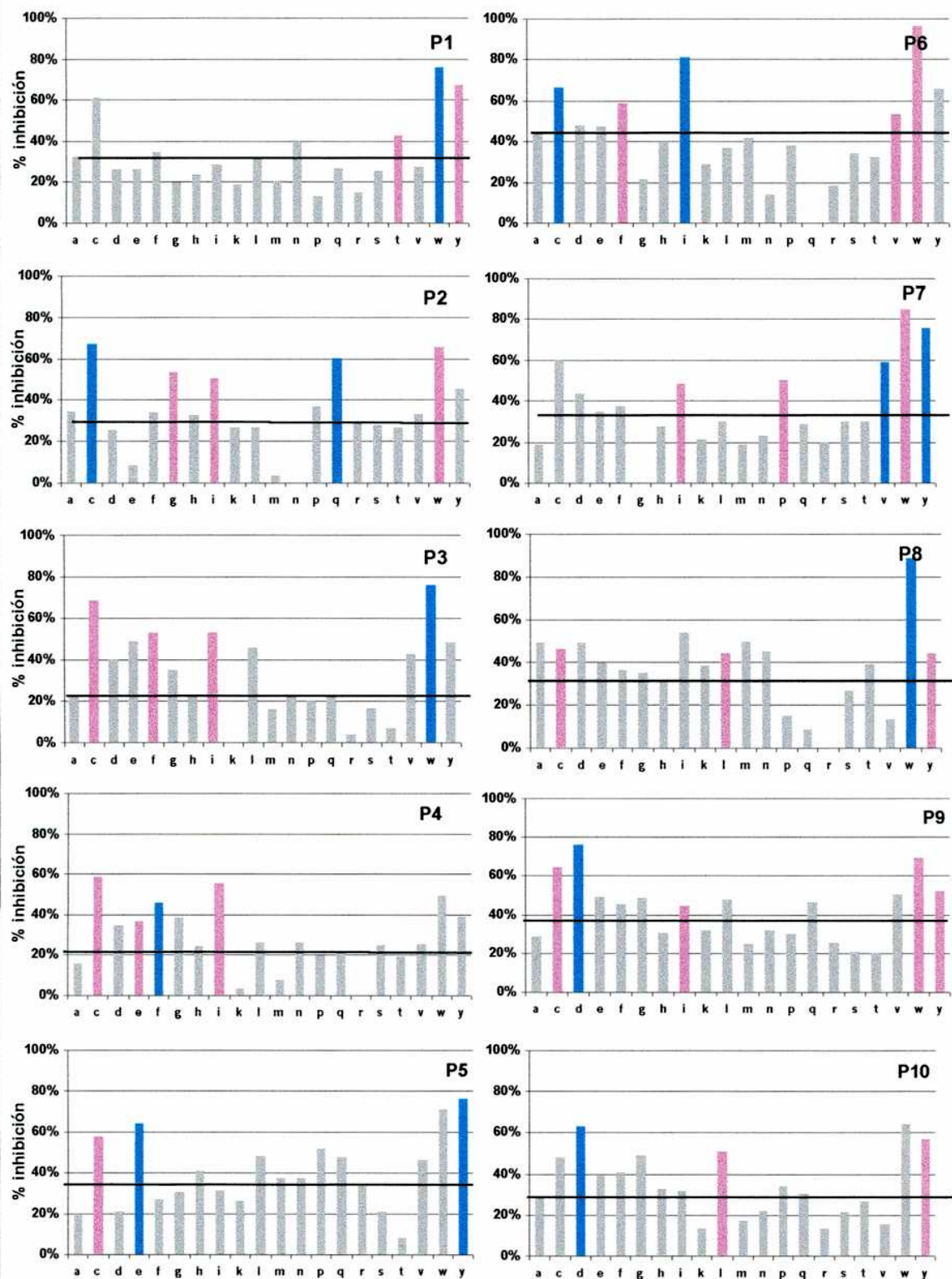
#### Tamizado:

Las 200 mezclas que componen la biblioteca de D-decapéptidos fueron ensayadas por su habilidad de inhibir la actividad fusogénica de HIV-1 usando ambos sistemas de fusión de membranas R5 y X4. En primer lugar se ensayó el sistema X4 de donde se derivó una colección de 38 D-decapéptidos (colección dd). Dieciséis de ellos (1dd-16dd) representan todas las posibles combinaciones de los aminoácidos definidos de las mezclas más activas en cada posición (barras celestes); además, se sintetizaron veintidós péptidos (17dd-38dd) incorporando aminoácidos diferentes químicamente de los que poseen las mezclas con mayor actividad (Tabla 7 y Figura 5, barras rosadas). Por otra parte al ensayar la misma biblioteca en el sistema R5 se develó un perfil

considerablemente diferente (Figura 6). Debido a que en todas las posiciones varias mezclas mostraron actividad inhibitoria, no fue posible sintetizar todas las combinaciones posibles de los aminoácidos correspondientes a las mezclas más activas, entonces se combinaron diferentes residuos de acuerdo a su naturaleza química (Figura 6, barras celestes). Así, se sintetizaron 17 D-decapéptidos, 1rr al 17rr (Tabla 8). La aparente promiscuidad delatada por el tamizado en ambos sistemas, puede ser un indicador de la alta complejidad del evento de fusión. Probablemente, existen diferentes pasos determinantes que pueden verse afectados por los péptidos contenidos en las mezclas, haciendo el proceso deconvolutivo más complicado.

### Figura 5. Ensayo de fusión de membranas, sistema X4 (Env-IIIb)

Cada mezcla de la biblioteca de D-decapéptidos fue ensayada a 100 $\mu$ g/ml

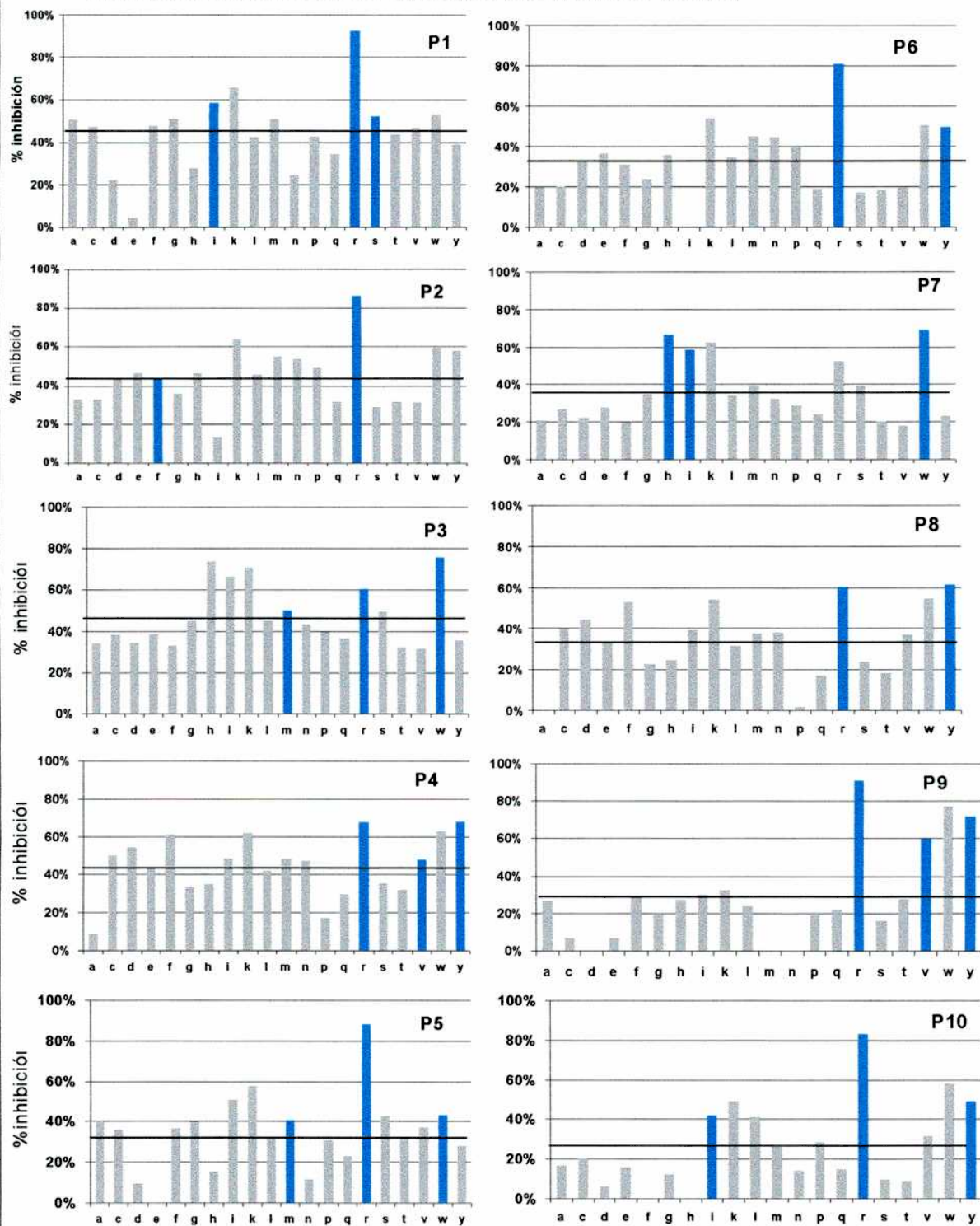


0% es la fusión inducida por Env-IIIb en ausencia de mezclas.

La barra horizontal re-presenta el promedio de todas la mezclas de cada sub-biblioteca

**Figura 6. Ensayo de fusión de membranas, sistema R5 (env-JRFL)**

Cada mezcla de la biblioteca de D-decapéptidos fue ensayada a 100µg/ml



0% es la fusión inducida por Env-JRFL en ausencia de mezclas.

La barra horizontal re-presenta el promedio de todas la mezclas de cada sub-biblioteca

Inhibición de la fusión de membranas por D-decapéptidos:

Todos los péptidos derivados del tamizado de la biblioteca de D-decapéptidos fueron testeados en los ensayos de fusión de membranas R5 y

X4, para determinar su actividad. En la tabla 7 se muestran las IC<sub>50</sub>s de los D-decapéptidos derivados del sistema X4 (colección dd), en ambos sistemas ordenados de acuerdo a la actividad en el sistema X4. Los 6 péptidos más activos derivados de todas las combinaciones de las mezclas más activas (péptidos 1dd-16dd), poseen IC<sub>50</sub>s <5µM en el sistema X4. De la segunda parte de esta colección (péptidos 17dd-38dd) sólo un péptido resultó con IC<sub>50</sub> < 5µM. Notablemente,

**Tabla 7. Inhibición de la fusión de membranas D-decapéptidos derivados de X4**

péptido	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	IC <sub>50</sub> (µM)		
											X4	R5	
13dd	Ac- w	q	w	f	e	i	y	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	1.2	>35
15dd	Ac- w	q	w	f	e	c	y	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	1.5	>35
11dd	Ac- w	q	w	f	y	c	y	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	1.9	>35
5dd	Ac- w	c	w	f	e	i	y	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	2.1	>35
14dd	Ac- w	q	w	f	e	i	v	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	2.9	>35
16dd	Ac- w	q	w	f	e	c	v	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	4.0	>35
7dd	Ac- w	c	w	f	e	c	y	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	7.4	>35
12dd	Ac- w	q	w	f	y	c	v	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	7.4	>35
8dd	Ac- w	c	w	f	e	c	v	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	8.6	>35
9dd	Ac- w	q	w	f	y	i	y	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	9.0	>35
6dd	Ac- w	c	w	f	e	i	v	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	9.3	>35
2dd	Ac- w	c	w	f	y	i	v	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	10.7	>35
1dd	Ac- w	c	w	f	y	i	y	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	10.8	>35
3dd	Ac- w	c	w	f	y	c	y	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	11.7	>35
10dd	Ac- w	q	w	f	y	i	v	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	12.8	>35
4dd	Ac- w	c	w	f	y	c	v	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	16.9	>35
32dd	Ac- w	i	c	e	y	i	y	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	2.0	>35
22dd	Ac- w	c	w	i	y	c	y	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	6.8	>35
23dd	Ac- w	c	w	e	y	c	y	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	7.2	>35
30dd	Ac- y	q	i	f	y	c	v	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	8.3	>35
27dd	Ac- w	c	w	f	y	c	y	i	d	d	-NH <sub>2</sub>	9.4	>35
34dd	Ac- t	g	f	e	y	c	i	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	9.9	>35
24dd	Ac- w	c	w	f	y	v	y	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	10.0	>35
33dd	Ac- t	w	c	i	c	w	i	y	d	d	-NH <sub>2</sub>	11.5	>35
31dd	Ac- w	g	c	f	e	c	y	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	11.8	>35
21dd	Ac- w	c	i	f	y	c	y	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	12.1	>35
18dd	Ac- w	g	w	f	y	c	y	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	12.2	>35
17dd	Ac- t	c	w	f	y	c	y	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	12.6	>35
25dd	Ac- w	c	w	f	y	f	y	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	12.9	>35
19dd	Ac- w	i	w	f	y	c	y	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	16.1	>35
29dd	Ac- w	c	w	f	y	c	y	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	21.7	>35
26dd	Ac- w	c	w	f	y	c	p	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	21.9	>35
28dd	Ac- w	c	w	f	y	c	y	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	24.3	>35
20dd	Ac- w	c	f	f	y	c	y	w	d	d	-NH <sub>2</sub>	26.9	>35
35dd	Ac- t	w	f	e	c	v	i	y	w	y	-NH <sub>2</sub>	>50	>35
36dd	Ac- w	c	f	i	e	i	v	i	c	y	-NH <sub>2</sub>	>50	>35
37dd	Ac- t	g	i	e	c	f	p	c	i	l	-NH <sub>2</sub>	>50	>35
38dd	Ac- y	q	w	c	e	v	p	i	d	d	-NH <sub>2</sub>	>50	>35

Las IC<sub>50</sub> fueron determinadas en los ensayo de fusión de membranas R5 y X4, inducido por Env de HIV-1 JRFL y IIIb, respectivamente

**Tabla 8. Inhibición de la fusión de membranas D-decapéptidos derivados de R5**

péptido	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	IC <sub>50</sub> (µM)		
											R5	X4	
5rr	Ac- r	r	w	r	r	r	i	y	r	r	-NH <sub>2</sub>	0.4	2.2
9rr	Ac- r	r	w	r	r	r	i	y	r	r	-NH <sub>2</sub>	0.4	1.7
13rr	Ac- r	r	m	y	r	r	i	y	r	r	-NH <sub>2</sub>	0.7	0.5
3rr	Ac- r	r	m	y	r	r	w	r	r	r	-NH <sub>2</sub>	1.2	2.4
14rr	Ac- i	r	r	v	w	r	h	r	v	i	-NH <sub>2</sub>	1.7	5.6
11rr	Ac- r	r	w	r	m	y	i	y	r	r	-NH <sub>2</sub>	2.7	9.8
4rr	Ac- r	r	w	r	m	y	w	r	r	r	-NH <sub>2</sub>	2.9	6.0
6rr	Ac- r	r	w	r	r	r	w	r	y	y	-NH <sub>2</sub>	3.1	2.1
7rr	Ac- s	f	m	r	r	r	w	r	r	r	-NH <sub>2</sub>	3.2	1.6
10rr	Ac- s	f	m	y	r	r	w	r	r	r	-NH <sub>2</sub>	3.2	0.4
16rr	Ac- r	r	m	y	r	y	h	r	y	i	-NH <sub>2</sub>	3.3	0.5
15rr	Ac- i	f	r	y	w	r	h	r	v	i	-NH <sub>2</sub>	3.6	7.1
1rr	Ac- r	r	w	r	r	r	w	r	r	r	-NH <sub>2</sub>	4.6	3.2
2rr	Ac- s	f	w	r	r	r	w	r	r	r	-NH <sub>2</sub>	6.2	4.0
8rr	Ac- r	r	w	y	m	y	w	r	r	r	-NH <sub>2</sub>	8.1	3.0
12rr	Ac- s	f	w	r	m	y	w	r	y	y	-NH <sub>2</sub>	11.2	12.4
17rr	Ac- k	k	y	k	r	k	w	k	k	k	-NH <sub>2</sub>	15.2	17.3

Las IC<sub>50</sub> fueron determinadas en los ensayo de fusión de membranas R5 y X4, inducido por Env de HIV-1 JRFL y IIIb, respectivamente



ninguno de los péptidos resultó activo en el sistema R5 de fusión.

Por otra parte, de los péptidos sintetizados derivados del sistema R5 (colección rr), también fueron testeados en el ensayo de fusión de membranas R5 y X4 y los resultados se encuentran resumidos en la tabla 8. Trece de los diecisiete péptidos de esta colección poseen  $IC_{50}s < 5\mu M$  en el sistema R5. En esta colección de péptidos, no se observó una especificidad por un tropismo definido como en el caso anterior, las  $IC_{50}$  para ambos tropismos resultaron dentro del rango de variabilidad del ensayo.

#### Inhibición de la replicación de HIV-1:

Para determinar capacidad inhibitoria de la replicación de HIV-1 por los D-decapéptidos, se prepararon ensayos de replicación con diferentes cepas de HIV-1 en células U87 CD4<sup>+</sup>. De acuerdo al tropismo viral se utilizaron células U87, CCR5<sup>+</sup> o CXCR4<sup>+</sup>. Las células fueron preincubadas con los compuestos por 1h a 37°C antes de ser infectadas. Después de permitir la adsorción viral durante toda la noche, las células fueron lavadas para remover el virus residual y los compuestos fueron repuestos a las concentraciones correspondientes. Por lo tanto los péptidos pudieron interferir tanto en el primer ciclo replicativo como en los sucesivos. Como control de la inhibición máxima de la replicación se utilizó T20 o AZT a 1 $\mu M$ .

Para la colección rr, derivada del sistema de fusión de membranas R5, se seleccionaron cinco péptidos con  $IC_{50}s$  de aproximadamente 1 $\mu M$  para ser purificados (>95%) por HPLC (cromatografía líquida de alta performance) preparativa. Así, se purificaron los mejores decapeptidos del sistema R5, 5rr, 9rr y 13rr y los mejores del sistema X4, 10rr y 16rr (Tabla 9). Los péptidos rr derivados del sistema R5 fueron incapaces de inhibir la replicación de HIV-IIIb (X4) en células CXCR4<sup>+</sup>, aún en concentraciones mayores a 30 $\mu M$ . En cambio, la infección por HIV-1 JRCSF (R5), pudo ser inhibida en presencia de los péptidos 5rr, 9rr y 13rr, con  $IC_{50}s$  de 15, 15 y 11 $\mu M$ , respectivamente. Estos



valores son aproximadamente un orden de magnitud mayor que las IC<sub>50</sub>s calculadas para el ensayo de fusión de membranas. Además, se ensayó la inhibición de la replicación con HIV-1 SF2 que tiene tropismo doble X4R5 y puede infectar tanto células CCR5<sup>+</sup> como CXCR4<sup>+</sup>. Los inhibidores pudieron bloquear la replicación de SF2 tanto en ambos tipos celulares. 9rr fue el péptido más activo, capaz de inhibir la replicación de HIV-1 SF2 tanto en células CCR5<sup>+</sup> como CXCR4<sup>+</sup>. La toxicidad de estos compuestos fue indetectable a 50µM.

péptido	HIV-1 IIIb X4		HIV-1 JRCSF R5		HIV-1 SF2 R5		HIV-1 SF2 X4	
	IC <sub>50</sub> µM	Conf 90%	IC <sub>50</sub> µM	Conf 90%	IC <sub>50</sub> µM	Conf 90%	IC <sub>50</sub> µM	Conf 90%
5rr	>30		15	12-19	20	8-51	20	18-23
9rr	>30		15	11-19	7	6-8	11	9-15
10rr	>30		>30		26	12-52	21	16-27
13rr	>30		11	8-15	17	13-21	18	16-21
16rr	>30		>30		15	12-19	20	12-66

\*Células infectadas: U87 CD4<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup>  
 \*\*Células infectadas U87 CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup>

Los D-decapéptidos 13dd, 15dd y 32dd que indujeron actividad inhibitoria (IC<sub>50</sub>) menor 2µM en el ensayo de fusión de membranas X4, fueron purificados (95%) por medio de HPLC. El péptido 15dd inhibió la replicación tanto de las cepas de laboratorio de HIV-1, IIIb (X4) ,JRCSF (R5) y SF2 (X4R5), como así también un aislamiento clínico resistente a AZT derivado de un paciente HIV<sup>+</sup> AB28 (R5) <sup>42</sup> (genebank #AF001428) con IC<sub>50</sub> 2-8µM (Tabla 10). La toxicidad de estos compuestos fue indetectable a 50µM.

péptido	HIV-1 IIIb X4		HIV-1 JRCSF R5		HIV-1 AB28 R5		HIV-1 SF2 R5		HIV-1 SF2 X4	
	IC <sub>50</sub> µM	Conf 90%	IC <sub>50</sub> µM	Conf 90%	IC <sub>50</sub> µM	Conf 90%	IC <sub>50</sub> µM	Conf 90%	IC <sub>50</sub> µM	Conf 90%
13dd	11	8-15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15dd	3	2-5	1	0.9-1.7	5	4-7	7	6-8	8	1-381
32dd	10	7-15	5	4-6	32	14-73	18	14-23	≅16	ND

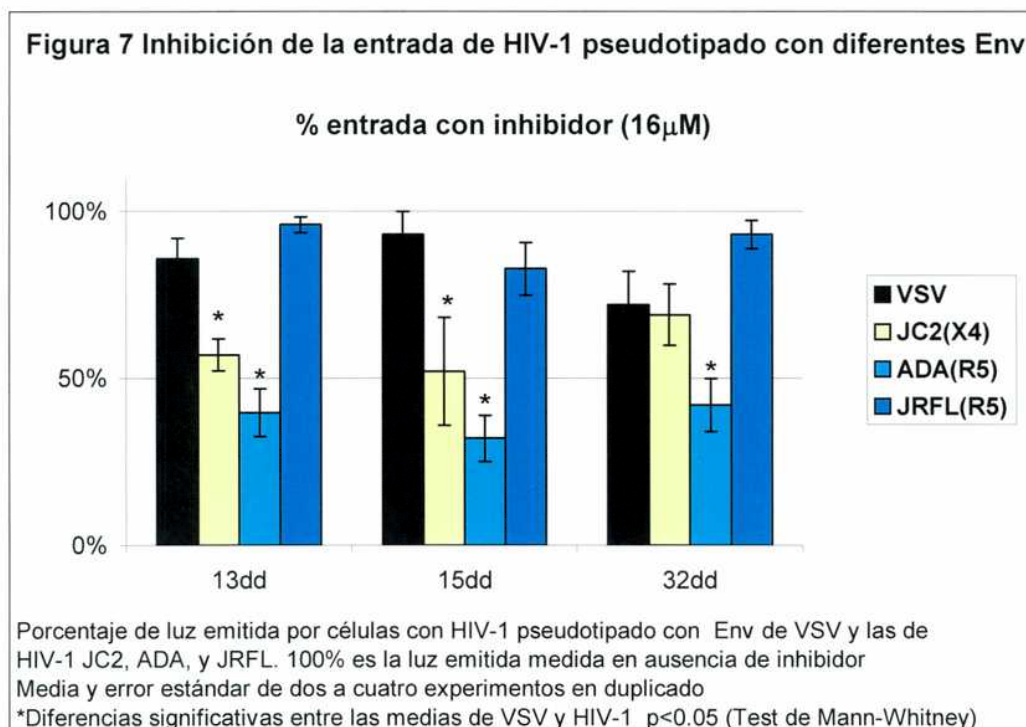
\*Células infectadas: U87 CD4<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup>  
 \*\*Células infectadas U87 CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup>  
 ND: no determinado

### Inhibición de la entrada viral con virus pseudotipados:

Para determinar si la inhibición de la replicación de HIV-1 es

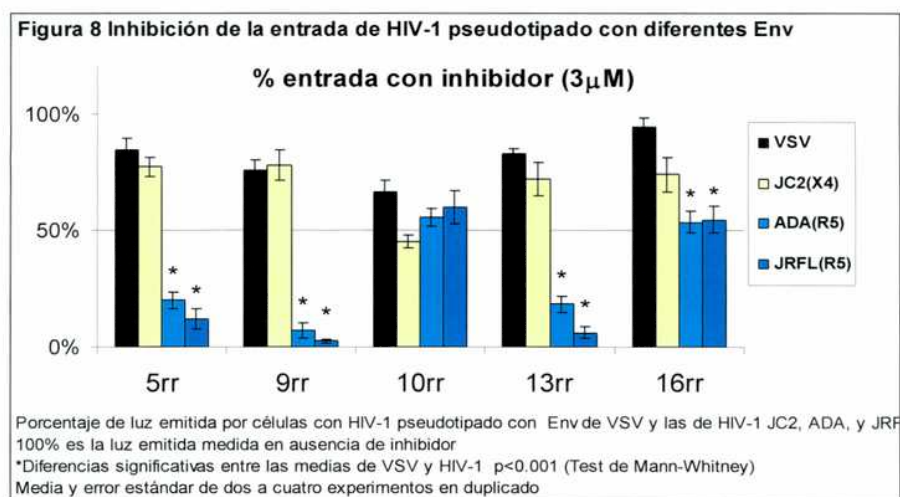
consecuencia de la inhibición de la entrada de HIV-1, se puso a punto un ensayo de entrada de viriones defectivos de HIV-1 (NL4-3). Los viriones fueron producidos utilizando el clon molecular de HIV-1 (NL4-3) env-defectivo que lleva una inserción de luciferasa en el gen nef. Así, la cantidad de virus que entra en las células es proporcional a la actividad de luciferasa generada. Los viriones HIV-1 (NL4-3) fueron pseudotipados con sendas proteínas de envoltura de HIV-1 (X4: JC2 y R5: ADA, JRFL) y de VSV.

Los D-decapéptidos 13dd y 15d mostraron un efecto inhibitorio de la entrada de viriones que expresan proteínas de envoltura de HIV-1 ADA (R5) y JC2 (X4) significativamente menor a los viriones con Env de VSV ( $p < 0.05$ , test de Mann-Whitney). Los tres péptidos ensayados, a una concentración de  $16\mu\text{M}$ , redujeron la entrada viriones con Env de HIV-1 ADA (R5) a menos del 50% (Figura 7). En concordancia con el ensayo de fusión de membranas R5, dependiente de Env-JRFL, los compuestos no inhibieron la entrada de viriones pseudotipados con Env-JRFL.



Para la colección rr, derivada del sistema de fusión de membranas R5,

se ensayaron cinco péptidos purificados con  $IC_{50}$ s de aproximadamente  $1\mu M$ ; los mejores del sistema R5, 5rr, 9rr y 13rr y los mejores del sistema X4, 10rr y 16rr. Los péptidos 5rr, 9rr y 13rr, a una concentración de  $3\mu M$ , redujeron la entrada viriones con Env de HIV-1 R5 a menos del 25% (Figura 8). La diferencia entre la



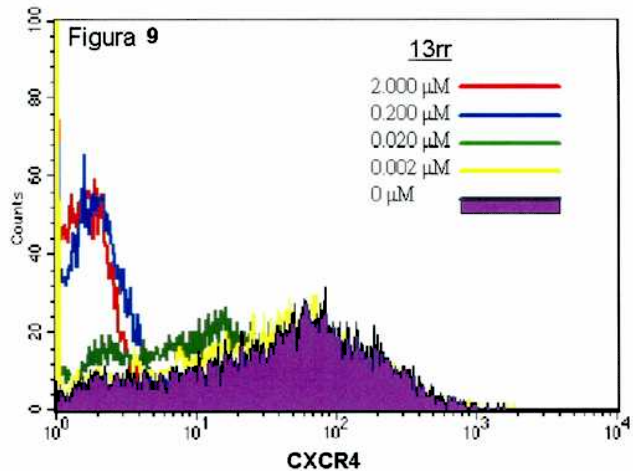
entrada de virus pseudotipados con la proteína de envoltura de VSV o con HIV-1 JC2 (X4) y los viriones que llevan Env de HIV-1 R5 fue significativa ( $p < 0.001$ , test de Mann-Whitney) demostrando que la inhibición es específica para viriones HIV-1 cuya entrada es dependiente de CCR5. Las  $IC_{50}$  de los péptidos con mayor actividad, 5rr, 9rr y 13rr oscilaron entre 1 y  $3\mu M$ , coincidiendo con los valores deducidos de los experimentos de fusión de membranas R5 y replicación. El compuesto 10rr resultó ser el más activo para inhibir la entrada de viriones pseudotipados con HIV-1 JC2 (X4), aunque esta actividad no fue significativamente diferente con los viriones con VSV, denotando que la inhibición de la entrada es inespecífica.

#### Inhibición de la unión de anticuerpos monoclonales anti CD4, CXCR4 y CCR5:

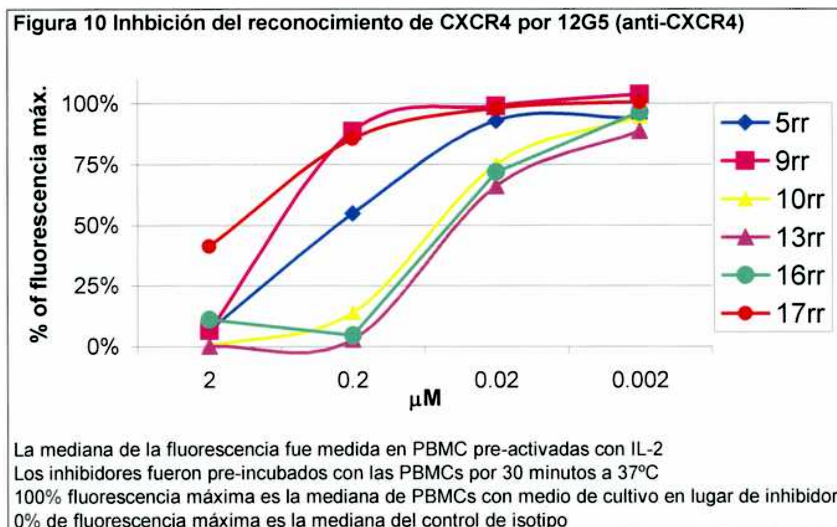
Para saber si los decapeptidos se unían a sitios específicos de los receptores celulares de HIV-1, se utilizaron tres anticuerpos monoclonales específicos contra los sitios de reconocimiento en: CD4, CXCR4 y CCR5. Cada uno de estos anticuerpos es capaz de bloquear la entrada de HIV-1. PBMCs de dadores sanos, pre-activadas con IL-2 fueron pre-incubadas por 30min a  $37^{\circ}C$



con medio de cultivo o con diferentes concentraciones de los inhibidores, luego fueron marcadas con los anticuerpos fluorocromados y analizadas por citometría de flujo. La mediana correspondiente a cada fluorocromo fue calculada. Los péptidos 15dd y 32dd no alteraron el patrón de unión de ninguno de los anticuerpos. Los péptidos rr tampoco fueron capaces de desplazar los anticuerpos monoclonales para CD4 y CCR5. Sin embargo, resultaron ser inhibidores de la unión entre el anticuerpo monoclonal 12G5 (anti-CXCR4) y CXCR4 (Figura 9 y 10.) Los péptidos 16rr, 10rr y 13rr fueron los más activos, tal como era de esperar, porque fueron los 3 más activos en el ensayo de fusión de



membranas X4. La  $IC_{50}$  del péptido 13rr para el desplazamiento del anticuerpo anti-CXCR4, fue estimada en 28nM con un intervalo de confianza del 95% entre 11 y 76nM (Figura 5). A través estudios de cinética de inhibición, se pudo estimar que el tiempo de necesario para bloquear totalmente la unión de 12G5 a CXCR4, es menor a 2.5min. Además, el bloque también pudo ser efectuado incubando las células a 4°C. Se desprende de estos ensayos que la reducción

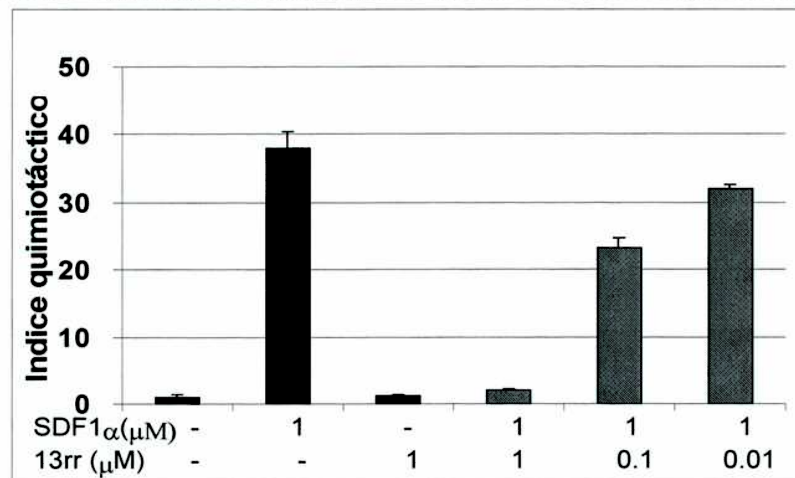


de la fluorescencia detectada no es debido a la internalización de CXCR4. La internalización inducida por SDF-1 $\alpha$  requiere 30min para reducir al 20% la densidad de CXCR4 en la superficie celular, un fenómeno definitivamente más lento que el observado con 13rr<sup>45</sup>.

Inhibición de la quimiotaxis inducida por SDF1  $\alpha$ :

Prosiguiendo con la caracterización de los péptidos rr, se evaluó la capacidad de inhibir el efecto migratorio producido por SDF-1 $\alpha$ . Los ensayos de antagonismo se realizaron con una línea de leucemia linfoblástica aguda CCRF-CEM que expresa CXCR4 y migra en respuesta a SDF-1 $\alpha$ . El péptido 13rr fue capaz de bloquear totalmente la migración celular inducida por 1 $\mu$ M de SDF1 $\alpha$  a 1 $\mu$ M y produjo inhibición parcial a 100nM (Figura 11). Por lo tanto, el péptido 13rr tiene actividad antagonista sobre la migración celular dependiente de SDF1 $\alpha$ .

Figura 11. Ensayo de inhibición de la quimiotaxis inducida por SDF1 $\alpha$ .



## **Discusión y conclusiones:**

La entrada de HIV-1 es el primer paso de la infección y comprende interacciones entre la glicoproteína de membrana virales y receptores celulares. El reconocimiento específico de gp120 por CD4, inicia cambios conformacionales en la proteína viral que exponen el dominio de reconocimiento de los correceptores <sup>46</sup>. La zona de gp120 que reconoce al correceptor está formada por un centro hidrofóbico rodeado por una corona de carga positiva. La unión a los co-receptores genera un nuevo cambio conformacional pero esta vez en gp41 <sup>47</sup>. El ectodominio de gp41 contiene dos hélices, una cerca del amino terminal (hélice N) y otra cerca del carboxi terminal (hélice C). Cuando gp41 adopta la conformación fusogénica, las hélices N y C interactúan en forma antiparalela, formando una horquilla. Así se provoca un acercamiento entre las regiones amino y carboxi del ectodominio que facilita la yuxtaposición de las membranas viral y celular y la concomitante fusión <sup>48</sup>.

Usando bibliotecas sintéticas tanto peptídicas como no peptídicas, fue posible identificar nuevos compuestos capaces de inhibir el evento de fusión de membranas inducido por diferentes glicoproteínas de HIV-1, corrompiendo el mecanismo de entrada del virión en la célula blanco. En primer lugar se utilizaron bibliotecas de pequeñas moléculas derivadas de poliaminas que tienen como estructura central a di-etilén triamina o 2,3 di-oxo-piperazina 1,4,5-trisustituída <sup>33,34</sup>. Se demostró que la estructura cíclica estructural de estas bibliotecas genera diferentes patrones de inhibición del evento de fusión de membranas dependiente de HIV-1. Uno de los compuestos individuales con esqueleto de triaminas inhibió la replicación de SF162 HIV-1 en el rango micromolar, aunque con índices terapéuticos ( $TX_{50}/IC_{50}$ ) superiores a 10, el valor mínimo esperado para un fármaco. Ya que estos compuestos poseen las propiedades físico-químicas deseadas para ser utilizadas oralmente pueden servir como punto de partida para desarrollar compuestos que inhiban la entrada de HIV-1 con mayor actividad y menor toxicidad.

El L-péptido T20 es el primer inhibidor de AFE aprobado por el FDA para el tratamiento de la infección por HIV-1. En este trabajo, se exploró la capacidad inhibitoria de D-decapéptidos para la fusión de membranas dependiente de HIV-1. Tal como era esperado, los niveles de toxicidad se redujeron dramáticamente comparados con los compuestos individuales de triaminas y piperazinas, fue inexistente a 50 $\mu$ M para todas las líneas celulares estudiadas. Los péptidos derivados del tamizado del sistema de fusión de membranas dependiente de CXCR4, colección dd, mostraron especificidad de tropismo X4 en el mismo ensayo del tamizado. Más tarde, esta especificidad no pudo ser reproducida en los ensayos de entrada viral y replicación. La inhibición de la replicación de HIV-1 *in vitro*, pudo ser detectada en todos los aislamientos virales para el péptido 15dd, con IC<sub>50</sub> 2-7 $\mu$ M para diferentes cepas de laboratorio de HIV-1 con diferentes tropismos y AB28, un aislamiento clínico resistente a AZT. Estos valores coinciden con los valores de inhibición para el sistema de fusión de membranas X4, aunque no fueron evidentes en los ensayos de entrada viral. Los péptidos dd no pudieron alterar el patrón de unión de los anticuerpos específicos para CD4 y co-receptores. Estos experimentos no descartan la posibilidad del pegado de los decapeptidos dd a los receptores en una región que no afecta el reconocimiento del anticuerpo, pero sí la entrada viral o interferencia en un paso posterior al reconocimiento de receptores. Los ensayos de fusión de membranas y entrada viral dependientes de CCR5 que 15dd no pudo inhibir son los que involucran Env-JRFL. Esta información puede ser útil para acotar el sitio de acción del decapeptido, comparando las secuencias de *env* en ADA, JRCSF y JRFL. Experimentos de replicación con HIV-1 JRFL se encuentran en preparación.

Los D-decapeptidos rr derivados del sistema de fusión de membranas R5, contienen un alto número de aminoácidos con carga positiva e inhibieron indistintamente la fusión de membranas dependiente de CXCR4 y CCR5 con IC<sub>50</sub> de aproximadamente 1 $\mu$ M. Más tarde, se evidenció una preferencia por la inhibición de virus R5 en los ensayos de entrada y replicación de HIV-1, donde

se detectaron  $IC_{50}$  de 1-3 $\mu$ M y 11-15 $\mu$ M, respectivamente. Los péptidos 5rr, 9rr y 13rr fueron los péptidos más activos en todos los ensayos de fusión dependiente de CCR5. Esta preferencia coincide con la importancia de aminoácidos con carga negativa en el dominio amino terminal de CCR5 para su reconocimiento por HIV-gp120. CCR5 con reemplazos de alanina en estos aminoácidos aniónicos, pierde su capacidad de mediar la entrada de viriones HIV-ADA (R5), JRFL (R5) y HIV-1 DH123 (X4R5) <sup>49</sup>. Además, Dragic et al. demostraron que las tirosinas sulfatadas con carga neta negativa en el dominio N-terminal de CCR5, también están involucradas en el reconocimiento de gp120. Asimismo, fue demostrado que los aminoácidos básicos del loop V3 de HIV-1 son esenciales para el reconocimiento de las tirosinas sulfatadas en el dominio N-terminal de CCR5 <sup>50</sup>. Tomando en conjunto estos experimentos es posible concebir un efecto inhibitorio de los péptidos rr íntimamente relacionado con su carga positiva. Los péptidos 5rr, 9rr y 13rr tienen entre 6 y 7 aminoácidos básicos. Hasta el momento se han descubierto los siguientes inhibidores de la interacción de HIV-1 con CCR5: AOP-Rantes, quimioquina modificada; PRO 140, anticuerpo monoclonal; Tak-779 y SCH-351125. Ninguno de estos compuestos comparte características fisico-químicas con los péptidos rr.

El sitio de reconocimiento de HIV-1 en el dominio extracelular CXCR4 comprende una región aniónica que puede ser bloqueada por el anticuerpo monoclonal 12G5. Otros compuestos de características catiónica, ALX 40-4C (poli-9 D-arginina) <sup>18</sup>, AMD300 <sup>19</sup>, D-péptidos derivados de SDF-1 $\alpha$ <sup>20</sup>, el L-péptido T22 (RRWCYRKGICYRKCR) <sup>21</sup> y un L-decapéptido (LGRFKHTDACCRTHD) derivado del veneno de abejas<sup>22</sup> son capaces de bloquear la entrada de virus X4, el epitope del anticuerpo monoclonal 12G5 y son también antagonistas de SDF-1 $\alpha$ . Los péptidos 10rr, 13rr y 16rr compiten con alta afinidad con el anticuerpo 12G5, y fueron capaces de bloquear específicamente la fusión de membranas dependiente de HIV-1 IIIb (X4) con  $IC_{50} < 1\mu$ M. Sin embargo, no inhibieron específicamente la entrada de HIV-JC2 (X4) o la replicación de virus HIV-1 IIIb (X4). Por lo tanto, la actividad inhibitoria



de unión a CXCR4 de los D-decapéptidos descubiertos correlaciona con la fusión de membranas X4, pero no con los ensayos de replicación y entrada viral. Una de las razones para esta discrepancia podría ser debido a que la línea celular CD4<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup> usada para los diferentes ensayos no fue la misma. Aunque, Hela CD4<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup> y U87 CD4<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup> son reconocidas específicamente por 12G5 y este reconocimiento es abolido por los péptidos rr. El péptido 9rr es el mejor inhibidor de la replicación y entrada de HIV-1 R5 y es el competidor menos efectivo de la unión de 12G5, sugiriendo que la inhibición de la replicación y del pegado de 12G5 son fenómenos independientes.

CCR5 y CXCR4 comparten analogías estructurales <sup>51</sup>; por ejemplo: presentan aminoácidos aniónicos y tirosinas sulfatadas en el amino terminal <sup>52</sup> <sup>53</sup>, en los rulos extracelulares, en los dominios transmembrana y en el C-terminal que son reconocidos por V3 y C4 en gp120. La región V3 de gp120 es rica en cargas positivas, está involucrada en el reconocimiento del correceptor y interacciona selectivamente con superficies con carga positiva <sup>54</sup>. Un mayor número de cargas positivas en V3 está asociado a tropismo X4. En estudios de mutación dirigida del dominio amino terminal de CRR5 se demostró que gp120 de virus R5 y X4R5 reconocen CCR5 en forma similar. Los péptidos rr inhibieron la replicación de SF-2 que tiene tropismo X4R5, tanto en células CCR5<sup>+</sup> como CXCR4<sup>+</sup>. En conjunto, estos experimentos son consistentes con la existencia de un único sitio de unión al correceptor en gp120 X4R5.

Los péptidos rr pudieron inhibir la fusión de membranas dependiente de CXCR4, aunque en el tamizado del sistema X4 no mostraron reactividad en presencia de las mezclas que contienen aminoácidos con carga definidos. El reconocimiento de cargas entre de gp120 y CXCR4 involucra más aminoácidos catiónicos que con CCR5. Es posible que los péptidos presentes en las mezclas no se encuentran en una concentración suficiente para poder bloquear esta unión. Los compuestos individuales pudieron interferir la fusión de membranas dependiente de CXCR4 presumiblemente porque se encuentran en una mayor concentración. Por lo tanto los péptidos dd derivados del tamizado de X4

podrían inhibir un paso posterior al reconocimiento del correceptor, también denotado por la inhibición tanto de cepas R5 como X4 con similares  $IC_{50}$ s en los experimento de replicación de HIV-1.

ALX 40-4C y T22 y los rr son polipéptidos con un alto número de D o L-Argininas que les confiere una carga neta positiva. ALX 40-4C<sup>18</sup> y T22<sup>21</sup>, a 10 $\mu$ M y 3 $\mu$ M, respectivamente, no inhiben la fusión de membranas, entrada o replicación de HIV-1 en ensayos que utilizan gp120 R5. Por el contrario, los péptidos 5rr, 9rr y 13rr poseen actividad inhibitoria en todos los sistemas ensayados dependientes de CCR5, pero mantiene la capacidad de inhibir la unión de SDF-1 $\alpha$ . Entonces, los péptidos rr podrían servir como modelo para el desarrollo de péptidos catiónicos que sean capaces de bloquear simultáneamente la interacción de gp120 con CCR5 y CXCR4; evitando así el riesgo de promover el cambio de fenotipo viral de R5 a X4. Los compuestos que solo bloquean CCR5 pueden ejercer una presión de selección que favorece la aparición de cepas X4 que están asociadas a un aumento de la carga viral y disminución del número de células T CD4<sup>+</sup>.

Por otra parte, glucosaminoglicanos (gag), específicamente del tipo heparán sulfato (HS) se unen tanto a gp120<sup>54</sup> como a gp41<sup>55,56</sup> y son necesarios para la infección de ciertas cepas virales. Las secuencias consenso para proteínas que se unen a HS son: BBXB, XBBXBX y XBBBXXBBX (B es un aminoácido básico y X es cualquier otro aminoácido). Además, casi todas las quimioquinas estudiadas poseen motivos de unión a gag<sup>57-59</sup>. Estos motivos pueden ser encontrados en los péptidos rr, vislumbrando así, otra posible forma de interferir en el proceso de entrada de HIV-1. Las  $\beta$ -defensinas son también compuestos catiónicos con actividad antirretroviral<sup>60</sup>, no dependiente de correceptores.

El péptido 13rr inhibió totalmente el efecto migratorio inducido por SDF-1 $\alpha$ , el ligando natural de CXCR4, en concentraciones similares a las determinadas en los experimentos de entrada y replicación de HIV-1. Estos

resultados coinciden con la naturaleza aniónica de los dominios extracelulares de CXCR4 donde se SDF-1 $\alpha$ . Por lo tanto, los péptidos rr funcionan como antagonistas de SDF-1 $\alpha$ . Recientemente fue reportado el antagonismo de CXCR4 en la migración de células metastáticas de cáncer de mama <sup>61</sup>. El eje CXCR4-SDF-1 $\alpha$  también juega un importante rol en la invasión del rhabdomiosarcoma en la médula ósea, donde la metástasis puede ser bloqueada por un inhibidor específico de CXCR4 <sup>62</sup>. Similares resultados fueron obtenidos cuando se estudió la metástasis producida durante el desarrollo del cáncer de pulmón de células no-pequeñas <sup>63</sup>. Los inhibidores de CXCR4 también fueron encontrados beneficiosos en modelos animales para asma y artritis reumatoide <sup>64-66</sup>. Por lo tanto los péptidos rr podrían tener múltiples aplicaciones terapéuticas además de inhibición de la replicación de HIV-1.

## Bibliografía

1. **Finzi, D., J. Blankson, J. D. Siliciano, J. B. Margolick, K. Chadwick, T. Pierson, K. Smith, J. Lisziewicz, F. Lori, C. Flexner, T. C. Quinn, R. E. Chaisson, E. Rosenberg, B. D. Walker, S. Gange, J. Gallant, and R. F. Siliciano.** 1999. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat. Med.* **5**:512-517.
2. **Michael, N. L. and J. P. Moore.** 1999. HIV-1 entry inhibitors: Evading the issue. *Nat. Med.* **5**:740-741.
3. **Martinez-Picado, J., M. P. DePasquale, N. Kartsonis, G. J. Hanna, J. Wong, D. Finzi, E. Rosenberg, H. F. Gunthard, L. Sutton, A. Savara, C. J. Petropoulos, N. Hellmann, B. D. Walker, D. D. Richman, R. Siliciano, and R. T. D'Aquila.** 2000. Antiretroviral resistance during successful therapy of HIV type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:10948-10953.
4. **Kwong, P. D., R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson.** 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**:648-659.
5. **Weissenhorn, W., A. Dessen, L. J. Calder, S. C. Harrison, J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1999. Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses. *Mol. Membrane Biol.* **16**:3-9.
6. **Berger, E. A., P. M. Murphy, and J. M. Farber.** 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: Role in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* **17**:657-700.
7. **De Clercq, E.** 1994. Trends in drug development for the treatment of AIDS compounds interfering with the initial stages of the HIV replicative stage. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2**:4-6.
8. **Balzarini, J., J. Neyts, D. Schols, M. Hosoya, E. Van Damme, W. Peumans, and E. De Clercq.** 1992. The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium* hybrids and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine)<sub>n</sub>-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication *in vitro*. *Antiviral Res.* **18**:191-207.
9. **Jansen, R. W., G. Molema, R. Pauwels, D. Schols, E. De Clercq, and D. K. F. Meijer.** 1991. Potent *in vitro* anti-human immunodeficiency virus-1 activity of modified human serum albumin. *Mol. Pharmacol.* **39**:818-823.
10. **Mayaux, J.-F., A. Bousseau, R. Pauwels, T. Huet, Y. Henin, N. Dereu, M. Evers, F. Soler, C. Poujade, E. De Clercq, and J.-B. Le Pecq.** 1994. Triterpene derivatives that block entry of human immunodeficiency virus type I into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:3564-3568.
11. **Wild, C. T., D. C. Shugars, T. K. Greenwell, C. B. McDanal, and T. J. Matthews.** 1994. Peptides corresponding to a predictive  $\alpha$ -helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:9770-9774.
12. **Lifson, J. D., K. M. Hwang, P. L. Nara, B. Fraser, M. Padgett, N. M. Dunlop, and L. E. Eiden.** 1988. Synthetic CD4 peptide derivatives that inhibit HIV infection and cytopathicity. *Science* **241**:712-716.

13. **Kliger, Y., A. Aharoni, D. Rapaport, P. Jones, R. Blumenthal, and Y. Shai.** 1997. Fusion peptides derived from the HIV type 1 glycoprotein 41 associate within phospholipid membranes and inhibit cell-cell fusion - Structure-function study. *J. Biol. Chem.* **272**:13496-13505.
14. **Robey, F. A., T. Harris-Kelson, M. Robert-Guroff, D. Batinic, B. Ivanov, M. S. Lewis, and P. P. Roller.** 1996. A synthetic conformational epitope from the C4 domain of HIV gp120 that binds CD4. *J. Biol. Chem.* **271**:17990-17995.
15. **Owens, R. J., G. M. Anantharamaiah, J. B. Kahlon, R. V. Srinivas, R. W. Compans, and J. P. Segrest.** 1990. Apolipoprotein A-I and its amphipathic helix peptide analogues inhibit human immunodeficiency virus-induced syncytium formation. *J. Clin. Invest.* **86**:1142-1150.
16. **Eckert, D. M., V. N. Malashkevich, L. H. Hong, P. Carr, and P. S. Kim.** 1999. Inhibiting HIV-1 entry: Discovery of D-peptide inhibitors that target the gp41 coiled-coil pocket. *Cell* **99**:103-115.
17. **Callebaut, C., E. Jacotot, B. Krust, G. Guichard, J. Blanco, A. Valenzuela, J. Svab, S. Muller, J. P. Briand, and A. G. Hovanessian.** 1997. Pseudopeptide TASP inhibitors of HIV entry bind specifically to a 95-kDa cell surface protein. *J. Biol. Chem.* **272**:7159-7166.
18. **Doranz, B. J., K. Grovit-Ferbas, M. P. Sharron, S. H. Mao, B. M. Goetz, E. S. Daar, R. W. Doms, and W. A. O'Brien.** 1997. A small-molecule inhibitor directed against chemokine receptor CXCR4 prevents its use as an HIV-1 coreceptor. *J. Exp. Med.* **186**:1395-1400.
19. **Hatse, S., K. Princen, L. O. Gerlach, G. Bridger, G. Henson, E. De Clercq, T. W. Schwartz, and D. Schols.** 2001. Mutation of Asp(171) and Asp(262) of the chemokine receptor CXCR4 impairs its coreceptor function for human immunodeficiency virus-1 entry and abrogates the antagonistic activity of AMD3100. *Mol Pharmacol.* **60**:164-173.
20. **Zhou, N., Z. Luo, J. Luo, X. Fan, M. Cayabyab, M. Hiraoka, D. Liu, X. Han, J. Pesavento, C. Z. Dong, Y. Wang, J. An, H. Kaji, J. G. Sodroski, and Z. Huang.** 2002. Exploring the stereochemistry of CXCR4-peptide recognition and inhibiting HIV-1 entry with D-peptides derives from chemokines. *J. Biol. Chem.* **277**:17476-17485.
21. **Murakami, T., T. Zhang, Y. Koyanagi, Y. Tanaka, J. Kim, Y. Suzuki, S. Minoguchi, H. Tamamura, M. Waki, A. Matsumoto, N. Fujii, H. Shida, JA. Hoxie, S. C. Peiper, and N. Yamamoto.** 1999. Inhibitory mechanism of the CXCR4 antagonist T22 against human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **73**:7489-7496.
22. **Fenard, D., G. Lambeau, T. Maurin, J. C. Lefebvre, and A. Doglio.** 2001. A peptide derived from bee venom-secreted phospholipase A2 inhibits replication of T-cell tropic HIV-1 strains via interaction with the CXCR4 chemokine receptor. *Mol Pharmacol.* **60**:341-347.
23. **Simmons, G., P. R. Clapham, L. Picard, R. E. Offord, M. M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, R. Buser, T. N. Wells, and A. E. Proudfoot.** 1997. Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science* **276**:276-279.
24. **Trkola, A., T. J. Ketas, K. A. Nagashima, L. Zhao, T. Cilliers, L. Morris, J. P. Moore, P. J. Maddon, and W. C. Olson.** Potent, broad-spectrum inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by the CCR5 monoclonal antibody PRO 140.
25. **Takashima, K., H. Miyake, R. A. Furuta, J.-I. Fujisawa, Y. Iizawa, N. Kanzaki, M. Shiraishi, K. Okonogi, and M. Baba.** 2001. Inhibitory effects of small-molecule CCR5

- antagonists on human immunodeficiency virus type 1 envelope-mediated membrane fusion and viral replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:3538-3543.
26. **Strizki, J. M., S. Xu, N. E. Wagner, L. Wojcik, J. Liu, Y. Hou, M. Endres, A. Palani, S. Shapiro, J. W. Clader, W. J. Greenlee, J. R. Tagat, S. McCombie, K. Cox, A. B. Fawzi, C. C. Chou, C. Pugliese-Sivo, L. Davies, M. E. Moreno, D. D. Ho, A. Trkola, C. A. Stoddart, J. P. Moore, G. R. Reyes, and B. M. Baroudy.** 2001. SCH-C (SCH 351125), an orally bioavailable, small molecule antagonist of the chemokine receptor CCR5, is a potent inhibitor of HIV-1 infection *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:12718-12723.
  27. **Kilby, J. M., S. Hopkins, T. M. Venetta, B. DiMassimo, G. A. Cloud, J. Y. Lee, L. Alldredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M. R. Johnson, M. A. Nowak, G. M. Shaw, and M. S. Saag.** 1998. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nature Med.* **4**:1302-1307.
  28. **Lazzarin, A., B. Clotet, D. Cooper, J. Reynes, K. Arasteh, M. Nelson, C. Katlama, H. J. Stellbrink, J. F. Delfraissy, J. Lange, L. Huson, R. DeMasi, C. Wat, J. Delehanty, C. Drobnes, and M. Salgo.** 2003. Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia. *N. Engl. J Med* **348**:2186-2195.
  29. **Chan, D. C., C. T. Chutkowski, and P. S. Kim.** 1998. Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:15613-15617.
  30. **Dragic, T., A. Trkola, D. A. D. Thompson, E. G. Cormier, F. A. Kajumo, E. Maxwell, S. W. Lin, W. Ying, S. O. Smith, T. P. Sakmar, and J. P. Moore.** 2000. A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:5639-5644.
  31. **Thompson, L. A. and J. A. Ellman.** 1996. Synthesis and applications of small molecule libraries. *Chem. Rev.* **96**:555-600.
  32. **Nefzi, A., J. M. Ostresh, and R. A. Houghten.** 1997. The current status of heterocyclic combinatorial libraries. *Chem. Rev.* **97**:449-472.
  33. **Nefzi, A., M. A. Giulianotti, and R. A. Houghten.** 2000. Solid-phase synthesis of substituted 2,3-diketopiperazines from reduced polyamides. *Tetrahedron* **56**:3319-3326.
  34. **Nefzi, A., J. M. Ostresh, and R. A. Houghten.** 1999. Parallel solid phase synthesis of tetrasubstituted diethylenetriamines via selective amide alkylation and exhaustive reduction of N-acylated dipeptides. *Tetrahedron* **55**:335-344.
  35. **James, J. S.** 2003. T-20: most expensive AIDS drug ever at \$25,000 per year? *AIDS Treat News*6-7.
  36. **Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss, and R. Axel.** 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**:333-348.
  37. **Bjorndal, A., H. Deng, M. Jansson, J. R. Fiore, C. Colognesi, A. Karlsson, J. Albert, G. Scarlatti, D. R. Littman, and E. M. Fenyo.** 1997. Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol.*7478-7487.

38. **Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. DiMarzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman, and N. R. Landau.** 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**:661-666.
39. **Houghten, R. A., C. Pinilla, J. R. Appel, S. E. Blondelle, C. T. Dooley, J. Eichler, A. Nefzi, and J. M. Ostresh.** 1999. Mixture-based synthetic combinatorial libraries. *J. Med. Chem.* **42**:3743-3778.
40. **Pinilla, C., J. R. Appel, P. Blanc, and R. A. Houghten.** 1992. Rapid identification of high affinity peptide ligands using positional scanning synthetic peptide combinatorial libraries. *Biotechniques* **13**:901-905.
41. **Nussbaum, O., C. C. Broder, and E. A. Berger.** 1994. Fusogenic mechanisms of enveloped-virus glycoproteins analyzed by a novel recombinant vaccinia virus-based assay quantitating cell fusion-dependent reporter gene activation. *J. Virol.* **68**:5411-5422.
42. **Boggiano, C.** Carga viral y características fenotípicas del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) aislado de pacientes hemofílicos: posible asociación con la progresión a enfermedad por HIV. 1994. Universidad de Buenos Aires - FCEyN - Seminario de Licenciatura.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
43. **Connor, R. I., B. K. Chen, S. Choe, and N. R. Landau.** 1995. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* **206**:935-944.
44. **Luo, Z., N. Zhou, J. Luo, J. W. Hall, and Z. Huang.** 1999. The role of positively charged residues in CXCR4 recognition probed with synthetic peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**:691-695.
45. **Signoret, N., J. Oldridge, A. Pelchen-Matthews, P. J. Klasse, T. Tran, L. F. Brass, M. M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, W. Holmes, W. Dallas, M. A. Luther, T. N. Wells, J. A. Hoxie, and M. Marsh.** Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4.
46. **Lasky, L. A., G. Nakamura, D. H. Smith, C. Fennie, C. Shimasaki, E. Patzer, P. Berman, T. Gregory, and D. J. Capon.** 1987. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type I gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell* **50**:975-985.
47. **Berger, E. A.** 1997. HIV entry and tropism: The chemokine receptor connection. *AIDS* **11**:S3-S16.
48. **Sattentau, Q. J. and J. P. Moore.** 1991. Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J. Exp. Med.* **174**:407-415.
49. **Dragic, T., A. Trkola, S. W. Lin, K. A. Nagashima, F. Kajumo, L. Zhao, W. C. Olson, L. Wu, C. R. Mackay, G. P. Allaway, T. P. Sakmar, J. P. Moore, and P. J. Maddon.** 1998. Amino-terminal substitutions in the CCR5 coreceptor impair gp120 binding and human immunodeficiency virus type 1 entry. *J. Virol.* **72**:279-285.
50. **Rabut, G. E., J. A. Konner, F. Kajumo, J. P. Moore, and T. Dragic.** 1998. Alanine substitutions of polar and nonpolar residues in the amino-terminal domain of CCR5

differently impair entry of macrophage- and dualtropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* **72**:3464-3468.

51. **Pontow, S. and L. Ratner.** 2001. Evidence for common structural determinants of human immunodeficiency virus type 1 coreceptor activity provided through functional analysis of CCR5/CXCR4 chimeric coreceptors. *J Virol.* **75**:11503-11514.
52. **Lin, G., F. Baribaud, J. Romano, R. W. Doms, and J. A. Hoxie.** 2003. Identification of gp120 binding sites on CXCR4 by using CD4-independent human immunodeficiency virus type 2 Env proteins. *J Virol.* **77**:931-942.
53. **Baritaki, S., A. Zafiroopoulos, M. Sioumpara, M. Politis, D. A. Spandidos, and E. Krambovitis.** 2002. Ionic interaction of the HIV-1 V3 domain with CCR5 and deregulation of T lymphocyte function. *Biochem Biophys Res Commun* **298**:574-580.
54. **Moulard, M., H. Lortat-Jacob, I. Mondor, G. Roca, R. Wyatt, J. Sodroski, L. Zhao, W. Olson, P. D. Kwong, and Q. J. Sattentau.** 2000. Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol.* 1948-1960.
55. **Roderiquez, G., T. Oravec, M. Yanagishita, D. C. Bou-Habib, H. Mostowski, and M. A. Norcross.** 1995. Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41. *J Virol.* PG.
56. **Cladera, J., I. Martin, and P. O'Shea.** 2001. The fusion domain of HIV gp41 interacts specifically with heparan sulfate on the T-lymphocyte cell surface. *EMBO J* **20** :19-26.
57. **Lortat-Jacob, H., A. Grosdidier, and A. Imberty.** 2002. Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:1229-1234.
58. **Dealwis, C., E. J. Fernandez, D. A. Thompson, R. J. Simon, M. A. Siani, and E. Lolis.** 1998. Crystal structure of chemically synthesized [N33A] stromal cell-derived factor 1alpha, a potent ligand for the HIV-1 "fusin" coreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:6941-6946.
59. **Proudfoot, A. E., S. Fritchley, F. Borlat, J. P. Shaw, F. Vilbois, C. Zwahlen, A. Trkola, D. Marchant, P. R. Clapham, and T. N. Wells.** 2001. The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity. *J Biol Chem* **276**:10620-10626.
60. **Zhang, L., W. Yu, T. He, J. Yu, R. E. Caffrey, E. A. Dalmasso, S. Fu, T. Pham, J. Mei, J. J. Ho, W. Zhang, P. Lopez, and D. D. Ho.** Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor.
61. **Müller, A., B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M. E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S. N. Wagner, J. L. Barrera, A. Mohar, E. Verástegui, and A. Zlotnik.** 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**:50-56.
62. **Libura, J., J. Drukala, M. Majka, O. Tomescu, J. M. Navenot, M. Kucia, L. Marquez, S. C. Peiper, F. G. Barr, A. Janowska-Wieczorek, and M. Z. Ratajczak.** 2002. CXCR4-SDF 1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion. *Blood* **100**:2597-2606.
63. **Phillips, R. J., M. D. Burdick, M. Lutz, J. A. Belperio, M. P. Keane, and R. M. Strieter.** 2003. The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am J Respir. Crit Care Med* **167**:1676-1686.



64. **Lukacs, N. W., A. Berlin, D. Schols, R. T. Skerlj, and G. J. Bridger.** 2002. AMD3100, a CxCR4 antagonist, attenuates allergic lung inflammation and airway hyperreactivity. *Am. J. Pathol.* **160**:1353-1360.
65. **Matthys, P., S. Hatse, K. Vermeire, A. Wuyts, G. Bridger, G. W. Henson, E. De Clercq, A. Billiau, and D. Schols.** 2001. AMD3100, a Potent and Specific Antagonist of the Stromal Cell-Derived Factor-1 Chemokine Receptor CXCR4, Inhibits Autoimmune Joint Inflammation in IFN- Receptor-Deficient Mice. *J. Immunol.* **167**:4686-4692.
66. **Nanki, T., K. Hayashida, H. S. El-Gabalawy, S. Suson, K. Shi, H. J. Girshick, S. Yavuz, and P. E. Lipsky.** 2000. Stromal Cell-Derived Factor-1-CXC Chemokine Receptor 4 Interactions Play a Central Role in CD4<sup>+</sup> T-Cell Accumulation in Rheumatoid Arthritis Synovium. *J. Immunol.* **165**:6590-6598.

## **Capítulo 2**

**Disección de la especificidad de un clon T CD8<sup>+</sup>  
específico para HIV-1 Gag<sub>77-85</sub>**

## **Introducción**

Más de veinte años después del descubrimiento del agente causante del SIDA, el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), aún no existe una vacuna capaz de controlar la pandemia. HIV y otros virus que establecen infecciones crónicas, generan una ineficiente respuesta inmune, incapaz de eliminar el virus. La respuesta inmune específica generada por HIV está compuesta por linfocitos B que generan anticuerpos, linfocitos T ayudadores CD4<sup>+</sup> y linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (CTL). Para generar o re-estimular esta respuesta inmune artificialmente (vacunación) se usan partículas (virus inactivado o pseudo-virus), proteínas recombinantes, péptidos sintéticos, vectores recombinantes (vaccinia, canary pox, adenovirus, MVA, etc), virus vivos atenuados, inmunización mediada por DNA y también combinaciones de proteínas y vectores, ambos recombinantes <sup>1</sup>.

Recientemente fueron publicados los resultados de AidsVax, el primer estudio clínico de fase III que usa como inmunógeno la glicoproteína de membrana de HIV de tipo 1 (HIV-1), gp120, generada en células de ovario de hámster. AidsVax fue diseñada para generar anticuerpos neutralizantes específicos para dos cepas de HIV-1 del subtipo B, el más prevalente en Norteamérica, Europa <sup>2</sup> y en 90% de las infecciones contraídas por contacto homosexual en nuestro país <sup>3</sup>. AidsVax falló al no reducir el número de nuevas infecciones en el grupo que recibió la vacuna comparado con el placebo <sup>4</sup>.

La alta variabilidad antigénica presente en diferentes aislamientos de HIV-1 es uno de los mayores problemas que presenta el desarrollo de una vacuna. No obstante, ciertos epitopes de CTL mantienen un alto grado de reconocimiento cruzado entre diferentes clades <sup>5</sup>. Por lo tanto, el descubrimiento de péptidos agonistas de CTL como potenciales componentes de una vacuna ya sea terapéutica o profiláctica para el tratamiento de la infección por HIV-1 es de capital importancia.

CTLs reconocen péptidos de entre 8 y 10 aminoácidos derivados de proteínas presentes en el citoplasma. Estos péptidos, se encuentran embebidos en la superficie del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-1). El complejo péptido-MHC presente en la superficie de la célula blanco es reconocido por el receptor T (TCR) de las CTLs. De esta manera, las CTL pueden producir la lisis directa de las células infectadas, como así también liberar citoquinas que a través de diferentes mecanismos colaboran con el control de la infección.

Ha sido demostrado en reiteradas oportunidades que la respuesta inmune llevada a cabo por CTL es de importancia crucial para el control de la infección por HIV-1 <sup>6</sup>. Por ejemplo, el 5% de la cohorte de prostitutas de Nairobi presentan una fuerte respuesta citotóxica específica y protectora, que las mantienen HIV-1 negativas, a pesar de estar expuestas al virus <sup>7</sup>. Otras evidencias de la importancia de la respuesta inmune celular están dadas por la coincidencia en la aparición de CTLs y la desaparición de la viremia en la primer fase de la infección; y más tarde, la desaparición de CTLs correlaciona con el avance final de la enfermedad <sup>8,9</sup>. Por otra parte, el aislamiento de mutantes de escape de CTLs, también demuestra que la respuesta inmune celular puede constreñir la replicación viral <sup>10</sup>. Por último, cuando se transfieren CTL específicas para HIV-1 en pacientes infectados, éstas mantienen su función lítica *in vivo*, relocalizan adyacente a células infectadas en los nódulos linfáticos y se detecta una reducción transitoria de los niveles de células CD4<sup>+</sup> activamente infectadas en la periferia <sup>11</sup>.

Aunque la infección primaria por HIV-1 está asociada con una vigorosa respuesta inmune celular citotóxica, generalmente no es suficiente para erradicar el virus. El deterioro de la respuesta CD4<sup>+</sup> puede ser una de las razones de esta deficiencia <sup>6,12,13</sup>. Otras causas que pueden afectar una apropiada respuesta citotóxica para eliminar el virus incluyen: 1) La disminución de la densidad de MHC-1 en la superficie celular producida por las proteínas Nef <sup>14</sup> y Tat <sup>15</sup> de HIV-1; 2) gp120 HIV-1 induce producción y liberación del ligando

de Fas induciendo la apoptosis en las CTLs que expresan Fas <sup>16</sup>; 3) La inducción de CD4 en células naïve CD8+, las hace susceptibles a ser infectadas por HIV-1 <sup>17</sup>; 4) gp120 también puede inducir apoptosis en células CD8+ por un mecanismo dependiente de TNF-II <sup>18</sup>.

Las CTLs pueden reconocer a través del TCR un alto número de péptidos <sup>19</sup> este fenómeno tendría relevancia en cuadros pato-fisiológicos: selección positiva o negativa en el timo <sup>22,23</sup>, anergia <sup>24</sup>, escape viral <sup>25,26</sup> y enfermedades autoinmunes <sup>27</sup>. Así, la identificación y caracterización de la población de péptidos naturales y artificiales que pueden estimular un específico clon de CTLs, puede ser explotada para moldear la respuesta inmune.

Los péptidos heteroclíticos son agonistas capaces de inducir una activación mayor en células T a la provocada por el péptido natural. Estos péptidos suelen tener sustituciones en los residuos de anclaje al MHC, en el caso de no poseer los residuos óptimos en estas posiciones, o también pueden tener sustituciones en los residuos relevantes para el reconocimiento del TCR. Estos análogos son sumamente importantes para el desarrollo de vacunas, ya que pueden inducir respuestas inmunes más fuertes que el péptido natural. El grupo de Alessandro Sette <sup>20</sup>, estudiando péptidos monosustituídos, demostró recientemente que análogos heteroclíticos pueden inducir CTLs fisiológicamente relevantes y de alta avidéz que reconocen péptidos nativos generados endógenamente por células tumorales. La gran mayoría de los péptidos heteroclíticos descubiertos hasta el momento contienen sustituciones de uno o dos aminoácidos de la secuencia natural del péptido. Las bibliotecas sintéticas combinatorias, (BSC) permiten identificar un panel de agonistas peptídicos que incluye ligandos con modificaciones en las posiciones relevantes para el MHC y/o el TCR, y es el único método capaz de revelar péptidos con sustituciones múltiples que tienen muy poco parecido al péptido natural. Por otra parte, Franco et al. reportaron recientemente que la generación de CTLs no requiere de la ayuda de células T CD4<sup>+</sup>, cuando el péptido inmunogénico se une al MHC-1 con alta afinidad <sup>21</sup>. Debido a la linfocitopenia CD4<sup>+</sup> que se desarrolla en las

personas HIV-1<sup>+</sup>, una vacuna peptídica que incluya péptidos inmunógenos específicos que se unen al MHC con alta afinidad podría generar CTLs aún en pacientes con bajos niveles de células T CD4<sup>+</sup>.

El promiscuo reconocimiento de péptidos de virus heterólogos por células T podría tener importantes consecuencias, como la amplificación de la protección contra sucesivas infecciones con diferentes virus, inducción de autoinmunidad <sup>28</sup> y modificación del pool de células T de memoria <sup>29</sup>. Por ejemplo, dos péptidos sin evidente homología de secuencia, derivados de diferentes proteínas del virus de la influenza fueron reconocidas por el mismo CTL clon en complejo con el mismo MHC <sup>30</sup>. Más recientemente, este fenómeno de reactividad cruzada fue puesto en evidencia entre epitopes específicos de virus diferentes en tres diferentes reportes. En 1994, Selin et al. publicaron experimentos que demostraban la reactividad citotóxica cruzada entre virus de la coriomeningitis linfocítica crónica (LCMV), Phichinde virus (PV) y vaccinia. En sucesivas infecciones con diferentes virus, fue observada una re-expansión de los clones con reactividad cruzada <sup>31</sup>. Asimismo, realizando sucesivas infecciones con LCMV y PV, se demostró cómo una infección previa modifica la jerarquía de las células T presentes en un individuo e identificaron los epitopes responsables del fenómeno <sup>32</sup>. CTLs específicas para el epitope inmunodominante del virus de la Influenza A, neuraminidasa231, también reconocen un péptido del virus de la hepatitis C (HCV) <sup>33</sup>. De esta manera, la historia infecciosa de cada individuo moldea la respuesta inmune celular que es capaz de montar.

El primer epitope elegido para generar péptidos heteroclíticos y estudios de reactividad cruzada fue Gag P17<sub>77-85</sub>, SLYNTVATL (SL9) <sup>34</sup>. Gag es una de las proteínas de HIV-1 que genera una mayor respuesta inmune cruzada entre diferentes clades. Por lo menos el 71% de los individuos HLA-A\*0201<sup>+</sup> y HIV-1<sup>+</sup> tienen en circulación CTLs que reconocen el péptido SL9 <sup>35</sup>. Este epitope es también importante porque aún en cuadros clínicos de alta carga viral, no se detecta aparición de variantes de escape <sup>36</sup>. También, existe una correlación

negativa entre la carga viral y los niveles de células marcadas con tetrámeros asociados a SL9 <sup>12</sup>.

**En síntesis, en este capítulo se utilizaron BSC para diseccionar el mecanismo por el cual células T CD8+ son funcionalmente activadas y mantenidas y profundizar el conocimiento de la calidad de la respuesta inmune humana frente a agentes infecciosos. Se identificaron péptidos capaces de estimular CTL específicas para HIV-1 Gag<sub>77-85</sub>, más eficientemente que los péptidos virales presentes durante la infección natural. Por otra parte, péptidos derivados de proteínas de virus heterólogos fueron identificados como agonistas específicos del CTL clon 161jXA14 específico para HIV-1 Gag<sub>77-85</sub>.**

## Estrategia y Métodos

### Nomenclatura de los aminoácidos:

Para este trabajo se utiliza el código de una letra para denominar a los 20 aminoácidos naturales: **A**, L-alanina; **C**, L-cisteína; **D**, L-ácido aspártico; **E**, L-ácido glutámico; **F**, L-fenilalanina; **G**, glicina; **H**, L-histidina; **I**, L-isoleucina; **K**, L-lisina; **L**, L-leucina; **M**, L-metionina; **N**, L-asparagina; **P**, L-prolina; **Q**, L-glutamina; **R**, L-arginina; **S**, L-serina; **T**, L-treonina; **V**, L-valina; **W**, L-triptofano; **Y**, L-tirosina.

### Medios de cultivo

RPMI-10: RPMI-1640 suplementado con 10% suero fetal bovino, 2mM L-glutamina, 10mM HEPES, 50µM β-mercaptoetanol, 5U/ml penicilina y 50µg/ml estreptomicina.

### Células presentadoras de antígeno (APC):

Las células T2 son un híbrido B-T linfoblastoide, HLA-A\*0201+, CD7+ y HLA DR-. T2 fueron usadas como APC en todos los ensayos realizados y fueron mantenidas en RPMI-10.

### Clones de CTLs

161jXA14, 115iB12, 115iB10 y 115iB19 son clones de CTLs CD8<sup>+</sup>, que reconocen específicamente HIV-1 Gag p17<sub>77-85</sub> en el marco de HLA-A\*0201 y fueron aisladas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de diferentes pacientes HIV-1<sup>+</sup>. Todos los clones utilizados fueron generados en el laboratorio del Dr. Bruce Walker del Massachusetts General Hospital. En breve, PBMCs de personas HIV-1<sup>+</sup>, enriquecidas en células CD8<sup>+</sup> después de eliminar con un método inmuno-magnético las células CD4<sup>+</sup>, fueron estimuladas con el péptido SLYNTVATL (SL9), presentado en PBMCs autólogas irradiadas. Este ciclo de estimulación antigénica específica fue repetido. Y la especificidad de la línea celular fue confirmada usando un ensayo de citotoxicidad específica contra



células HLA-A\*0201. Luego la línea celular fue estimulada inespecíficamente con fitohemaglutinina (PHA) y PBMCs heterólogas irradiadas, para ser clonada por el método de dilución límite. El clon de CTLs 161jXA14 fue derivado del paciente 161j. Los otros clones fueron derivados del paciente 115i.

Los clones fueron expandidos de acuerdo al protocolo de Riddel et al.<sup>37</sup> con ciertas modificaciones. En breve,  $0.5-1 \times 10^6$  CTLs fueron expandidas en un volumen final de 4ml de RPMI-10, en presencia de  $10 \times 10^6$  de PBMCs alogeneicas de un dador normal HIV-1 negativo y 30ng/ml de OKT3 (anticuerpo anti-CD3) incubando en un pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 12 huecos. Después de 1 día de incubación a 37°C 7% CO<sub>2</sub>, la mitad del medio fue reemplazado por medio fresco y con la adición de 300U/ml de interleuquina-2 (IL-2). Las células fueron incubadas en las mismas condiciones por 13 días más, reemplazando medio fresco e IL-2 para mantener una densidad celular de  $0.5-1 \times 10^6$  células/ml. En el día 8 una alícuota de las células se usó para ensayar la especificidad del clon durante la expansión, con un ensayo de citotoxicidad usando el péptido natural como control positivo. Después de los 14 días de expansión las células fueron re-expandidas, congeladas o se mantuvieron por un máximo de 2 semanas conservando la densidad celular entre de  $0.5-1 \times 10^6$  células/ml con adición de 300U/ml de IL-2 cada 3 días.

#### Ensayo de citotoxicidad:

La actividad citotóxica de los clones fue evaluada usando un ensayo de liberación de Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub><sup>38</sup>. En breve, se utilizaron células T2 HLA-A\*0201<sup>+</sup>, crecidas a una densidad menor a  $0.5 \times 10^6$  células/ml como APC. Las células T2 fueron incubadas por 1 hora con 100µl de Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> (1mCi/ml) a 37°C en 100ul de RPMI-10, para permitir la entrada del cromo radiactivo al citoplasma. Luego de dos lavados con 10ml de RPMI-10, estas células se usaron como blanco de la actividad de los clones. En una placa de 96 pocillos de fondo en U, con un volumen final de 200ul de RPMI-10 se mezclaron  $10^4$  células T2 marcadas con <sup>51</sup>Cr con 2000 CTLs (efector:blanco 1:5) y la correspondiente mezcla de la

biblioteca (100µg/ml). Las placas fueron centrifugadas a 400g por 2 minutos antes de incubarlas por 37°C, 7% CO<sub>2</sub>, por 4 horas. Después de la incubación, las placas fueron centrifugadas nuevamente a 400g 2 min. La cuentas por minuto (CPM) presente en 50µl de los sobrenadantes fue medida usando un contador gamma Wallac 1470. El porcentaje de lisis específica se calcula de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{ Lisis Esp.} = 100 \times \frac{(\text{CPM muestra} - \text{CPM espont.})}{(\text{CPM MAX} - \text{CPM espont.})}$$

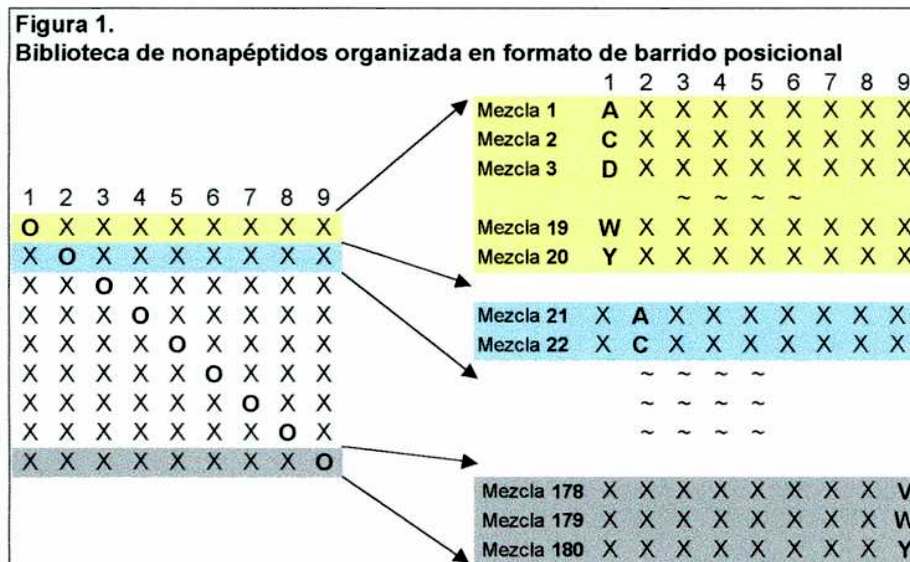
Donde CPM espont, son la cuentas liberadas espontáneamente sin péptido o mezcla y CPM MAX, son las cuentas en el sobrenadantes después de lisar las células usando el detergente NP40 0.25% (V/V).

El ensayo de citotoxicidad realizado para determinar la actividad de los péptidos individuales fue realizado en las mismas condiciones descritas arriba incubando en lugar de las mezclas de la biblioteca, diluciones de los péptidos. La concentración de péptido que produce 50% de la actividad máxima (EC<sub>50</sub>) fue calculada por medio de un programa de ajuste de curvas de gráficos científicos (GraphPad Prism).

#### Biblioteca peptídica (OX<sub>8</sub>):

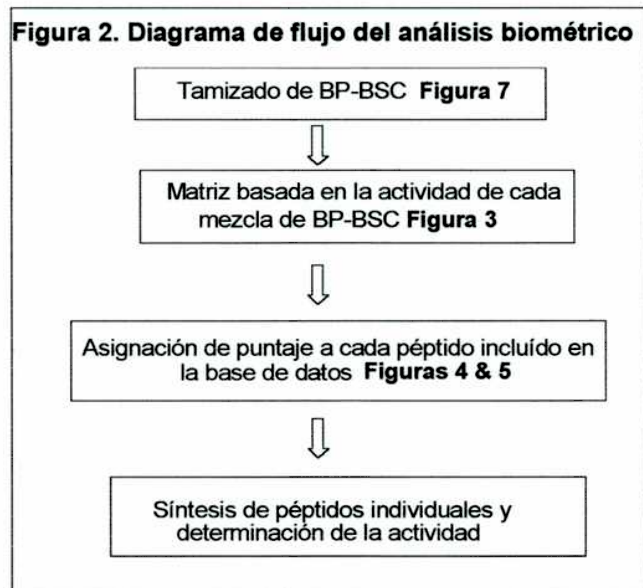
La biblioteca de L-nonapéptidos ensayada se encuentra amidada en el C-terminal y está organizada en forma de barrido posicional (BP)<sup>39</sup>, tal como fue descrito en la introducción general de este trabajo. La BSC, ordenada en formato de barrido posicional (BP-BSC) está compuestas por 9 sub-bibliotecas, cada una consiste en 20 mezclas separadas con una posición definida "O" y ocho posiciones no definidas "X" (OXXXXXXXX a XXXXXXXXO), en total de 180 (9X20) mezclas (Figura 1). Todos los 20 aminoácidos naturales fueron usados en las posiciones definidas "O", sin embargo C fue omitida en las posiciones no definidas "X" para reducir el número de puentes di-sulfuro dentro de las sub-bibliotecas. Así, cada mezcla contiene  $19^8 = 1.9 \times 10^9$  diferentes péptidos

individuales y la BP-BSC contiene en total  $3.8 \times 10^{10}$  ( $20 \times 19^8$ ) nonapéptidos diferentes, cada uno de ellos en aproximadamente la misma concentración, 52fM. Cada sub-biblioteca contiene los mismos péptidos, pero agrupados de diferente forma de acuerdo a qué posición se encuentra definida. En estudios preliminares se utilizó también una biblioteca con la misma estructura, pero carboxilada en el C-terminal.



Análisis biométrico:

El análisis biométrico compara la información derivada del tamizado de BP-BSC con todos los nonapéptidos de secuencias solapadas, presentes en bases de datos asignándoles un puntaje y prediciendo su capacidad estimuladora para un determinado clon de células T.



GenPept 1.7, la base de datos utilizada, contiene las secuencias de proteínas

organizadas en diferentes grupos: virales, bacterianas, humanas, etc. El diagrama de flujo de la figura 2 resume la estrategia a seguir. En primer lugar, se generó una matriz basada en los resultados del tamizado. Cada posición de la matriz adjudica un valor a un determinado aminoácido en una determinada posición. Este valor se basa en el porcentaje de lisis obtenido para la mezcla de la biblioteca con ese aminoácido definido en esa posición (Figura 3). El análisis biométrico utiliza esa matriz para adjudicar un puntaje a todos los nonapéptidos de todas las proteínas presentes en la base de datos GenPept 1.7, moviendo la ventana de puntaje de a un aminoácido (Figura 4).

**Figura 3. Matriz basada en la actividad de cada muestra derivada del barrido posicional**

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	1.92	1.745	2.145	1.475	0.83	1.855	18.31	2.535	0.925
C	1.265	0.89	-1.36	0.495	0.67	0.525	-1.275	0.18	0.565
D	0.38	-2.13	-0.47	-0.35	-1.22	0.09	-0.705	-0.85	-0.355
E	-1.165	-0.05	-1.395	-2.89	-2.28	-1.555	-1.19	-0.28	0.185
F	2.15	-0.385	7.16	0.215	-1	0	1.255	-0.185	-0.425
G	1.535	1.315	1.44	0.96	1.625	0.415	0.665	0.795	1.815
H	-1.73	-0.875	2.195	1.165	-0.68	-0.325	-0.485	0.38	0.79
I	2.35	0.93	-0.47	1.235	-0.125	1.46	-0.61	-0.375	13.81
K	-0.73	0.05	-0.795	-0.73	-1.51	-1.845	-1.335	-0.915	-0.19
L	0.85	2.745	0.99	1.775	-0.14	0.7	-0.565	0.305	2.46
M	1.415	2.53	1.2	1.145	0.525	0.98	2.305	-0.03	0.945
N	-0.195	-0.68	-0.845	0.31	0	0.505	-0.565	-0.4	1.815
P	-0.685	-1.25	0.855	0.71	0.24	0	-1.18	0.185	0.07
Q	-0.14	-0.9	-1.075	-1.475	-0.675	-0.93	-1.16	0	0.635
R	1.445	0.345	-0.14	-0.61	-0.27	-0.115	0.195	0.82	1.585
S	1.555	0.64	0.87	0.565	0.36	2.665	0.31	2.185	2.465
T	0.36	-1.695	0.19	0.175	15.815	0.64	-1.06	9.42	1.39
V	0.605	-0.09	-1.535	0.27	-1.36	4.335	-0.8	-0.635	0.45
W	0.17	-0.765	-0.235	0.315	-1.56	-0.545	-0.895	-1.82	1.315
Y	0.615	-0.715	4.36	0.415	0.13	0.015	0.51	0.14	0.68

SL9 S L Y N T V A T L Puntaje 59.11

**Figura 4. Adjudicación de puntaje a cada nonapéptido presente en la base de datos**

Amino ácido	75	80	85	90																																		
E L R	<table border="1"> <thead> <tr><th>P1</th><th>P2</th><th>P3</th><th>P4</th><th>P5</th><th>P6</th><th>P7</th><th>P8</th><th>P9</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>S</td><td>L</td><td>Y</td><td>N</td><td>T</td><td>V</td><td>A</td><td>T</td><td>L</td></tr> <tr><td>1.56</td><td>2.75</td><td>4.36</td><td>0.31</td><td>15.62</td><td>4.34</td><td>18.31</td><td>9.42</td><td>2.46</td></tr> </tbody> </table>									P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	S	L	Y	N	T	V	A	T	L	1.56	2.75	4.36	0.31	15.62	4.34	18.31	9.42	2.46	Y C V H Q	Puntaje
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9																														
S	L	Y	N	T	V	A	T	L																														
1.56	2.75	4.36	0.31	15.62	4.34	18.31	9.42	2.46																														
											59.11																											
E L R S	<table border="1"> <thead> <tr><th>P1</th><th>P2</th><th>P3</th><th>P4</th><th>P5</th><th>P6</th><th>P7</th><th>P8</th><th>P9</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>L</td><td>Y</td><td>N</td><td>T</td><td>V</td><td>A</td><td>T</td><td>L</td><td>Y</td></tr> <tr><td>0.85</td><td>-0.72</td><td>-0.85</td><td>0.18</td><td>-1.36</td><td>1.86</td><td>-1.06</td><td>0.31</td><td>0.68</td></tr> </tbody> </table>									P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	L	Y	N	T	V	A	T	L	Y	0.85	-0.72	-0.85	0.18	-1.36	1.86	-1.06	0.31	0.68	C V H Q	Puntaje
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9																														
L	Y	N	T	V	A	T	L	Y																														
0.85	-0.72	-0.85	0.18	-1.36	1.86	-1.06	0.31	0.68																														
											-0.14																											
E L R S L	<table border="1"> <thead> <tr><th>P1</th><th>P2</th><th>P3</th><th>P4</th><th>P5</th><th>P6</th><th>P7</th><th>P8</th><th>P9</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>Y</td><td>N</td><td>T</td><td>V</td><td>A</td><td>T</td><td>L</td><td>Y</td><td>C</td></tr> <tr><td>0.62</td><td>-0.68</td><td>0.19</td><td>0.27</td><td>0.83</td><td>0.64</td><td>-0.57</td><td>0.14</td><td>0.57</td></tr> </tbody> </table>									P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	Y	N	T	V	A	T	L	Y	C	0.62	-0.68	0.19	0.27	0.83	0.64	-0.57	0.14	0.57	V H Q	Puntaje
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9																														
Y	N	T	V	A	T	L	Y	C																														
0.62	-0.68	0.19	0.27	0.83	0.64	-0.57	0.14	0.57																														
											2.01																											

De esta manera, todos los nonapéptidos de la base de datos son ordenados de acuerdo a la sumatoria del puntaje adjudicado a cada uno de sus

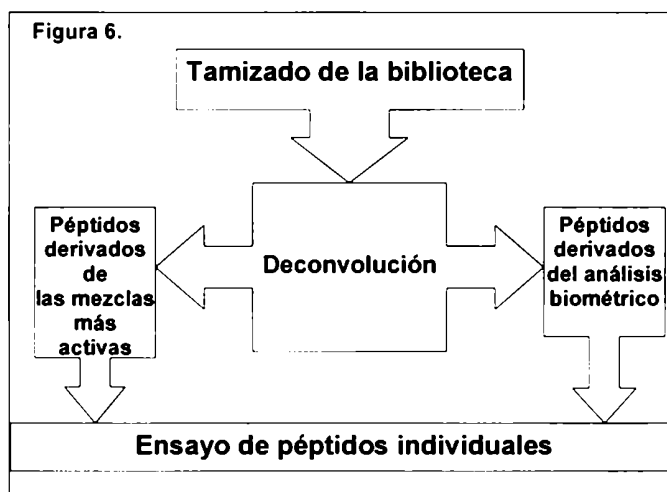
Figura 5 Péptidos con mayor puntaje de la base de datos viral

Orden	Puntaje	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Proteína
1	73.26	S	L	F	N	T	V	A	T	I	Z76155 Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 RNA p17
2	70.78	S	L	F	N	T	A	A	T	I	Z76281 Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 RNA p17
3	68.92	L	L	Y	M	T	S	A	T	I	U86600 Pestivirus type 1 noncytopathic genomic RNA, complete
4	68.29	T	A	F	I	T	T	A	T	I	AJ009721 Feline calicivirus isolate V66/97 capsid protein
5	67.58	S	L	Y	N	T	I	A	T	I	Z79576 Human immunodeficiency virus type 1 gene coding for matrix protein
6	66.02	V	V	F	Q	T	S	A	T	I	X17403 Human herpesvirus 5 Human cytomegalovirus strain AD169, complete
7	65.59	D	R	A	I	T	V	A	T	I	U88845 Turnip yellow mosaic virus variant D5, virion protein (VP) gene.
8	64.95	A	I	Y	T	T	G	A	T	I	U29999 Human immunodeficiency virus type 1 isolate D91- <del>879</del> gp V3 region(env) m
9	64.94	A	F	Y	A	T	G	A	T	I	U69442 Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 patieabk <del>g</del> gene, C4 C3 region
10	64.84	L	V	Y	P	T	A	A	T	I	M30594 Murine adenovirus type 1 Mouse adenovirus type 1 E3 region

aminoácidos, que es predictor de su capacidad de estimular el clon T utilizado para el tamizado (Figura 5). La lista de péptidos incluye además de su secuencia, un número de identificación de acceso a la secuencia original, proteína y organismo del cual derivan. El código de cada péptido se usa para acceder, a través de Internet y el sitio Entrez/Pubmed del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos, a toda la información disponible sobre esa secuencia.

Estrategia:

La estrategia utilizada para la identificación de nuevos péptidos agonistas de la actividad citotóxica de células T se encuentra resumida en la Figura 6. En breve, los datos obtenidos del tamizado de la biblioteca, sirvieron para generar dos diferentes colecciones de



péptidos. Un criterio de deconvolución consistió en elegir los aminoácidos favoritos para cada posición del péptido, de acuerdo a la actividad producida por cada mezcla de la biblioteca. Los aminoácidos cuyas mezclas correspondientes generaron la mayor actividad en una dada posición son seleccionados para generar una primera colección de péptidos. La segunda forma de analizar los resultados del tamizado, el análisis biométrico, consistió en encontrar

nonámeros presentes en bases de datos de proteínas que son capaces de estimular el clon de CTLs. Así, se generó una segunda colección de péptidos. Si el epitope del clon de CTLs es desconocido, este sistema puede ser de incalculable valor para identificarlo. Finalmente, ambos grupos de nonapéptidos, derivados de las actividades máximas y de la base de datos, fueron ensayados por su capacidad de generar actividad citolítica en las mismas condiciones que el tamizado y también en diferentes clones con la misma especificidad.

#### Predicción de la unión a HLA-A\*0201:

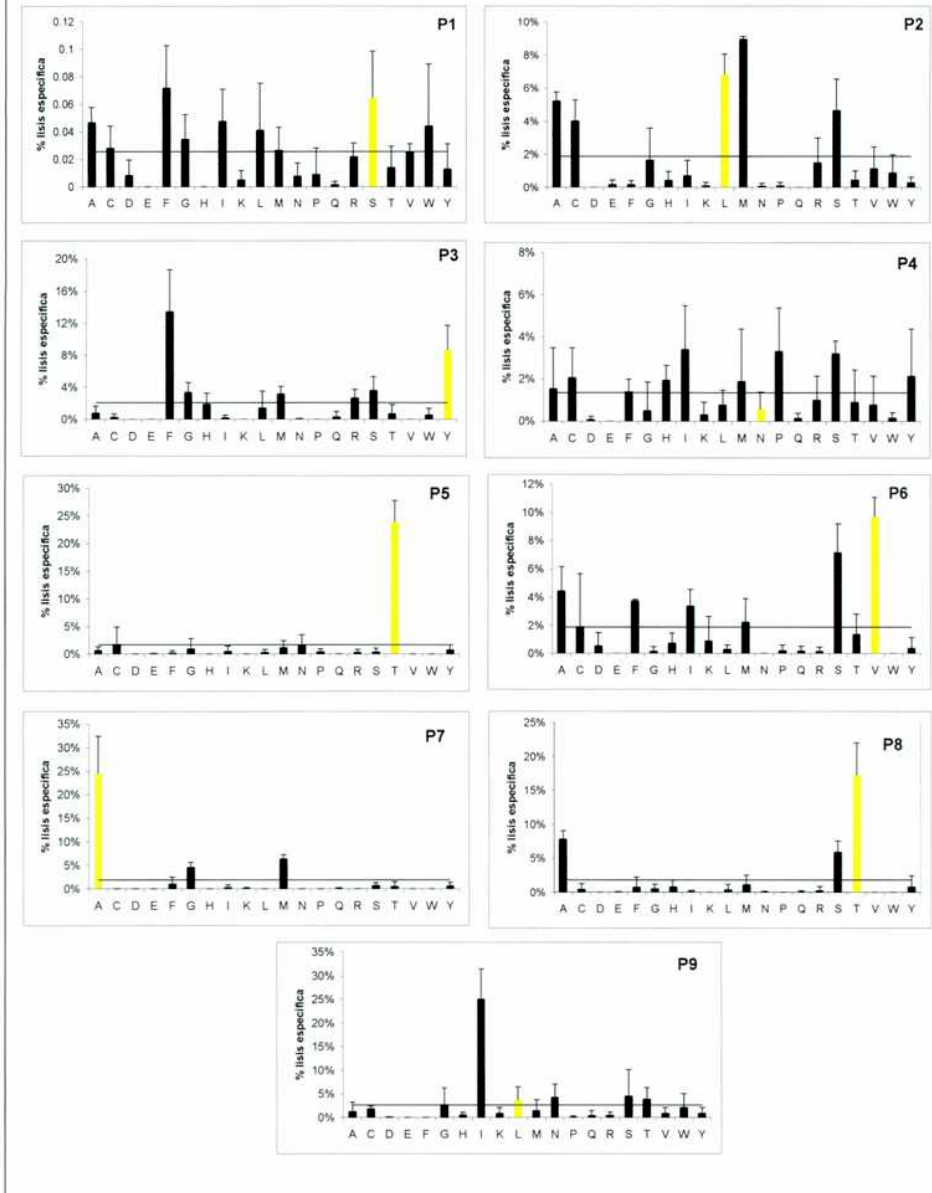
SYFPEITHI es una base de datos que permite identificar motivos en secuencias peptídicas y determinar su probabilidad de unión a diferentes MHC. Desde 1999, es posible hacer predicciones de unión, accediendo a través del sitio [www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de). Esta página permite determinar la fuerza de unión de una determinada secuencia de aminoácidos a un determinado MHC de clase I o II. El algoritmo utilizado evalúa cada aminoácido de la secuencia peptídica y le adjudica un valor arbitrario de 1 a los aminoácidos preferidos levemente y un valor de 15 a los residuos considerados de anclaje. La asignación de estos valores está basada en la frecuencia de los respectivos aminoácidos en ligandos naturales, artificiales y/o epitopes de células T.

## **Resultados:**

### **Tamizado de la biblioteca de nonapéptidos:**

Dado que los clones utilizados reconocen un péptido natural de HIV-1 compuesto por 9 aminoácidos, una biblioteca de nonapéptidos fue usada para escrutar la actividad citotóxica en presencia del clon de CTLs 161jXA14, específico para Gag p17<sub>77-85</sub>. Para determinar cuál es la biblioteca más apropiada para analizar la especificidad del clon 161jXA14, primero se ensayaron sólo dos posiciones (2 y 4) de dos diferentes bibliotecas de nonapéptidos (cuatro sub-bibliotecas) que difieren en sus carboxi terminales; una lo tiene carboxilado y la otra amidado. La lisis específica generada cuando se usó la biblioteca de nonapéptidos amidados fue mayor con respecto a la biblioteca carboxilada, por lo tanto la primera, fue utilizada para identificar las secuencias agonistas del clon (dato no presentado). Las 180 mezclas que componen la BP-BSC de nonapéptidos (OX<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub>) fueron ensayadas a 100µg/ml en duplicado por su capacidad de generar lisis específica de células blanco cargadas con Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> en presencia del clon 161jXA14. Este ensayo fue repetido entre 3 y 6 veces para cada posición. En la figura 7 se presenta el promedio de todos los resultados del tamizado; cada gráfico representa una sub-biblioteca con una posición definida (P1, P2, .....P9) y cada barra representa la lisis específica generada por cada mezcla y los corchetes el desvío estándar. Las barras amarillas corresponden a la mezcla que posee el aminoácido definido para esa posición en SL9. Las actividades producidas por cada muestra oscilaron entre 0% y 30% de lisis específica. La barra horizontal representa el valor promedio de lisis específica de cada sub-biblioteca.

Figura 7. Actividad citotóxica del clon 161jXA14 con la biblioteca de L-nonapéptidos



Los péptidos presentados en el marco del HLA-A\*0201 con alta eficiencia, poseen aminoácidos específicos en las posiciones 2 y 9. Estos aminoácidos poseen alta hidrofobicidad que permiten el anclaje del péptido al MHC. SL9 contiene L en ambas posiciones. El perfil inducido por el clon para la posición 2, muestra claramente la preferencia por péptidos con L o M. Estos dos aminoácidos son los reportados en la literatura como mayoritariamente



encontrados en la posición 2 de péptidos presentados en el marco del HLA-A\*0201 <sup>40</sup>. Para la posición 9, los aminoácidos favoritos para el anclaje son mayoritariamente **L** o **V** también hidrofóbicos. En los resultados obtenidos de la sub-biblioteca P9, la mezcla con **I** (XXXXXXXXXI) definida produjo mayor actividad. Por la similar estructura química que comparte con **L**, **L**→**I** se considera una sustitución muy conservadoras <sup>20</sup>. Cabe destacar que en las dos posiciones de anclaje (2 y 9), la actividad de las mezclas con aminoácidos con carga, resultaron significativamente más bajas, confirmando hallazgos previos <sup>41</sup>. En la posición 6 también se encontró actividad en las mezclas con **V** (XXXXXVXXX), que es considerado un residuo de anclaje auxiliar para HLA-A\*0201. SL9 3**Y**→**F** y 6**V**→**I** son mutaciones encontradas en el virus aislado del paciente 161j <sup>36</sup>. Este reemplazo fue también observado en la reactividad de las mezclas **F** (XXFXXXXXXXX) y **Y** (XXYXXXXXXXX) de la sub-biblioteca definida para la posición 3.

Aunque muchas mezclas de la sub-biblioteca P1 indujeron considerable actividad, la mezcla que contiene **S** (SXXXXXXXX) resultó entre las dos más activas. **S** es el aminoácido que se encuentra en la posición 1 de SL9. Similarmente, en la sub-biblioteca P4 muchas mezclas, en general con residuos definidos no polares, mostraron actividad citolítica específica. Sorprendentemente, el residuo de SL9 correspondiente a esta posición es **N** que es polar, y su mezcla correspondiente (XXXNXXXXX), no indujo actividad. El resto de las sub-bibliotecas (P3, P5, P7 y P8) resultaron consistentes con la secuencia de SL9 y mostraron notable actividad asociada a un limitado número de mezclas. Finalmente en 7 de las 9 posiciones, las mezclas más activas corresponden a los aminoácidos presentes en el péptido natural, SL9 (Figura 7. barras amarillas).

## Deconvolución generada de las mezclas más activas:

Basándose en la actividad de las mezclas de la biblioteca de nonapéptidos, se sintetizaron 32 péptidos. Para las posiciones 1, 3, 4, y 9 se eligieron los aminoácidos correspondientes a las dos mezclas que produjeron mayor actividad citolítica específica. En cambio, un solo aminoácido fue elegido para las posiciones 2, 5, 7 y 8, basándose en la menor cantidad de mezclas activas y las características físico-químicas de los aminoácidos definidos en ellas. Finalmente **V**, **S**, y **A**, fueron las mezclas que indujeron mayor actividad en la posición 6. **V** fue elegida por ser la mezcla más activa y su reconocida función de anclaje para HLA-A\*0201; el segundo aminoácido elegido para esta posición fue **A**, debido a su mayor hidrofobicidad (posición de anclaje secundario) comparado con **S** que es polar (Tabla 1). Con todas las combinaciones posibles de estos aminoácidos se sintetizaron 32 péptidos con el carboxi terminal amidado de acuerdo a la

**Tabla 1.**

Aminoácidos seleccionados para cada posición

P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
F	M	F	I	T	V	A	T	I
S		Y	S		A			S
2 X	1 X	2 X	2 X	1 X	2 X	1 X	1 X	2 X

**= 32**

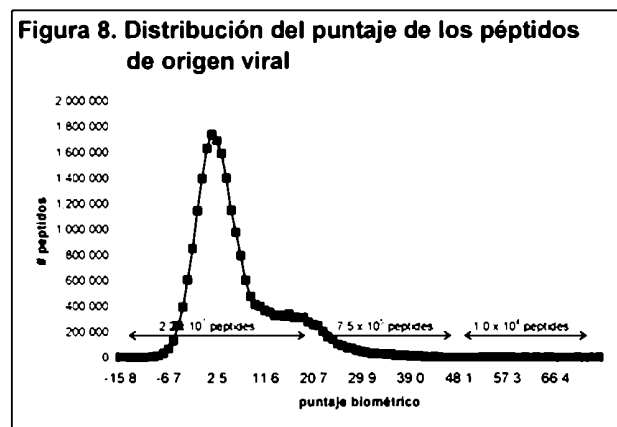
**Tabla 2. Péptidos derivados de las mezclas más activas**

#	péptido									#	
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9		
1	F	M	F	I	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5
2	F	M	F	I	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	5
3	F	M	F	I	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6
4	F	M	F	I	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	6
5	F	M	F	S	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5
6	F	M	F	S	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	5
7	F	M	F	S	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6
8	F	M	F	S	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	6
9	F	M	Y	I	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4
10	F	M	Y	I	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	4
11	F	M	Y	I	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5
12	F	M	Y	I	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	5
13	F	M	Y	S	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4
14	F	M	Y	S	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	4
15	F	M	Y	S	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5
16	F	M	Y	S	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	5
17	S	M	F	I	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4
18	S	M	F	I	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	4
19	S	M	F	I	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5
20	S	M	F	I	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	5
21	S	M	F	S	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4
22	S	M	F	S	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	4
23	S	M	F	S	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5
24	S	M	F	S	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	5
25	S	M	Y	I	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	3
26	S	M	Y	I	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	3
27	S	M	Y	I	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4
28	S	M	Y	I	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	4
29	S	M	Y	S	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	3
30	S	M	Y	S	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	3
31	S	M	Y	S	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4
32	S	M	Y	S	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	4

biblioteca usada para el tamizado. En la Tabla 2, se encuentran listados todos los péptidos numerados del 1 al 32, con residuos en rojo se identificaron los aminoácidos correspondientes a SL9 y se incluyó además el número de sustituciones con respecto a SL9 (#33).

### Deconvolución generada del análisis biométrico:

La matriz generada con los resultados del BP-BSC con el clon 161jXA14 fue utilizada para adjudicar puntaje a cada uno de los nonapéptidos en las proteínas virales incluidas en GenPept 1.7. Así se obtuvo una lista ordenada



por puntaje estimuladorio, de más de 22 millones de nonapéptidos, incluidos en 102.359 proteínas virales. La distribución de los 22 millones de péptidos muestra claramente que muy pocos péptidos poseen alto puntaje, sólo 10.000 péptidos tienen un puntaje mayor a 48 (Figura 8). El péptido nativo, HIV-1 Gag<sub>77-85</sub>, se ubicó en la posición 116 con un puntaje de 59.11 (Tabla 3). Los nonapéptidos que obtuvieron el mayor puntaje fueron sustituciones dobles y triples de SL9, derivadas de la región Gag p17<sub>77-85</sub> de HIV-1 y aisladas de pacientes HIV-1<sup>+</sup> (Tabla 3). Esto indica que si la especificidad del clon hubiese sido desconocida, la identidad del epítotope y la correspondiente especie viral asociada podrían haber sido desenmascaradas. Con mayor puntaje que SL9 se ubicaron 45 diferentes secuencias derivadas de proteínas de HIV-1 y 68 entre las primeras 300 secuencias. Estos resultados sugieren una alta probabilidad de reacción cruzada en una cohorte de diferentes individuos. El siguiente paso consistió en la síntesis de péptidos individuales con alto puntaje. Fueron sintetizados un total de 67 péptidos, los 50 con mayor puntaje y todos los pertenecientes a proteínas de HIV-1 con mayor puntaje que SL9 (116) (Tabla 3).

**Tabla 3. Análisis biométrico del clon 161jXA14**

**Péptidos seleccionados de la base de datos viral**

Pept.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	#subs	Orden Biom	Puntaje Biom	Unión a HLA*0201	Especie de origen	
33	S	L	Y	N	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	0	116	59.11	31	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 RNA p17 region
34	S	L	F	N	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	2	1	73.26	29	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 RNA p17 region
35	S	L	F	N	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	3	2	70.78	25	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 RNA p17 region
36	L	L	Y	M	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4	3	68.92	25	pestivirus type 1 Pestivirus type 1 noncytopathic
37	T	A	F	I	T	T	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	4	68.30	19	Feline calicivirus Feline calicivirus isolate V66/97
38	S	L	Y	N	T	I	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	2	5	67.59	29	Human immunodeficiency virus type 1 Human
39	V	V	F	Q	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	6	66.02	18	human herpesvirus b Human cytomegalovirus strain AD169
40	D	R	A	I	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	7	65.60	17	Turnip yellow mosaic virus Turnip yellow mosaic virus
41	A	I	Y	T	T	G	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	8	64.96	23	Human immunodeficiency virus type 1 Human
42	A	F	Y	A	T	G	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	9	64.94	15	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 patient I.
43	L	V	Y	P	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	10	64.84	21	Murine adenovirus type 1 Mouse adenovirus type 1 E3
44	T	I	Y	H	T	L	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	11	64.67	25	Bacteriophage A511 Bacteriophage A511 orf1, orf2, cps.
45	R	D	F	S	T	F	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	12	64.20	13	unidentified entomopoxvirus Amsacta entomopoxvirus
46	I	L	F	L	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	3	13	64.17	31	Newcastle disease virus Newcastle disease virus HN
47	G	A	A	G	T	N	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	14	64.04	21	Nudaurelia capensis omega virus capsid protein
48	R	R	A	L	T	T	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	15	63.50	16	Human rotavirus Human rotavirus mRNA for VP6.
49	L	M	F	V	T	V	A	R	I	-NH <sub>2</sub>	6	16	63.50	25	Cercopithecine herpesvirus 9 Cercopithecine herpesvirus
50	I	M	D	L	T	D	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	17	63.43	22	gallid herpesvirus 1 Gallid herpesvirus 1 genes for
51	T	G	L	K	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	18	63.42	18	Pseudomonas aeruginosa phage phi CTX Pseudomonas
52	I	E	H	G	T	T	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	19	63.25	18	Dengue virus type 1 Dengue virus type 1 clone
53	F	V	I	L	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	20	63.18	19	African swine fever virus African swine fever virus.
54	P	Q	Y	S	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	21	63.16	10	Macaca mulatta rhadinovirus 17577 Macaca mulatta
55	I	V	S	T	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	22	63.12	18	tomato ringspot virus Tomato ringspot virus isolate
56	T	K	A	A	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	23	63.04	14	Paramecium bursaria Chlorella virus 1 Paramecium
57	I	P	P	H	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	24	62.94	14	salmonid herpesvirus 1 Salmonid herpesvirus 1 DNA
58	V	G	F	A	T	V	A	L	I	-NH <sub>2</sub>	6	25	62.93	16	human herpesvirus 5 Human cytomegalovirus DNA for UL33
59	Q	E	F	I	T	V	A	A	I	-NH <sub>2</sub>	6	26	62.81	10	Bacteriophage RB70 Bacteriophage RB70 DNA for DenV and
60	G	Y	M	G	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	27	62.80	16	Bacteriophage lambda Bacteriophage lambda, complete
61	S	V	S	L	T	I	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	28	62.73	22	Influenza A virus Influenza virus type A genomic RNA
62	D	R	T	V	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	29	62.68	14	Turnip yellow mosaic virus Turnip yellow mosaic virus
63	T	G	H	G	T	T	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	30	62.63	16	Dengue virus type 1 Dengue virus type 1 isolate
64	K	I	L	A	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	31	62.49	23	Simian parainfluenza virus 41 P protein (RNA edited)
65	S	P	Y	G	T	H	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4	32	62.46	17	Citrus tristeza virus Citrus tristeza virus p346.
66	Q	A	S	G	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	33	62.45	18	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 isolate
67	S	C	F	V	T	V	A	R	I	-NH <sub>2</sub>	5	34	62.37	17	Simian foamy virus Simian foamy virus env gene.
68	S	T	G	I	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	35	62.36	18	Pelargonium leaf curl virus putative RNA polymerase.
69	G	G	A	Y	T	H	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	36	62.24	14	human calicivirus Human enteric calicivirus (Manchester
70	S	V	S	I	T	I	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	37	62.19	22	influenza A virus (A/Quail/Hong Kong/G1/97 (H9N2))
71	T	A	G	A	T	P	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	38	62.18	16	Potato virus X Potato virus X coat protein gene, DY
72	S	P	Y	D	T	L	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4	39	62.17	20	Raccoonpox virus Raccoon poxvirus hemagglutinin gene.
73	S	L	F	S	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	2	40	62.17	31	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 RNA p17-p24
74	K	S	Y	F	T	N	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	41	62.15	13	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 isolate
75	L	G	T	M	T	I	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	42	62.12	17	O1 coliphage T4 Coliphage T4, complete genome; 7/1999
76	T	E	H	G	T	I	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	43	62.08	18	Dengue virus type 1 Sequence 1 from Patent WO9322440;
77	N	L	A	L	T	E	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	44	62.07	24	beet soil-borne virus Beet soil-borne virus genes for
78	D	Q	S	F	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	45	62.06	14	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus Kaposi's
79	S	V	T	L	T	I	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	46	62.05	21	Influenza A virus H3N2 Influenza A virus H3N2
80	Q	L	L	S	T	L	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	47	62.02	28	Mumps virus Mumps virus genomic RNA for fusion
81	S	S	G	S	T	T	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	48	62.00	16	bacteriophage #D Bacteriophage #D gene for
82	G	I	T	A	T	L	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	49	61.99	24	Plutella xylostella granulovirus Plutella xylostella
83	S	L	F	N	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	1	49	61.91	31	Human immunodeficiency virus type 1 Human
84	Q	I	T	N	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	62	61.11	19	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 isolate DH12
85	S	L	F	N	T	V	A	T	T	-NH <sub>2</sub>	2	67	60.84	25	Human immunodeficiency virus type 1 Human
86	S	L	F	N	T	I	A	I	I	-NH <sub>2</sub>	4	72	60.59	27	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 strain C14
87	K	A	L	G	T	G	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	73	60.54	21	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 isolate
88	T	L	N	C	T	N	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	75	60.42	23	Human immunodeficiency virus type 1 Human
89	S	L	F	N	T	V	A	T	H	-NH <sub>2</sub>	2	78	60.24	21	Human immunodeficiency virus type 1 Human
90	L	V	G	P	T	P	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	85	60.07	20	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 patient 7
91	T	M	N	N	T	N	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	87	60.02	21	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 strain C21
92	T	L	N	C	T	D	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	88	60.00	23	Human immunodeficiency virus type 1
93	S	L	F	N	T	V	A	T	V	-NH <sub>2</sub>	2	89	59.90	31	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 isolate
94	S	K	N	A	T	N	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	90	59.90	15	Human immunodeficiency virus type 1 Human
95	V	L	F	A	T	G	A	I	I	-NH <sub>2</sub>	6	95	59.76	22	Human immunodeficiency virus type 1 Human
96	S	L	F	N	T	V	A	T	P	-NH <sub>2</sub>	2	100	59.52	21	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 isolate CP9
97	S	L	F	N	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	2	101	59.43	27	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 clone
98	S	L	Y	S	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	1	104	59.37	31	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 RNA p17
99	A	L	F	T	T	R	A	I	I	-NH <sub>2</sub>	6	110	59.25	23	Human immunodeficiency virus type 1 Human
100	S	L	Y	Y	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	1	111	59.22	30	Human immunodeficiency virus type 1 Human



Actividad de compuestos individuales en el clon original:

Los péptidos cuya secuencia fue derivada de las mezclas más activas, fueron ensayados en primer lugar sobre el clon 161jXA14, el mismo usado para el tamizado de la biblioteca. Los péptidos fueron ordenados por su actividad y agrupados de acuerdo a su actividad citotóxica con respecto a SL9 (Tabla 4). Se eligieron arbitrariamente intervalos de un logaritmo: 0.02nM a 0.22nM, el rango al que pertenece SL9-1X; 0.23nM a 2.2nM, SL9-10X; 2.3nM a 22nM, SL9-100X; 23nM a 222nM, SL9-1000X , etc. De los 32 péptidos, 11 (#21, #13, #11, #19, #15, #7, #31, #5, #29, #9 y #3)

**Tabla 4.**  
**Actividad citotóxica de péptidos individuales con el clon 161jXA14**

Pep										#subs	EC <sub>50</sub>	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		nM	
33	S	L	Y	N	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	0	0.111
21	S	M	F	S	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4	0.010
13	F	M	Y	S	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4	0.030
11	F	M	Y	I	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	0.039
15	F	M	Y	S	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	0.054
19	S	M	F	I	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	0.056
7	F	M	F	S	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	0.063
31	S	M	Y	S	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4	0.067
5	F	M	F	S	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	0.070
29	S	M	Y	S	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	3	0.101
9	F	M	Y	I	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4	0.156
3	F	M	F	I	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	0.221
25	S	M	Y	I	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	3	0.268
17	S	M	F	I	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4	0.415
6	F	M	F	S	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	5	1.218
22	S	M	F	S	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	4	1.261
14	F	M	Y	S	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	4	3
23	S	M	F	S	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	3
8	F	M	F	S	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	6	4
18	S	M	F	I	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	4	5
30	S	M	Y	S	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	3	5
16	F	M	Y	S	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	5	5
12	F	M	Y	I	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	5	6
32	S	M	Y	S	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	4	8
20	S	M	F	I	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	5	11
1	F	M	F	I	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	12
28	S	M	Y	I	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	4	13
27	S	M	Y	I	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4	17
4	F	M	F	I	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	6	17
10	F	M	Y	I	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	4	18
24	S	M	F	S	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	5	24
2	F	M	F	I	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	5	30
26	S	M	Y	I	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	3	>100

SL9 1X = EC<sub>50</sub> < 0.22nM  
 10X = 0.23nM < EC<sub>50</sub> < 2.2nM  
 100X = 2.3nM < EC<sub>50</sub> < 22nM  
 EC<sub>50</sub> > 22.3nM

demonstraron poseer actividad (EC<sub>50</sub>) en el rango SL9-1X. Todos estos péptidos presentan entre 3 y 6 sustituciones con respecto al péptido natural (SL9) y tienen I en la posición 9. El cambio I→S en la posición 9 de anclaje, confirma la predicción de la biblioteca donde la mezcla con I9 definida (XXXXXXXXXI)

**Tabla 3. Análisis biométrico del clon 161jXA14**

**Péptidos seleccionados de la base de datos viral**

Pept.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	#subs	Orden Biom	Puntaje Biom	Unión a HLA*0201	Especie de origen	
33	S	L	Y	N	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	0	116	59.11	31	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 RNA p17 region
34	S	L	F	N	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	2	1	73.26	29	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 RNA p17 region
35	S	L	F	N	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	3	2	70.78	25	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 RNA p17 region
36	L	L	Y	M	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4	3	68.92	25	pestivirus type 1 Pestivirus type 1 noncytopathic
37	T	A	F	I	T	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	4	68.30	19	Feline calicivirus Feline calicivirus isolate V66/97	
38	S	L	Y	N	T	I	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	2	5	67.59	29	Human immunodeficiency virus type 1 Human
39	V	V	F	Q	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	6	66.02	18	human herpesvirus 5 Human cytomegalovirus strain AD169
40	D	R	A	I	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	7	65.60	17	Turnip yellow mosaic virus Turnip yellow mosaic virus
41	A	I	Y	T	T	G	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	8	64.96	23	Human immunodeficiency virus type 1 Human
42	A	F	Y	A	T	G	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	9	64.94	15	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 patient I
43	L	V	Y	P	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	10	64.84	21	Murine adenovirus type 1 Mouse adenovirus type 1 E3
44	T	I	Y	H	T	L	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	11	64.67	25	Bacteriophage A511 Bacteriophage A511 orf1, orf2, cps.
45	R	D	F	S	T	F	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	12	64.20	13	unidentified entomopoxvirus Amsacta entomopoxvirus
46	I	L	F	L	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	3	13	64.17	31	Newcastle disease virus Newcastle disease virus HN
47	G	A	A	G	T	N	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	14	64.04	21	Nudaurelia capensis omega virus capsid protein
48	R	R	A	L	T	T	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	15	63.50	16	Human rotavirus Human rotavirus mRNA for VP6
49	L	M	F	V	T	V	A	R	I	-NH <sub>2</sub>	6	16	63.50	25	Cercopithecine herpesvirus 9 Cercopithecine herpesvirus
50	I	M	D	L	T	D	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	17	63.43	22	gallid herpesvirus 1 Gallid herpesvirus 1 genes for
51	T	G	L	K	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	18	63.42	18	Pseudomonas aeruginosa phage phi CTX Pseudomonas
52	I	E	H	G	T	T	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	19	63.25	18	Dengue virus type 1 Dengue virus type 1 clone
53	F	V	I	L	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	20	63.18	19	African swine fever virus African swine fever virus.
54	P	Q	Y	S	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	21	63.16	10	Macaca mulatta rhadinovirus 17577 Macaca mulatta
55	I	V	S	T	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	22	63.12	18	tomato ringspot virus Tomato ringspot virus isolate
56	T	K	A	A	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	23	63.04	14	Paramecium bursaria Chlorella virus 1 Paramecium
57	I	P	P	H	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	24	62.94	14	salmonid herpesvirus 1 Salmonid herpesvirus 1 DNA
58	V	G	F	A	T	V	A	L	I	-NH <sub>2</sub>	6	25	62.93	16	human herpesvirus 5 Human cytomegalovirus DNA for UL33
59	Q	E	F	I	T	V	A	A	I	-NH <sub>2</sub>	6	26	62.81	10	Bacteriophage RB70 Bacteriophage RB70 DNA for DenV and
60	G	Y	M	G	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	27	62.80	16	Bacteriophage lambda Bacteriophage lambda, complete
61	S	V	S	L	T	I	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	28	62.73	22	Influenza A virus Influenza virus type A genomic RNA
62	D	R	T	V	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	29	62.68	14	Turnip yellow mosaic virus Turnip yellow mosaic virus
63	T	G	H	G	T	T	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	30	62.63	16	Dengue virus type 1 Dengue virus type 1 isolate
64	K	I	L	A	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	31	62.49	23	Simian parainfluenza virus 41 P protein (RNA edited)
65	S	P	Y	G	T	H	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4	32	62.46	17	Citrus tristeza virus Citrus tristeza virus p346.
66	Q	A	S	G	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	33	62.45	18	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 isolate
67	S	C	F	V	T	V	A	R	I	-NH <sub>2</sub>	5	34	62.37	17	Simian foamy virus Simian foamy virus env gene.
68	S	T	G	I	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	35	62.36	18	Pelargonium leaf curl virus putative RNA polymerase.
69	G	G	A	Y	T	H	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	36	62.24	14	human calicivirus Human enteric calicivirus (Manchester
70	S	V	S	I	T	I	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	37	62.19	22	influenza A virus (A/Quail/Hong Kong/G1/97 (H9N2))
71	T	A	G	A	T	P	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	38	62.18	16	Potato virus X Potato virus X coat protein gene. DY
72	S	P	Y	D	T	L	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4	39	62.17	20	Raccoonpox virus Raccoon poxvirus hemagglutinin gene.
73	S	L	F	N	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	2	40	62.17	31	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 RNA p17-p24
74	K	S	Y	F	T	N	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	41	62.15	13	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 isolate
75	L	G	T	M	T	I	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	42	62.12	17	O1 coliphage T4 Coliphage T4, complete genome, 7/1999
76	T	E	H	G	T	I	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	43	62.08	18	Dengue virus type 1 Sequence 1 from Patent WO9322440.
77	N	L	A	L	T	E	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	44	62.07	24	beet soil-borne virus Beet soil-borne virus genes for
78	D	Q	S	F	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	45	62.06	14	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus Kaposi's
79	S	V	T	L	T	I	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	46	62.05	21	Influenza A virus H3N2 Influenza A virus H3N2
80	Q	L	L	S	T	L	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	47	62.02	28	Mumps virus Mumps virus genomic RNA for fusion
81	S	S	G	S	T	T	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	48	62.00	16	bacteriophage #D Bacteriophage #D gene for
82	G	I	T	A	T	L	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	49	61.99	24	Plutella xylostella granulovirus Plutella xylostella
83	S	L	F	N	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	1	49	61.91	31	Human immunodeficiency virus type 1 Human
84	Q	I	T	N	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	62	61.11	19	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 isolate DH12
85	S	L	F	N	T	V	A	T	T	-NH <sub>2</sub>	2	67	60.84	25	Human immunodeficiency virus type 1 Human
86	S	L	F	N	T	I	A	I	I	-NH <sub>2</sub>	4	72	60.59	27	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 strain C14
87	K	A	L	G	T	G	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	73	60.54	21	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 isolate
88	T	L	N	C	T	N	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	75	60.42	23	Human immunodeficiency virus type 1 Human
89	S	L	F	N	T	V	A	T	H	-NH <sub>2</sub>	2	78	60.24	21	Human immunodeficiency virus type 1 Human
90	L	V	G	P	T	P	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	85	60.07	20	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 patient 7
91	T	M	N	C	T	N	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	87	60.02	21	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 strain C21
92	T	L	N	C	T	D	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	88	60.00	23	Human immunodeficiency virus type 1
93	S	L	F	N	T	V	A	T	V	-NH <sub>2</sub>	2	89	59.90	31	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 isolate
94	S	K	N	A	T	N	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	90	59.90	15	Human immunodeficiency virus type 1 Human
95	V	L	F	A	T	G	A	I	I	-NH <sub>2</sub>	6	95	59.76	22	Human immunodeficiency virus type 1 Human
96	S	L	F	N	T	V	A	T	P	-NH <sub>2</sub>	2	100	59.52	21	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 isolate CP9
97	S	L	F	N	T	A	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	2	101	59.43	27	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 clone
98	S	L	Y	S	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	1	104	59.37	31	Human immunodeficiency virus type 1 HIV-1 RNA p17
99	A	L	F	T	T	R	A	I	I	-NH <sub>2</sub>	6	110	59.25	23	Human immunodeficiency virus type 1 Human
100	S	L	Y	Y	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	1	111	59.22	30	Human immunodeficiency virus type 1 Human



Actividad de compuestos individuales en el clon original:

Los péptidos cuya secuencia fue derivada de las mezclas más activas, fueron ensayados en primer lugar sobre el clon 161jXA14, el mismo usado para el tamizado de la biblioteca. Los péptidos fueron ordenados por su actividad y agrupados de acuerdo a su actividad citotóxica con respecto a SL9 (Tabla 4). Se eligieron arbitrariamente intervalos de un logaritmo: 0.02nM a 0.22nM, el rango al que pertenece SL9-1X; 0.23nM a 2.2nM, SL9-10X; 2.3nM a 22nM, SL9-100X; 23nM a 222nM, SL9-1000X , etc. De los 32 péptidos, 11 (#21, #13, #11, #19, #15, #7, #31, #5, #29, #9 y #3)

**Tabla 4.**  
**Actividad citotóxica de péptidos individuales con el clon 161jXA14**

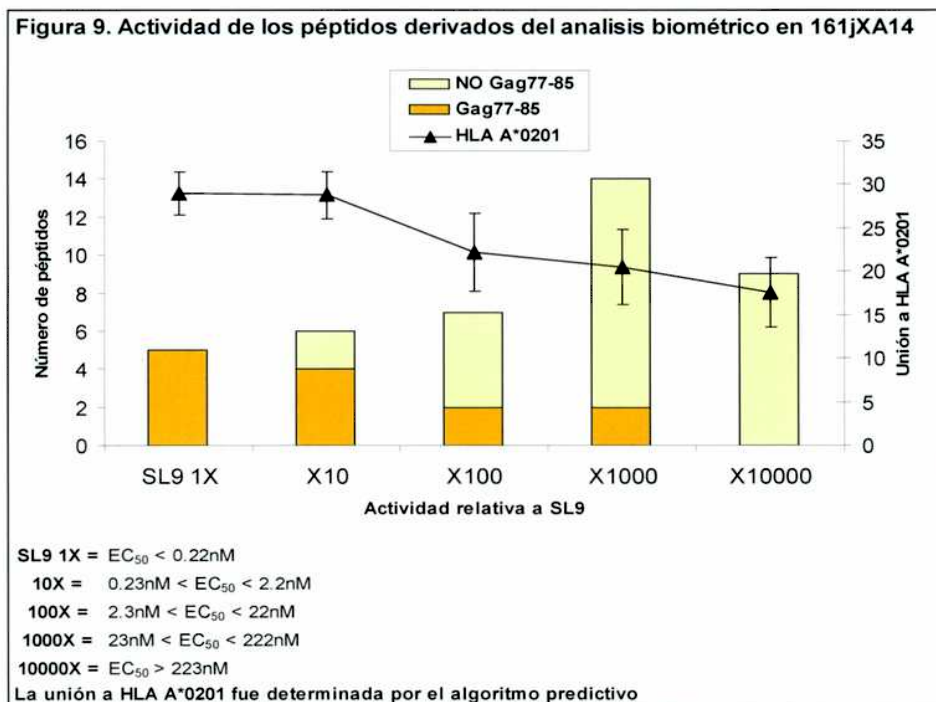
Pep										#subs	EC <sub>50</sub>	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		nM	
33	S	L	Y	N	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	0	0.111
21	S	M	F	S	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4	0.010
13	F	M	Y	S	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4	0.030
11	F	M	Y	I	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	0.039
15	F	M	Y	S	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	0.054
19	S	M	F	I	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	0.056
7	F	M	F	S	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	0.063
31	S	M	Y	S	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4	0.067
5	F	M	F	S	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	0.070
29	S	M	Y	S	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	3	0.101
9	F	M	Y	I	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4	0.156
3	F	M	F	I	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	0.221
25	S	M	Y	I	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	3	0.268
17	S	M	F	I	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4	0.415
6	F	M	F	S	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	5	1.218
22	S	M	F	S	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	4	1.261
14	F	M	Y	S	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	4	3
23	S	M	F	S	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	3
8	F	M	F	S	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	6	4
18	S	M	F	I	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	4	5
30	S	M	Y	S	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	3	5
16	F	M	Y	S	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	5	5
12	F	M	Y	I	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	5	6
32	S	M	Y	S	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	4	8
20	S	M	F	I	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	5	11
1	F	M	F	I	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	12
28	S	M	Y	I	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	4	13
27	S	M	Y	I	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4	17
4	F	M	F	I	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	6	17
10	F	M	Y	I	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	4	18
24	S	M	F	S	T	A	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	5	24
2	F	M	F	I	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	5	30
26	S	M	Y	I	T	V	A	T	S	-NH <sub>2</sub>	3	>100

SL9 1X = EC<sub>50</sub> < 0.22nM  
 10X = 0.23nM < EC<sub>50</sub> < 2.2nM  
 100X = 2.3nM < EC<sub>50</sub> < 22nM  
 EC<sub>50</sub> > 22.3nM

demonstraron poseer actividad (EC<sub>50</sub>) en el rango SL9-1X. Todos estos péptidos presentan entre 3 y 6 sustituciones con respecto al péptido natural (SL9) y tienen I en la posición 9. El cambio I→S en la posición 9 de anclaje, confirma la predicción de la biblioteca donde la mezcla con I9 definida (XXXXXXXXXI)

produjo más actividad que la mezcla con **S9** definida (XXXXXXXXXS). Por ejemplo, el péptido #21 sólo difiere en la posición 9 con el péptido #22(9I→S), pero es suficiente para aumentar la EC<sub>50</sub> de 0.01nM a 1.2 nM. Este fenómeno se observa en todos los péptidos de esta colección que tienen I en la posición 9. La naturaleza hidrofóbica de I, concuerda con el perfil requerido para el aminoácido presente en esta posición de anclaje del péptido.

Los 67 péptidos individuales derivados del análisis biométrico fueron ensayados en el clon 161jXA14 (Tabla 5.). Los péptidos fueron agrupados de acuerdo a su actividad citotóxica con respecto a SL9, en intervalos de un logaritmo de la misma manera que fue descrito en el párrafo anterior (Figura 9.). Los cinco péptidos del grupo SL9-1X poseen secuencias derivadas de Gag p17<sub>77-85</sub> HIV-1. Similarmente, en el grupo SL9-10X, 4 de 6 péptidos pertenecen a Gag p17<sub>77-85</sub>. Estos 9 péptidos contienen entre 1-3 sustituciones con respecto a SL9. Las sustituciones fueron de carácter conservador o semi-conservador con respecto a SL9 en las posiciones 3 (F→Y), 6 (V→A, V→I) y 9 (L→I, L→V); en cambio las sustituciones encontradas en la posición 4 son consideradas semi (N→S), o no conservadoras (N→Y)<sup>20</sup>. Nuevamente, los aminoácidos en la posición de anclaje juegan un rol trascendental, los péptidos #85, #89 y #96



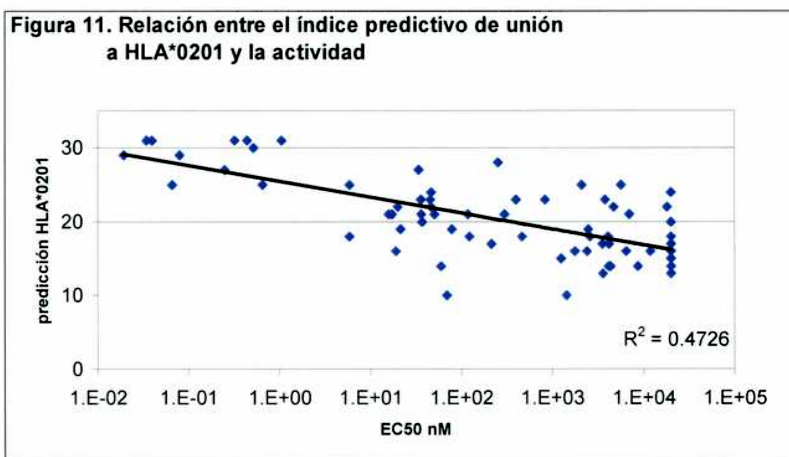
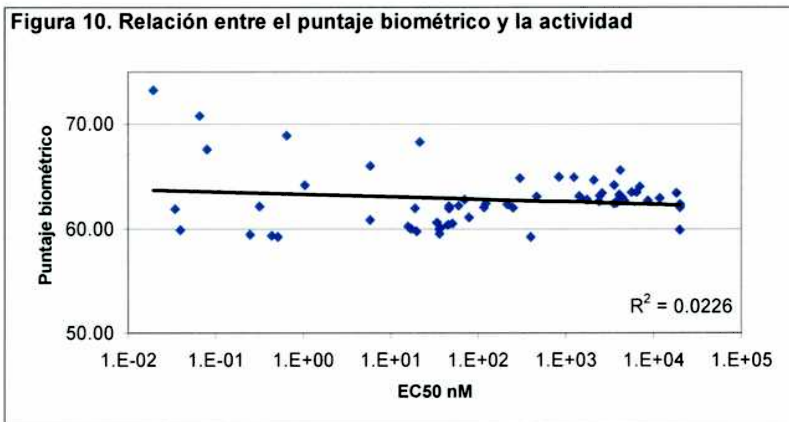


pierden parte de su actividad al modificarse el aminoácido de la posición 9 (comparar con péptido #83), aunque estas sustituciones son consideradas semi-conservadoras (Tabla 5).

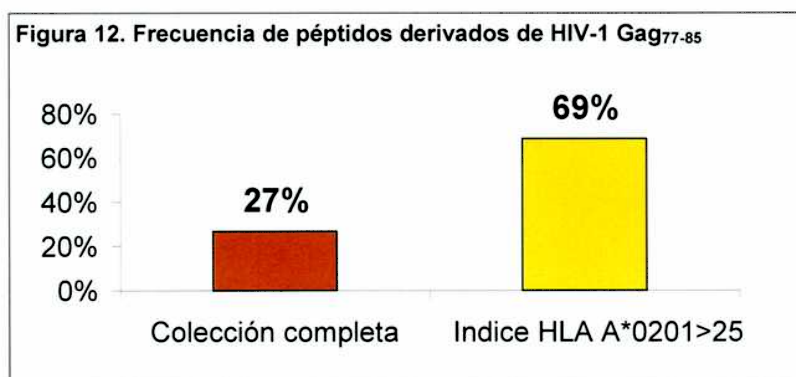
La reactividad cruzada del TCR fue confirmada por el reconocimiento específico de 5 péptidos derivados de virus heterólogos que estimularon con  $EC_{50}$ s menores a 25nM el clon 161jXA14. En el grupo SL9 10X, dos péptidos, derivados de (#36) Pestivirus de tipo 1 y (#46) virus de Newcastle fueron capaces de estimular el clon 161jXA14 con  $EC_{50}$ s menores a 1nM. Con menor actividad, los péptidos derivados de (#39) Citomegalovirus humano (CMV), (#37) Calicivirus felino, y (#81) bacteriófago #D se ubicaron en el grupo SL9 100X (Tabla 5). Es la primera vez que se encuentra reactividad cruzada entre un clon CTL específico para HIV-1 y secuencias peptídicas de virus heterólogos.

Tabla 5. Actividad de los péptidos derivados del análisis biométrico con el clon 161jXA14															
Pept.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	#subs	EC <sub>50</sub>	Puntaje	Unión a	Especie de origen	
											nM	Biom	HLA*0201		
33	S	L	Y	N	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	0	0.111	59.11	31	HIV-1 ARN región gag p17
34	S	L	F	N	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	2	0.019	73.26	29	HIV-1 ARN región gag p17
83	S	L	F	N	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	1	0.034	61.91	31	HIV-1 región gag p17
93	S	L	F	N	T	V	A	T	V	-NH <sub>2</sub>	2	0.040	59.90	31	HIV-1 región gag p17
35	S	L	F	N	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	3	0.066	70.78	25	HIV-1 ARN región gag p17
38	S	L	Y	N	T	I	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	2	0.079	67.59	29	HIV-1 región gag p17
97	S	L	F	N	T	A	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	2	0.249	59.43	27	HIV-1 clon región gag p17
73	S	L	F	S	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	2	0.320	62.17	31	HIV-1 ARN región gag p17
98	S	L	Y	S	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	1	0.439	59.37	31	HIV-1 ARN región gag p17
100	S	L	Y	Y	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	1	0.517	59.22	30	HIV-1 región gag p17
36	L	L	Y	M	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4	0.648	68.92	25	<b>Pestivirus tipo 1 no-citopático</b>
46	I	L	F	L	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	3	1.049	64.17	31	<b>Virus de la enf. de Newcastle HN</b>
39	V	V	F	Q	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	6	66.02	18	<b>CMV humano cepa AD169</b>
85	S	L	F	N	T	V	A	T	T	-NH <sub>2</sub>	2	6	60.84	25	HIV-1 región gag p17
89	S	L	F	N	T	V	A	T	H	-NH <sub>2</sub>	2	16	60.24	21	HIV-1 región gag p17
91	T	M	N	N	T	N	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	17	60.02	21	HIV-1 región env gp160
81	S	S	G	S	T	T	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	19	62.00	16	<b>Bacteriófago #D</b>
95	V	L	F	A	T	G	A	I	I	-NH <sub>2</sub>	6	20	59.76	22	HIV-1 región env gp160
37	T	A	F	I	T	T	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	21	68.30	19	<b>Calicivirus Felino aislamiento V66/97</b>
96	S	L	F	N	T	V	A	T	P	-NH <sub>2</sub>	2	36	59.52	21	HIV-1 región gag p17
<b>SL9 1X = <math>EC_{50} &lt; 0.22nM</math></b>															
<b>10X = <math>0.23nM &lt; EC_{50} &lt; 2.2nM</math></b>															
<b>100X = <math>2.3nM &lt; EC_{50} &lt; 22nM</math></b>															
<b><math>EC_{50} &gt; 23nM</math></b>															

Basándose en la distribución de puntaje (Figura 8) y en el hecho que sólo una proporción infinitesimal de los péptidos con puntaje mayor a 48 fueron sintetizados y ensayados (68 péptidos de 10,000), no es sorprendente que la actividad no correlaciona estrictamente con el puntaje biométrico (Figura 10). En



cambio, como era de esperar, la mayoría de los péptidos activos poseen un mayor índice de pegado al HLA-A\*0201 que los no activos (Tabla 5 y Figuras 9 y 11). El uso del algoritmo de predicción de unión a HLA-A\*0201 por lo tanto sirvió para incrementar la probabilidad de encontrar péptidos de alta actividad. Además, el 69% los péptidos con índice de unión a HLA-A\*0201 mayor a 25 pertenecían a HIV-1 Gag<sub>77-85</sub>, en cambio sólo el 27% de la colección completa (Figura 12).



### Reactividad de péptidos en diferentes clones específicos para Gag<sub>77-85</sub>:

Para evaluar el nivel de reactividad cruzada de los nonámeros, se utilizaron tres clones de CTLs CD8<sup>+</sup> (115iB12, 115iB10 y 115iB19) aislados de otro paciente HIV-1<sup>+</sup> con la misma especificidad por 161jXA14 por HIV-1 Gag<sub>77-85</sub> SL9 (EC<sub>50</sub>s: 0.11 - 2.5nM). La actividad citotóxica (EC<sub>50</sub>) de todos los péptidos generados de acuerdo a los dos criterios de deconvolución fue determinada para cada uno de los clones.

En primer lugar se estudiaron los péptidos derivados de las mezclas con mayor actividad. La reactividad cruzada fue muy limitada, tan sólo 4 péptidos (#21, #30, #29 y #11) de los 32 péptidos mostraron EC<sub>50</sub>s mayor a 2µM, en los clones 115iB10 y 115B12, sin embargo ninguno indujo lisis específica para el clon 115iB19 a 20µM (Tabla 6). El péptido más activo en 161jXA14, #21, también fue el más efectivo para inducir citotoxicidad en los clones 115iB10 y 115iB12; aunque 10 y 1000 veces menor a SL9.

péptido #	P1 P2 P3 P4 P5 P6 P7 P8 P9	sust. #	Unión a HLA*0201	EC <sub>50</sub> nM				
				161jxA14	115iB10	115iB12	115iB19	
21	S M F S T V A T I -NH <sub>2</sub>	4	27	0.002-0.02	20-200	20-200	>20000	
30	S M Y S T V A T S -NH <sub>2</sub>	3	19	2-20	200-2000	200-2000	>20000	
29	S M Y S T V A T I -NH <sub>2</sub>	3	27	0.02-0.2	2000	2000	>20000	
11	F M Y I T A A T I -NH <sub>2</sub>	5	22	0.02-0.2	2000	2000	>20000	
SL9	S L Y N T V A T L -NH <sub>2</sub>	0	31	0.02-0.2	2-20	0.2-2	0.2-2	

Con el fin de poder comparar la inmunogenicidad de los diferentes péptidos en presencia de diferentes clones en relación con SL9, la actividad de cada péptido se expresó como un cociente entre la EC<sub>50</sub> de cada péptido y la de SL9 en ese clon específico. Así, cocientes menores a uno corresponden a péptidos más activos que SL9 y cocientes mayores a uno, a péptidos menos activos. En la colección derivada del análisis biométrico, de los 11 péptidos con alta actividad (EC<sub>50</sub> péptido/EC<sub>50</sub>[SL9]<10) en 161jXA14, 4 nonapéptidos fueron reconocidos por 2 y hasta 3 de los otros clones en el rango SL9 10X (Tabla 7). Todos los péptidos con reactividad cruzada tienen índices predictivos de unión a HLA-A\*0201 mayor a 29. El péptido #38 con dos sustituciones de SL9 (6V→I y



Pept.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	#subs	*EC <sub>50</sub> péptido/EC <sub>50</sub> (SL9)				Puntaje Biom	Unión a HLA*0201	Especie de origen	
											161jXA14	115iB12	115iB10	115iB19				
											33	S	L	Y				N
34	S	L	F	N	T	V	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	2	0.17	0.43	57	25	73.26	29	HIV-1 ARN región gag p17
83	S	L	F	N	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	1	0.31	8.16	7.19	>56000	61.91	31	HIV-1 región gag p17
93	S	L	F	N	T	V	A	T	V	-NH <sub>2</sub>	2	0.36	36	108	97	59.90	31	HIV-1 región gag p17
35	S	L	F	N	T	A	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	3	0.59	>450	>100000	>56000	70.78	25	HIV-1 ARN región gag p17
38	S	L	Y	N	T	I	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	2	0.72	0.32	0.24	0.18	67.59	29	HIV-1 región gag p17
97	S	L	F	N	T	A	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	2	2.2	>450	>100000	>56000	59.43	27	HIV-1 clon región gag p17
73	S	L	F	S	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	2	2.9	>450	>100000	>56000	62.17	31	HIV-1 ARN región gag p17
98	S	L	Y	S	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	1	4.0	>450	>100000	>56000	59.37	31	HIV-1 ARN región gag p17
100	S	L	Y	Y	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	1	4.7	0.52	34	14	59.22	30	HIV-1 región gag p17
36	L	L	Y	M	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	4	5.8	>450	>100000	>56000	68.92	25	<b>Pestivirus tipo 1 no-citopático</b>
46	I	L	F	L	T	V	A	T	L	-NH <sub>2</sub>	3	9.5	>450	1103	635	64.17	31	<b>Virus de la enf. de Newcastle HN</b>
39	V	V	F	Q	T	S	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	53	>450	932	>56000	66.02	18	<b>CMV humano cepa AD169</b>
85	S	L	F	N	T	V	A	T	T	-NH <sub>2</sub>	2	53	>450	932	>56000	60.84	25	HIV-1 región gag p17
89	S	L	F	N	T	V	A	T	H	-NH <sub>2</sub>	2	142	>450	17871	>56000	60.24	21	HIV-1 región gag p17
91	T	M	N	N	T	N	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	155	>450	>100000	>56000	60.02	21	HIV-1 región env gp160
81	S	S	G	S	T	T	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	5	172	>450	15000	>56000	62.00	16	<b>Bacteriófago #D</b>
95	V	L	F	A	T	G	A	I	I	-NH <sub>2</sub>	6	179	>450	>100000	>56000	59.76	22	HIV-1 región env gp160
37	T	A	F	I	T	T	A	T	I	-NH <sub>2</sub>	6	194	327	62	3888	68.30	19	<b>Calicivirus Felino aislamiento V66/97</b>
96	S	L	F	N	T	V	A	T	P	-NH <sub>2</sub>	2	328	>450	43644	>56000	59.52	21	HIV-1 región gag p17

SL9 1X = EC<sub>50</sub> péptido/EC<sub>50</sub>(SL9) menor a 2

SL9 10X = EC<sub>50</sub> péptido/EC<sub>50</sub>(SL9) entre 2.1 y 20

SL9 100X = EC<sub>50</sub> péptido/EC<sub>50</sub>(SL9) entre 20.1 y 200

\*Datos expresados en relación a la actividad de SL9 para cada uno de los clones

9L→I) produjo EC<sub>50</sub> inferiores a las inducidas por SL9 en todos los clones. Cabe notar, que las dos mezclas correspondientes a I en estas dos posiciones mostraron actividad en el tamizado del clon 161jXA14. En la posición 6, I no fue elegida para la síntesis de compuestos por estar ubicada en el cuarto lugar de acuerdo a su actividad. La sustitución SL9 3Y→F, afecta considerablemente la actividad del clon 115iB19 (#83) y es considerada de anclaje secundario a HLA-A\*0201. Y y F difieren solamente en un grupo OH, este cambio de polaridad afecta el reconocimiento de ciertos TCR, cuyo efecto negativo parece compensarse al menos parcialmente al introducir I o V en la posición 9 (#34 y #93). Igual que para el clon 161jXA14, los aminoácidos en la posición de anclaje afectan la actividad (comparar #85, #89 y #96 que pierden actividad al modificarse el aminoácido de la posición 9, con respecto al péptido #83). La actividad del péptido #100 (SL9 4N→Y), no afectó dramáticamente la actividad en ninguno de los clones con respecto a SL9, a pesar de la drástica diferencia entre estos dos aminoácidos. Más adelante, se comprobará que este reemplazo, 4N→Y, tiene efectos diferentes en diferentes familias de péptidos, confirmando que estudios basados en mutaciones puntuales resultan más limitados que los

que utilizan bibliotecas combinatorias. En cambio la reactividad del péptido #98 (SL9 4N→S) se vio afectada por este cambio. Ambos aminoácidos S y Y poseen grupos -OH, pero S es un residuo más pequeño que N y Y, denotando la probable importancia del tamaño del aminoácido que participa en la sustitución.

Optimización de péptidos para favorecer reactividad cruzada:

Basado en los resultados de reactividad cruzada de los péptidos derivados del análisis biométrico, con el objeto de encontrar péptidos heteroclíticos capaces de estimular diferentes clones específicos para SL9, se generó un nuevo esquema deconvolutivo (Tabla 8). Para cada posición se seleccionaron aminoácidos presentes en esa posición en péptidos activos en por lo menos dos clones. De esta manera, se estudiarán todas las combinaciones posibles de aminoácidos que resultaron activos. V para la posición 9 no fue seleccionado por su alta similitud con I y L, reduciendo así a la mitad los péptidos a sintetizar. Todos los péptidos de este nuevo grupo poseen índices de pegado a HLA-A\*0201 mayor a 28.

**Tabla 8. Aminoácidos seleccionados para cada posición**

P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
S	L	F	N	T	V	A	T	L
		Y	Y		I			I
1	X 1	X 2	X 2	X 1	X 1	X 1	X 2	X 2
<b>=16</b>								

Cinco de los péptidos de este nuevo esquema deconvolutivo ya se encontraban sintetizados en el grupo de péptidos derivados del análisis biométrico. Los nuevos péptidos fueron numerados de 1 al 11 de la serie 1503. Todos los péptidos con N en la posición 4 fueron capaces de inducir actividad citolítica mejor que SL9 en por lo menos dos clones. La sustitución 4N→Y es claramente deletérea para la actividad de los clones 115iB10 y 115iB12. Sin embargo, en los péptidos 1503-4 y 1503-10 pudo ser compensada cuando se incluyó I y L en la posición 6. Por el contrario, estos péptidos resultaron ser

menos activos para el clon 161jXA14 por más de un logaritmo (Tabla 9). El reconocimiento promiscuo de diferentes mezclas condice con los resultados del tamizado del clon 161jXA14 para la posición 4 (Figura 7), denotando una mayor tolerancia a sustituciones específicamente para este clon. De esta manera, se identificaron un grupo de nuevos péptidos de alta especificad capaces de ser reconocidos en complejo con la molécula de MHC por diferentes clones específicos para HIV-1 Gag<sub>77-85</sub>.

Péptido #		# subst.	*EC <sub>50</sub> péptido/EC <sub>50</sub> [SL9]			HLA-A2
			161jXA14	115iB12	115iB10	
33	S L Y N T V A T L	0	1	1	1	31
1503-9	S L F Y T V A T I	3	0.09	>1600	>2000	28
83	S L F N T V A T L	1	0.27	8.0	8.7	31
1503-1	S L Y N T V A T I	1	0.33	0.28	1.3	29
34	S L F N T V A T I	2	0.39	0.43	47	29
1503-5	S L Y Y T I A T I	3	0.62	700	>2000	28
1503-7	S L F N T I A T I	3	0.65	1.76	1.75	29
1503-11	S L F Y T I A T I	4	0.69	>1600	>2000	28
1503-8	S L F Y T V A T L	2	0.80	640	875	30
38	S L Y N T I A T I	2	0.97	0.33	0.26	29
1503-3	S L Y Y T V A T I	2	3.3	>1600	>2000	28
100	S L Y Y T V A T L	1	5.5	0.55	34	30
1503-10	S L F Y T I A T L	3	17	51	39	30
1503-6	S L F N T I A T L	2	22	0.55	0.76	31
1503-4	S L Y Y T I A T L	2	84	10	13	30
1503-2	S L Y N T I A T L	1	250	0.30	0.05	31
SL9 1X = EC <sub>50</sub> péptido/EC <sub>50</sub> [SL9] menor a 2						
SL9 10X = EC <sub>50</sub> péptido/EC <sub>50</sub> [SL9] entre 2.1 y 20						
SL9 100X = EC <sub>50</sub> péptido/EC <sub>50</sub> [SL9] entre 20.1 y 200						
*Datos expresados en relación a la actividad de SL9 para cada uno de los clones						

## Discusión y conclusiones:

La identificación de nuevos péptidos de alta reactividad y especificidad para CTLs es de capital importancia para el desarrollo de vacunas, tratamiento y prevención de infecciones virales crónicas. Péptidos de entre 8 y 11 aminoácidos, embebidos en la superficie del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase 1 (MHC-I) son reconocidos específicamente por CTLs, disparando diferentes mecanismos celulares que inducen la destrucción de las células infectadas. Protocolos de vacunación en animales con péptidos inmunogénicos para CTLs han sido utilizados en diferentes trabajos, demostrando que ciertos péptidos pueden generar una respuesta inmune celular que contribuye al control de la infección viral <sup>42,43</sup>. En este capítulo, con el objetivo de identificar péptidos inmunogénicos, se efectuó la disección de la especificidad del clon de CTLs 161jXA14, específico para HIV-1 Gag<sub>77-85</sub> usando bibliotecas combinatorias peptídicas. Este análisis permitió identificar péptidos naturales y artificiales (no naturales) capaces de inducir actividad citolítica específica para el clon estudiado. Asimismo, algunos de estos compuestos indujeron actividad citolítica en diferentes clones de CTLs también específicos para HIV-1 Gag<sub>77-85</sub>, aislados de otro paciente HIV-1<sup>+</sup>.

En primer lugar se ensayó la reactividad del clon 161jXA14, que reconoce específicamente el nonapéptido derivado de la proteína Gag<sub>77-85</sub> p17 de HIV-1 (SL9), en presencia de una biblioteca de nonapéptidos organizada en formato de barrido posicional. El clon reconoció mezclas con posiciones definidas correspondientes a la secuencia de SL9 en 7 posiciones (1, 2, 3, 5, 6, 7 y 8) (Figura 7). Las posiciones de anclaje 2 y 9 resultaron de acuerdo a las propiedades encontradas en los péptidos naturalmente procesados y eluidos de moléculas de MHC HLA-A\*0201 <sup>40</sup>. Particularmente, para la posición 2, las mezclas con **L** (XLXXXXXXXX) o **M** (MXXXXXXXX) fueron las que generaron mayor actividad y para la posición 9 la mezcla más activa fue **I** (XXXXXXXXXI). La actividad de las mezclas con aminoácidos con carga en las dos posiciones de

anclaje (2 y 9), resultaron significativamente más bajas, confirmando hallazgos anteriores <sup>41</sup>.

Con el objeto de identificar péptidos heteroclíticos, se generó una colección de 32 péptidos derivados de las mezclas más activas del tamizado de la biblioteca de nonapéptidos con el clon 161jXA14 (Tabla 4.). Nueve de ellos reflejaron una actividad citolítica mayor al péptido natural de HIV-1 con sustituciones en hasta seis residuos. La máxima actividad fue inducida por el péptido #21 ( $EC_{50}=0.01nM$ , Tabla 4), diez veces más potente que SL9 ( $EC_{50}=0.11nM$ ). Estos experimentos confirmaron que el TCR de un clon "específico" para un epítopo viral, es capaz de reconocer con alta afinidad, en la superficie de la misma molécula de MHC, un alto número de péptidos con numerosas modificaciones conservadoras y no conservadoras en la secuencia peptídica <sup>19,44,45</sup>. Además, el reconocimiento degenerado del TCR quedó evidenciado al comparar la actividad ( $EC_{50}$ ) del péptido más activo (#21) que es más de 100 veces mayor que la concentración de cada péptido en una mezcla de la biblioteca (52fM), sugiriendo que la actividad detectada al ensayar las mezclas fue disparada por varios péptidos. Este fenómeno también fue observado en deconvoluciones de clones de células T CD4<sup>+</sup><sup>45</sup>. Además, el péptido #21 fue capaz de activar por lo menos dos clones con la misma especificidad para Gag<sub>77-85</sub> aislados de otro paciente, aunque con actividad mucho menor. Este reconocimiento es notable ya que el péptido #21 contiene 4 sustituciones con respecto a SL9. Por lo tanto, estos péptidos contienen secuencias óptimas para ser presentados en HLA\*0201 y ser reconocidos con exquisita precisión por el TCR expresado por el clon 161jXA14 y manteniendo una moderada reactividad frente a otros clones con la misma especificidad.

El análisis biométrico basado en el tamizado del clon 161jXA14, sirvió para identificar varias secuencias derivadas de diferentes virus con significativa actividad citotóxica. Los dos péptidos con mayor puntaje, derivados de bases de datos virales, pertenecen a la región Gag<sub>77-85</sub> del HIV-1 aislado de pacientes HIV<sup>+</sup> y contienen 2 y 3 sustituciones con respecto a SL9. De los 11 péptidos



más activos, nueve fueron derivados de HIV-1 Gag<sub>77-85</sub>. Esto demuestra que un único clon es capaz de reconocer variantes naturales de la secuencia de SL9 presentes en aislamientos clínicos <sup>5</sup>. Esta flexibilidad en el reconocimiento es importante para el control de infecciones de virus con alta variabilidad como HIV-1 <sup>46</sup>. El análisis biométrico también permitió identificar por primera vez péptidos virales heterólogos capaces de estimular una respuesta citolítica en un clon específico para el epítipo de HIV-1 Gag<sub>77-85</sub> SL9. Específicamente, péptidos derivados del Pestivirus de tipo 1, virus de la enfermedad de Newcastle, proteína de cápside de Citomegalovirus humano (HCMV), Calicivirus felino, y bacteriófago (Tabla 5.) lograron estimular el clon 161jXA14 con EC<sub>50</sub><25nM.

Infecciones son un fenómeno frecuente tanto en personas HIV<sup>+</sup> como HIV<sup>-</sup>. Una de las más comunes es HCMV. En Estados Unidos, 82% de una cohorte de pacientes HIV-1<sup>+</sup> con enfermedad avanzada, resultaron seropositivos para HCMV <sup>47</sup>. En otra cohorte de niños HIV-1<sup>+</sup> en África la incidencia fue del 100% <sup>48</sup>. En cambio, la incidencia de HCMV en niños HIV-1 negativos de clase media en Argentina fue del 46% <sup>49</sup>. Sugestivamente, 13 años atrás fue reportada la reactividad cruzada de sueros inmunes de la proteína de cápside de HIV-1 Gag y la proteína mayor de cápside de HCMV, este fenómeno no se encontró en sueros inmunes derivados de CMV de simios o de virus herpes simple-1 humano (HSV-1). El péptido 39, identificado en este trabajo, pertenece a la proteína mayor de la cápside de HCMV, posee 6 substituciones respecto a SL9, fue reconocido aunque débilmente por 3 clones específicos para SL9. Esta secuencia no se encuentra conservada en la familia herpesviridae, en concordancia con los hallazgos de sueros inmunes <sup>50</sup>. Por lo tanto, la reactividad cruzada a nivel de respuesta citotóxica inducida por el péptido #39, correlaciona con la reactividad cruzada humoral de HCMV y HIV-1. Por otra parte, la prevalencia de infecciones con Pestivirus, fue detectada en el 12.3% de los pacientes HIV<sup>+</sup> estudiados en Europa y Zaire, especialmente en pacientes con diarreas crónicas <sup>51</sup>. El virus de la enfermedad de Newcastle es un paramixovirus, que infecta habitualmente aves de corral. En humanos, sólo se

han detectado anticuerpos en personas que trabajan en contacto directo con aves <sup>52</sup>. Además, 20% de los gatos domésticos tienen anticuerpos específicos para FCV <sup>53</sup>. Estas observaciones, evidencian la alta probabilidad de exposición a estos agentes infecciosos antes o durante la infección por HIV-1. Así, la respuesta inmune celular dirigida contra el epítipo HIV-1 Gag<sub>77-85</sub> podría verse afectada por infecciones previas o simultáneas con otros agentes virales. La reactividad cruzada entre los péptidos derivados de diferentes virus no pudo ser reproducida con similar actividad en otros clones con la misma especificidad, demostrando una preferencia clonotípica. Existen aún muchas preguntas a responder sobre estos péptidos para comprender su relevancia fisiológica. ¿Son procesados y presentados en el correspondiente MHC? ¿Existe una mayor frecuencia de células T de memoria que reconocen a SL9 en pacientes HIV-1<sup>+</sup> CMV<sup>+</sup> comparados con HIV-1<sup>+</sup> CMV<sup>-</sup>? ¿Son capaces de reconocer a SL9, CTLs generadas *in vivo* o *in vitro* inmunizando con péptidos homólogos?

Tanto la actividad como la reactividad cruzada (inter-clon), de los péptidos derivados del análisis biométrico tuvieron una alta correlación con el índice predictivo de unión al HLA\*0201. La inclusión de esta información, disponible a través de Internet, en combinación con el análisis biométrico, incrementará la posibilidad de éxito en estudios de especificidad ulteriores sobre otros clones de CTLs. En el análisis biométrico de un clon CD8<sup>+</sup> específico del antígeno de melanoma, Melan-A, presentado en el marco de HLA-A\*0201, también se demostró una preferencia por péptidos con mayor índice de unión al MHC<sup>44</sup>. Sin embargo, no fue predictivo de la reactividad frente a otros clones de la misma especificidad como fue observado en este trabajo.

La reactividad de los péptidos frente a diferentes clones que reconocen el mismo epítipo natural (HIV-1 Gag<sub>77-85</sub>), es crítica para evaluar la potencial utilidad de los mismos como componentes de una vacuna efectiva. Presumiblemente los nonapéptidos derivados de las mezclas más activas, poseen la conformación óptima para el TCR del clon 161jXA14, pero evidentemente, estos cambios jugaron un rol negativo cuando un diferente TCR

estuvo involucrado en el reconocimiento del complejo péptido-MHC. Similares resultados fueron obtenidos en un estudio realizado en un clon específico para CMV pp65<sub>495-503</sub><sup>54</sup>. Por otra parte, el análisis biométrico permitió identificar 11 péptidos capaces de estimular entre 2 y 3 clones de CTLs específicas para el mismo epítipo. Las secuencias de los péptidos de la serie 1503, diseñados específicamente para generar péptidos heteroclíticos con reactividad cruzada para Gag<sub>77-85</sub>, no son secuencias naturales. Más de la mitad de los péptidos de la colección 1503 tuvieron comportamiento heteroclítico en por lo menos un clon y cuatro de ellos indujeron actividad en el rango SL9 10x en por lo menos dos clones. Todos los péptidos con actividad mayor que SL9 en algún clon y con reactividad cruzada, serán seleccionados para continuar estudios inmunogénicos en ratones transgénicos para el HLA-A\*0201 y en ensayos de estimulación *in vitro* de PBMCs de donadores sanos HLA-A\*0201<sup>+</sup>. Los péptidos con reactividad cruzada poseen una mayor afinidad por el TCR y/o MHC-1 manteniendo el reconocimiento universal por el epítipo Gag<sub>77-85</sub> de HIV-1.

La disección de la especificidad de clones de CTLs HIV-1 Gag<sub>77-85</sub> también sirvió para demostrar que cambios conservativos en residuos de anclaje, cambian la estructura general del complejo péptido-MHC reconocida por el TCR. Los residuos hidrofóbicos en el carboxi terminal y en la posición 2 del péptido son los responsables de la formación de este complejo. Si se considera que cada aminoácido contribuye independientemente a la unión tanto con el MHC como con el TCR, sustituciones conservadoras, no deberían alterar o tener efectos deletéreos en la actividad de un péptido. En los péptidos identificados para Gag<sub>77-85</sub> con sustituciones conservadoras en el residuo de anclaje 9 en SL9 (#38 y 1503-2, #100 y 1503-3), tuvieron efectos negativos en ciertos clones, pero no en otros. Recientemente, fue reportado que cambios conservativos en los residuos de anclaje al HLA\*0201 producen cambios en los residuos de contacto al TCR en un clon de CTLs específico para p53<sup>55</sup>. Por lo tanto las reglas generales para sustituciones deben ser consideradas con suma precaución ya que no se puede considerar a cada aminoácido independientemente de los

otros. Modificaciones conservadoras en los residuos de anclaje pueden alterar la conformación en el centro de la molécula y vice-versa. Sin embargo, fue necesario utilizar criterios de semejanza durante el proceso deconvolutivo de las mezclas más activas, para reducir el número de péptidos en la colección derivada de las mezclas más activas.

Recientemente fue descubierto que péptidos análogos de alta afinidad de un epítope de EBV LMP2<sub>426-434</sub>, aunque incapaces de generar una respuesta específica por sí mismos, sirvieron para aumentar la reactivación de CTL en presencia del epítope natural a una concentración que *per se* no inducía respuesta alguna <sup>56</sup>. Estos análogos, denominados supra-agonistas, fueron capaces de aumentar la activación de la quinasa de tirosinas ZAP-70 inducida por el péptido natural, así permitiendo reducir el umbral de concentración de péptido natural necesario para la activación del clon. Algunos péptidos que resultaron activos en un clon y no en otros (por ejemplo: #13, #15, #1503-9, #1503-5, etc), podrían poseer este tipo de actividad supra- agonista para SL9. En el futuro se harán estudios de fosforilación ZAP-70 y se ensayarán protocolos de vacunación en ratones transgénicos para el HLA-A\*0201 con diferentes combinaciones de péptidos y se comparará la inmunogenicidad del péptido natural *per se* y en conjunto con potenciales péptidos supra-agonistas.

En conclusión, la disección de la especificidad de CTL epítopes con BP-BSC es una herramienta útil para el descubrimiento de péptidos con reactividad cruzada inter e intra clonal. La caracterización de la respuesta policlonal de estos péptidos, como así también la reactividad cruzada de la respuesta inducida, serán de capital importancia confirmar su relevancia como candidatos para una vacuna para HIV-1. También, la identificación de péptidos reactivos provenientes de diferentes especies virales, presenta un nuevo cuadro de especificidad dinámica dentro del pool de células T dirigidas contra HIV-1 Gag<sub>77</sub>.

## Bibliografía

1. **Norley, S. and R. Kurth.** 1996. AIDS vaccination, p. 533-558. *In* S. H. E. Kaufmann (ed.), *Concepts in Vaccine Development*. Walter de Gruyter, New York, NY.
2. **Korber, B. Foley, F. MacCutchan, J. Mellors, B. H. Hahn, J. Sodroski, and C. Kuiken** (eds.), 1998. Reference sequences representing the principal genetic diversity of HIV-1 in the pandemic., p. III-1-III-8. *In* B. Human Retroviruses and AIDS. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico.
3. **Avila, M. M., M. A. Pando, G. Carrion, L. M. Peralta, H. Salomon, M. G. Carrillo, J. Sanchez, S. Maulen, J. Hierholzer, M. Marinello, M. Negrete, K. L. Russell, and J. C. Carr.** 2002. Two HIV-1 epidemics in Argentina: different genetic subtypes associated with different risk groups. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **29**:422-426.
4. **Ready, T.** 2003. AIDS-VAX flop leaves vaccine field unscathed. *Nat. Med* **9**:376.
5. **Cao, H., P. Hanki, J. L. Sankale, A. Dieng-Sarr, G. P. Mazzara, S. A. Kalams, B. Korber, S. Mboup, and B. D. Walker.** 1997. Cytotoxic T-lymphocyte cross-reactivity among different human immunodeficiency virus type 1 clades: Implications for vaccine development. *J. Virol.* **71**:8615-8623.
6. **Brander, C. and B. D. Walker.** 1999. T lymphocyte responses in HIV-1 infection: Implications for vaccine development. *Curr. Opin. Immunol.* **11**:451-459.
7. **Rowland-Jones, S. L., T. Dong, K. R. Fowke, J. Kimani, P. Krausa, H. Newell, T. Blanchard, K. Ariyoshi, J. Oyugi, E. Ngugi, J. Bwayo, K. S. MacDonald, A. J. McMichael, and F. A. Plummer.** 1998. Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi. *J. Clin. Invest.* **102**:1758-1765.
8. **Klein, M. R., C. A. van Baalen, A. M. Holwerda, S. R. Kerhof Garde, R. J. Bende, I. P. M. Keet, J. K. M. Eeftink-Schattenkerk, A. D. Osterhaus, H. Schuitemaker, and F. Miedema.** 1995. Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during clinical course of HIV-1 infection: A longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *J. Exp. Med.* **181**:1365-1372.
9. **Carmichel, A., X. Jin, P. Sissons, and L. Borysiewicz.** 1993. Quantitative analysis of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response at different stages of HIV-1 infection: Differential CTL responses to HIV-1 and Epstein-Barr Virus in late disease. *J. Exp. Med.* **177**:249-256.
10. **Borrow, P., H. Lewicki, X. Wei, M. S. Horwitz, N. Pfeffer, H. Meyers, J. A. Nelson, J. E. Gairin, B. H. Hahn, M. B. A. Oldstone, and G. M. Shaw.** 1997. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nature Med.* **3**:205-211.
11. **Brodie, S. J., D. A. Lewinsohn, B. K. Patterson, D. Jiyamapa, J. Krieger, L. Corey, P. D. Greenberg, and S. R. Riddell.** 1999. In vivo migration and function of transferred HIV-1-specific cytotoxic T cells. *Nature Med.* **5**:34-41.
12. **Kalams, S. A. and B. D. Walker.** 1998. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* **199**:2199-2204.
13. **Harrer, T., E. Harrer, S. A. Kalams, T. Elbeik, S. I. Staprans, M. B. Feinberg, Y. Cao, D. D. Ho, T. Yilma, A. M. Caliendo, R. P. Johnson, S. P. Buchbinder, and B. D. Walker.**

1996. Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **12**:585-592.
14. **Collins, K. L., B. K. Chen, S. A. Kalams, B. D. Walker, and D. Baltimore.** 1998. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* **391**:397-401.
  15. **Weissman, J. D., J. A. Brown, T. K. Howcroft, J. Hwang, A. Chawla, P. A. Roche, L. Schiltz, Y. Nakatani, and D. S. Singer.** 1998. HIV-1 tat binds TAFII250 and represses TAFII250-dependent transcription of major histocompatibility class I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:11601-11606.
  16. **Uchiyama, J., S. Kishi, H. Yagita, S. Matsuzaki, and Y. Koga.** 1997. Fas ligand-mediated depletion of CD4 and CD8 lymphocytes by monomeric HIV-1-gp120. *Arch. Virol.* **142**:1771-1785.
  17. **Kitchen, S. G., Y. D. Korin, M. D. Roth, A. Landay, and J. A. Zack.** 1998. Costimulation of naive CD8(+) lymphocytes induces CD4 expression and allows human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **72**:9054-9060.
  18. **Herbein, G., U. Mahlknecht, F. Batliwalla, P. Gregersen, T. Pappas, J. Butler, W. A. O'Brien, and E. Verdin.** 1998. Apoptosis of CD8+ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4. *Nature* **395**:189-194.
  19. **Boesteanu, A., M. Brehm, L. M. Mylin, G. J. Christianson, S. S. Tevethia, D. C. Roopenian, and S. Joyce.** 1998. A molecular basis for how a single TCR interfaces multiple ligands. *J. Immunol.* **161**:4719-4727.
  20. **Tangri, S., G. Y. Ishioka, X. Huang, J. Sidney, S. Southwood, J. Fikes, and A. Sette.** 2001. Structural features of peptide analogs of human histocompatibility leukocyte antigen class I epitopes that are more potent and immunogenic than wild-type peptide. *J. Exp. Med.* **194**:833-846.
  21. **Franco, A., D. A. Tilly, I. Gramaglia, M. Croft, L. Cipolla, M. Meldal, and H. M. Grey.** 2000. Epitope affinity for MHC class I determines helper requirement for CTL priming. *Nat. Immunol* **1**:145-150.
  22. **Hu, Q., C. R. Bazemore Walker, C. Girao, J. T. Opferman, J. Sun, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, and P. G. Ashton-Rickardt.** 1997. Specific recognition of thymic self-peptides induces the positive selection of cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* **7**:221-231.
  23. **Hogquist, K. A., A. J. Tomlinson, W. C. Kieper, M. A. McGargill, M. C. Hart, S. Naylor, and S. C. Jameson.** 1997. Identification of a naturally occurring ligand for thymic positive selection. *Immunity* **7**:389-399.
  24. **Sloan-Lancaster, J., B. D. Evavold, and P. M. Allen.** 1993. Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature* **363**:156-159.
  25. **Klenerman, P., S. Rowland-Jones, S. McAdam, J. Edwards, S. Daenke, D. Laloo, B. Koppe, W. Rosenberg, D. Boyd, A. Edwards, and .** 1994. Cytotoxic T-cell activity antagonized by naturally occurring HIV-1 Gag variants. *Nature* **369**:403-407.

26. **Bertoletti, A., A. Sette, F. V. Chisari, A. Penna, M. Levrero, M. De Carli, F. Fiaccadori, and C. Ferrari.** 1994. Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. *Nature* **369**:407-410.
27. **di, M., V. D. Arnott, V. Barnaba, D. J. Loftus, K. Sakaguchi, C. B. Thompson, S. Salemi, C. Mastroianni, A. Sette, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, and E. Appella.** 1996. Autoreactive cytotoxic T lymphocytes in human immunodeficiency virus type 1-infected subjects. *J Exp. Med* **183**:2509-2516.
28. **Chen, H. D., A. E. Fraire, I. Joris, M. A. Brehm, R. M. Welsh, and L. K. Selin.** 2001. Memory CD8+ T cells in heterologous antiviral immunity and immunopathology in the lung. *Nat. Immunol* **2**:1067-1076.
29. **Selin, L. K., M. Y. Lin, K. A. Kraemer, D. M. Pardoll, J. P. Schneck, S. M. Varga, P. A. Santolucito, A. K. Pinto, and R. M. Welsh.** 1999. Attrition of T cell memory: selective loss of LCMV epitope-specific memory CD8 T cells following infections with heterologous viruses. *Immunity* **11**:733-742.
30. **Kuwano, K., V. E. Reyes, R. E. Humphreys, and F. A. Ennis.** 1991. Recognition of disparate HA and NS1 peptides by an H-2Kd-restricted, influenza specific CTL clone. *Mol. Immunol.* **28**:1-7.
31. **Selin, L. K., S. R. Nahill, and R. M. Welsh.** 1994. Cross-reactivities in memory cytotoxic T lymphocyte recognition of heterologous viruses. *J Exp. Med* **179**:1933-1943.
32. **Brehm, M. A., A. K. Pinto, K. A. Daniels, J. P. Schneck, R. M. Welsh, and L. K. Selin.** 2002. T cell immunodominance and maintenance of memory regulated by unexpectedly cross-reactive pathogens. *Nat. Immunol* **3**:627-634.
33. **Wedemeyer, H., E. Mizukoshi, A. R. Davis, J. R. Bennink, and B. Rehermann.** 2001. Cross-reactivity between Hepatitis C virus and Influenza A virus determinant-specific cytotoxic T cells. *J. Virol.* **75**:11392-11400.
34. **Yang, O. O., S. A. Kalams, M. Rosenzweig, A. Trocha, N. Jones, M. Koziel, B. D. Walker, and R. P. Johnson.** 1996. Efficient lysis of human immunodeficiency virus type -1 infected cells by cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* **70**:5799-5806.
35. **Goulder, P. J. R., A. K. Sewell, D. G. Laloo, D. A. Price, J. A. Whelan, J. Evans, G. P. Taylor, G. Luzzi, P. Giangrande, R. E. Phillips, and A. J. McMichael.** 1997. Patterns of immunodominance in HIV-1-specific cytotoxic T lymphocyte responses in two human histocompatibility leukocyte antigens (HLA)-identical siblings with HLA-A\*0201 are influenced by epitope mutation. *J. Exp. Med.* **185**:1423-1433.
36. **Brander, C., K. E. Hartman, A. K. Trocha, N. G. Jones, R. P. Johnson, B. Korber, P. Wentworth, S. P. Buchbinder, S. Wolinsky, B. D. Walker, and S. A. Kalams.** 1997. Lack of strong immune selection pressure by the immunodominant, HLA-A\*0201-restricted cytotoxic T lymphocyte response in chronic human immunodeficiency virus-1 infection. *J. Clin. Invest.* **101**:2559-2566.
37. **Riddell, S. R. and P. D. Greenberg.** 1990. The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. *J. Immunol. Meth.* **128**:189-201.
38. **Sipsas, N. V., S. A. Kalams, A. Trocha, S. He, W. A. Blattner, B. D. Walker, and R. P. Johnson.** 1997. Identification of type-specific cytotoxic T lymphocyte responses to

homologous viral proteins in laboratory workers accidentally infected with HIV-1. *J. Clin. Invest.* **99**:752-762.

39. **Pinilla, C., J. R. Appel, P. Blanc, and R. A. Houghten.** 1992. Rapid identification of high affinity peptide ligands using positional scanning synthetic peptide combinatorial libraries. *Biotechniques* **13**:901-905.
40. **Falk, K., O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung, and H.-G. Rammensee.** 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* **351**:290-296.
41. **Kubo, R. T., A. Sette, H. M. Grey, E. Appella, K. Sakaguchi, N. Z. Zhu, D. Arnott, N. Sherman, J. Shabanowitz, and H. Michel.** 1994. Definition of specific peptide motifs for four major HLA-A alleles. *J. Immunol.* **152**:3913-3924.
42. **Schulz, M., R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner.** 1991. Peptide-Induced Antiviral Protection by Cytotoxic T Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**:991-993.
43. **Del Val, M., HJ. Schlicht, H. Volkmer, M. Messerle, MJ. Reddehase, and UH. Koszinowski.** 1991. Protection against lethal cytomegalovirus infection by a recombinant vaccine containing a single nonameric T-cell epitope. *J. Virol.* **65**:3641-3646.
44. **Rubio-Godoy, V., V. Dutoit, Y. Zhao, R. Simon, P. Guillaume, R. Houghten, P. Romero, J. C. Cerottini, C. Pinilla, and D. Valmori.** 2002. Positional scanning-synthetic peptide library-based analysis of self- and pathogen-derived peptide cross-reactivity with tumor-reactive Melan-A-specific CTL. *J Immunol* **169**:5696-5707.
45. **Pinilla, C., R. Martin, B. Gran, J. R. Appel, C. Boggiano, D. B. Wilson, and R. A. Houghten.** 1999. Exploring immunological specificity using synthetic peptide combinatorial libraries. *Curr. Opin. Immunol.* **11**:193-202.
46. **Buseyne, F. and Y. Riviere.** 2001. The flexibility of the TCR allows recognition of a large set of naturally occurring epitope variants by HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int. Immunol* **13**:941-950.
47. **Shepp, D. H., J. E. Moses, and M. H. Kaplan.** 1996. Seroepidemiology of cytomegalovirus in patients with advanced HIV disease: influence on disease expression and survival. *J Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **11**:460-468.
48. **Chakraborty, R., G. Rees, D. Bourboulia, A. M. Cross, J. R. Dixon, A. D'Agostino, R. Musoke, C. Boshoff, S. L. Rowland-Jones, and P. Klenerman.** 2003. Viral coinfections among African children infected with human immunodeficiency virus type 1. *Clin Infect. Dis.* **36**:922-924.
49. **Damilano, G., M. C. Juarez, G. Carballal, and R. A. Arana.** 1992. Prevalence of anti-cytomegalovirus antibodies in a children population of Buenos Aires. *Medicina (B Aires)* **52**:116-118.
50. **Gibson, W., L. M. McNally, R. E. Benveniste, and J. M. Ward.** 1990. Evidence that HIV-1 gag precursor shares antigenic sites with the major capsid protein of human cytomegalovirus. *Virology* **175**:595-599.



51. **Giangeroso, M., G. Vacirca, M. Buettner, G. Wolf, E. Vanopdenbosch, and G. Muyltermans.** 1993. Serological and antigenic findings indicating pestivirus in man. *Arch. Virol. Suppl* **7**:53-62.
52. **Pedersen, K. A., E. C. Sadasiv, P. W. Chang, and V. J. Yates.** 1990. Detection of antibody to avian viruses in human populations. *Epidemiol. Infect.* **104**:519-525.
53. **Tenorio, A. P., C. E. Franti, B. R. Madewell, and N. C. Pedersen.** 1991. Chronic oral infections of cats and their relationship to persistent oral carriage of feline calici-, immunodeficiency, or leukemia viruses. *Vet. Immunol Immunopathol.* **29**:1-14.
54. **La Rosa, C., R. Krishnan, S. Markel, J. P. Schneck, R. Houghten, C. Pinilla, and D. J. Diamond.** 2001. Enhanced immune activity of cytotoxic T-lymphocyte epitope analogs derived from positional scanning synthetic combinatorial libraries. *Blood* **97**:1776-1786.
55. **Sharma, A. K., J. J. Kuhns, S. Yan, R. H. Friedline, B. Long, R. Tisch, and E. J. Collins.** 2001. Class I major histocompatibility complex anchor substitutions alter the conformation of T cell receptor contacts. *J Biol Chem* **276**:21443-21449.
56. **Micheletti, F., A. Canella, S. Vertuani, M. Marastoni, L. Tosi, S. Volinia, S. Traniello, and R. Gavioli.** 2000. Supra-agonist peptides enhance the reactivation of memory CTL responses. *J Immunol* **165**:4264-4271.

## **Conclusiones generales**

- BSC son herramientas útiles para la identificación de compuestos con actividad biológica, aún en sistemas celulares complejos.
- Las bibliotecas de piperazinas y triaminas generaron diferentes patrones de inhibición del evento de fusión de membranas dependiente de HIV-1, asociadas a diferencias en su esqueleto molecular. Los compuestos identificados sirven como punto de partida para el desarrollo de nuevos antagonistas de la entrada de HIV-1 con mayor actividad y menor toxicidad.
- La biblioteca de decapeptidos permitió identificar varios péptidos inhibidores de la replicación de HIV-1. El D-decapeptido 15dd, con  $IC_{50}$  2-7 $\mu$ M, inhibe la replicación de HIV-1 para todos los aislamientos virales ensayados, incluyendo un aislamiento clínico resistente a AZT. Los péptidos 5rr, 9rr y 13rr, con 6 a 7 aminoácidos básicos, inhiben la replicación de HIV-1 de virus R5 y R5X4 *in vitro* y son los péptidos más activos en todos los ensayos dependientes de CCR5 ensayados.
- Los péptidos 10rr, 13rr y 16rr compiten con alta afinidad con el anticuerpo 12G5 (anti-CXCR4) y son antagonistas de la quimiotaxis inducida por SDF-1 $\alpha$ . Estos péptidos tienen potencial utilidad en el tratamiento de metástasis, asma y artritis reumatoide. Este mecanismo no estaría implicado en la inhibición de la replicación de cepas HIV-1 R5.
- Se identificó un panel de L-péptidos naturales y sintéticos inmunogénicos para el clon 161jXA14 de células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> que reconocen específicamente el péptido Gag<sub>77-85</sub> de HIV-1 en el marco de HLA-A\*0201. Los péptidos más activos indujeron  $EC_{50}$ s hasta 10 veces menores que el péptido natural. Estos agonistas tienen hasta 6 substituciones con respecto a la secuencia de SL9.
- Un subgrupo de estos péptidos resultaron inmunogénicos frente a clones con la misma especificidad por SL9, aislados de otro paciente HIV<sup>+</sup>.

- Se identificaron péptidos derivados de virus heterólogos que indujeron actividad citotóxica en el clon 161jXA14, demostrando la potencial relevancia de infecciones previas o simultáneas en el curso de la infección por HIV-1.



César Boggiano



Sylvie Blondelle Ph.D.

## Fe de erratas

Tesis doctoral:

Uso de Bibliotecas Sintéticas Combinatorias para el Desarrollo de Vacunas y Antirretrovirales para el Tratamiento y Prevención del SIDA

Autor: Lic. César Boggiano

Directora: Sylvie Blondelle Ph.D.

- Introducción:
  - Página 5 – El título de la figura 2 fue omitido
    - Debe decir: Entrada de HIV-1 a la célula blanco.
  - Página 14 – La referencia 10 está incompleta
    - Debe decir: **Brelot, A., N. Heveker, M. Montes, and M. Alizon.** 2000. Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine receptor activities. *J Biol Chem.* **275** (31): 23736-44
- Capítulo 1:
  - Página 37 – Leyenda de la figura 2
    - Debe decir: Cada barra representa el porcentaje de inhibición inducido por una mezcla determinada de la biblioteca a 100 µg/ml. La línea horizontal representa el promedio de inhibición de todas las mezclas de cada sub-biblioteca. Las barras celestes indican las mezclas más activas de cada sub-biblioteca seleccionadas para la síntesis de los péptidos 1dd-16dd. Las barras rosadas,

indican las mezclas seleccionadas para la síntesis de los péptidos 17dd-38dd. 0% es la inhibición detectada en ausencia de las mezclas de la biblioteca. 100% de inhibición es la fusión medida en presencia de T20 1 $\mu$ M o con células efectoras que expresan Env IIIb UNC.

- **Página 38 – Leyenda de la figura 3**
  - **Debe decir:** Cada barra representa el porcentaje de inhibición inducido por una mezcla determinada de la biblioteca a 100  $\mu$ g/ml. La línea horizontal representa el promedio de inhibición de todas las mezclas de cada sub-biblioteca. Las barras celestes indican las mezclas más activas de cada sub-biblioteca seleccionadas para la síntesis de los péptidos 1rr-16rr. 0% es la inhibición detectada en ausencia de las mezclas de la biblioteca. 100% de inhibición es la fusión medida en presencia de T20 1 $\mu$ M o con células efectoras que expresan Env IIIb UNC.
  
- **Página 38 – Los títulos del eje Y de los gráficos están incompletos**
  - **Deben decir:** % Inhibición
  
- **Página 44 – El título de la Figura 9 fue omitido**
  - **Debe decir:** La unión del anticuerpo monoclonal 12G5 anti-CXCR4 a PBMCs es inhibida por el péptido 13rr.
  
- **Página 44 – La leyenda de la Figura 9 fue omitida**
  - **El histograma representa el número de eventos (células) correspondientes a intervalos de fluorescencia para FL-3**

medido por citometría de flujo. 12G5 se encuentra marcado con CY-Chrome. Cada color representa una diferente concentración del péptido 13rr, pre-incubado con las PBMCs.

- Página 45 – La leyenda de la Figura 11 fue omitida
- La migración de las células CCRF-CEM fue medida utilizando el sistema Transwell® con poro de 5µm. El índice quimiotáctico fue calculado de la siguiente manera: número de células transvasadas / número de células transvasadas en ausencia de SDF-1α. Los corchetes de cada barra representan el desvío estándar. Las células que atravesaron la membrana fueron cosechadas y contadas en un hemocitómetro.
- Página 53 – La referencia 23 está incompleta
  - Debe decir: **Simmons, G., P. R. Clapham, L. Picard, R. E. Offord, M. M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, R. Buser, T. N. Wells, and A. E. Proudfoot.** 1997. Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science* **276**(5310): 276-279.
- Página 53 – La referencia 24 está incompleta
  - Debe decir: **Trkola, A., T. J. Ketas, K. A. Nagashima, L. Zhao, T. Cilliers, L. Morris, J. P. Moore, P. J. Maddon, and W. C. Olson.** 2001. Potent, broad-spectrum inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by the CCR5 monoclonal antibody PRO 140. *J Virol.* **75**(2): 579-588.
- Página 54 – La referencia 35 está incompleta
  - Debe decir: **James, J. S.** 2003. T-20: most expensive AIDS drug ever at \$25,000 per year? *AIDS Treat News* **389**:6-7.

- **Página 55 – La referencia 45 está incompleta**
  - **Debe decir: Signoret, N., J. Oldridge, A. Pelchen-Matthews, P. J. Klasse, T. Tran, L. F. Brass, M. M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, W. Holmes, W. Dallas, M. A. Luther, T. N. Wells, J. A. Hoxie, and M. Marsh. 1997. Forbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. J Cell Biol. 139(3): 651-664**
  
- **Página 56 – La referencia 55 está incompleta**
  - **Debe decir: Roderiquez, G., T. Oravec, M. Yanagishita, D. C. Bou-Habib, H. Mostowski, and M. A. Norcross. 1995. Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41. J Virol. 69(4): 2233-2239.**
  
- **Página 56 – La referencia 60 está incompleta**
  - **Debe decir: Zhang, L., W. Yu, T. He, J. Yu, R. E. Caffrey, E. A. Dalmasso, S. Fu, T. Pham, J. Mei, J. J. Ho, W. Zhang, P. Lopez, and D. D. Ho. 2002. Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. Science 298(5595): 995-1000.**
  
- **Capítulo 2:**
  - **Página 72 – Leyenda de la figura 7 fue omitida**
    - **Debe decir: Cada barra representa el porcentaje de lisis específica inducido por una mezcla determinada de la biblioteca a 100 µg/ml. La línea horizontal representa el promedio de inhibición de todas las mezclas de cada sub-biblioteca. Las barras amarillas indican las mezclas correspondientes a la secuencia de SL9.**
  
  - **Página 74 – Leyenda de la tabla 2 fue omitida**



- Debe decir: Las letras en rojo representan a los aminoácidos correspondientes a la secuencia de SL9. El número de sustituciones es referido a SL9.
- **Página 76 – Leyenda de la tabla 3 fue omitida**
  - Debe decir: Las letras en rojo representan a los aminoácidos correspondientes a la secuencia de SL9. El número de sustituciones es referido a SL9. La unión a HLA A\*0201 fue determinada por el algoritmo predictivo.
- **Página 77 – Leyenda de la tabla 4 está incompleta**
  - Debe decir: Las letras en rojo representan a los aminoácidos correspondientes a la secuencia de SL9. El número de sustituciones es referido a SL9. EC<sub>50</sub> es la concentración de péptido necesaria para inducir 50% de la lisis máxima.
- **Página 78 – Leyenda de la Figura 9 está incompleta**
  - Debe decir: Cada barra representa el número de péptidos en el intervalo de EC<sub>50</sub> descripto. EC<sub>50</sub> es la concentración de péptido necesaria para inducir 50% de la lisis máxima. ▲ representa el promedio los valores de unión a HLA A\*0201 de los péptidos incluidos en el intervalo con su desvío estándar (corchete).
- **Página 79 – Leyenda de la tabla 5 está incompleta**
  - Debe decir: Las letras en rojo representan a los aminoácidos correspondientes a la secuencia de SL9. El número de sustituciones es referido a SL9. EC<sub>50</sub> es la concentración de péptido necesaria para inducir 50% de la

lisis máxima. La unión a HLA A\*0201 fue determinada por el algoritmo predictivo.

- **Página 80 – Leyenda de la figura 10 fue omitida**
  - **Debe decir: Actividad citolítica inducida por el clon 161jXA14.  $EC_{50}$  es la concentración de péptido necesaria para inducir 50% de la lisis máxima. R es el coeficiente de regresión de Pearson de la regresión lineal (línea negra).**
  
- **Página 80 – Leyenda de la figura 11 fue omitida**
  - **Debe decir: Actividad citolítica inducida por el clon 161jXA14.  $EC_{50}$  es la concentración de péptido necesaria para inducir 50% de la lisis máxima. La unión a HLA A\*0201 fue determinada por el algoritmo predictivo. R es el coeficiente de regresión de Pearson de la regresión lineal (línea negra).**
  
- **Página 81 – Leyenda de la tabla 6 fue omitida**
  - **Debe decir: Las letras en rojo representan a los aminoácidos correspondientes a la secuencia de SL9. El número de sustituciones es referido a SL9. La unión a HLA A\*0201 fue determinada por el algoritmo predictivo.**
  
- **Página 82 – Leyenda de la tabla 7 está incompleta**
  - **Debe decir: Las letras en rojo representan a los aminoácidos correspondientes a la secuencia de SL9. El número de sustituciones es referido a SL9.  $EC_{50}$  es la concentración de péptido necesaria para inducir 50% de la lisis máxima. Datos expresados en relación a SL9 de acuerdo a:  $EC_{50}$  del péptido/  $EC_{50}$  del SL9 en el mismo clon.**

La unión a HLA A\*0201 fue determinada por el algoritmo predictivo.

- **Página 84 – Leyenda de la tabla 9 está incompleta**
  - **Debe decir: Las letras en rojo representan a los aminoácidos correspondientes a la secuencia de SL9. El número de sustituciones es referido a SL9. EC<sub>50</sub> es la concentración de péptido necesaria para inducir 50% de la lisis máxima. Datos expresados en relación a SL9 de acuerdo a la fórmula: EC<sub>50</sub> del péptido/ EC<sub>50</sub> del SL9 en el mismo clon. La unión a HLA A\*0201 fue determinada por el algoritmo predictivo.**
  
- **Página 92 – La referencia 23 está incompleta**
  - **Debe decir: Hogquist, K. A., A. J. Tomlinson, W. C. Kieper, M. A. McGargill, M. C. Hart, S. Naylor, and S. C. Jameson. 1997. Identification of a naturally occurring ligand for thymic positive selection. Immunity 6(4): 389-399.**