
Péptidos sintéticos para la inducción de una respuesta inmune humoral y celular contra el virus de la hepatitis B y el tipaje del virus de la hepatitis C

Synthetic peptides for the induction of a humoral and cellular immune response against the hepatitis B virus and the serotype of hepatitis C virus

S. Hervás-Stubbs, M. Rodríguez, J.J. Lasarte, J.I. Riezu, C. Berasain, J. Prieto, F. Borrás-Cuesta

INTRODUCCIÓN

Investigaciones recientes realizadas en nuestro y otros laboratorios han probado la eficacia de los péptidos sintéticos tanto en diagnóstico¹ como en la inducción de respuestas humorales^{2,6} y citotóxicas⁷, que podrían ser efectivas para el tratamiento de pacientes crónicamente infectados. Dentro de este campo, son de especial relevancia las infecciones por los virus de la hepatitis B (HBV) y C (HCV). La única alternativa actual de tratamiento de pacientes crónicamente infectados por estos virus es el interferón alfa (IFN- α) recombinante, con una eficacia del 30%⁸. En el caso de la hepatitis C, la respuesta al IFN- α parece estar ligada al genotipo del virus⁹.

Dado el alto porcentaje de pacientes con hepatitis crónica B y C, y dado la poca eficacia del tratamiento con IFN- α , es de primordial importancia desarrollar nuevas terapias para tratar a dichos pacientes. Nuestro laboratorio ha desarrollado estrategias de inmunización que permiten que cepas de ratones que no responden a la

inmunización con un antígeno, en concreto el antígeno de superficie del HBV, respondan mediante la inmunización conjunta con el antígeno y un péptido sintético capaz de inducir una respuesta T helper⁶. Pensamos que esta estrategia podría ser útil en el tratamiento de enfermos con infecciones crónicas virales en los que la respuesta T frente al virus sea pobre o nula, como es el caso de la hepatitis crónica B. Para probarlo se escogió el modelo de la marmota, dado que esta especie se infecta por el virus WHV (Woodchuck Hepatitis Virus), perteneciente a la misma familia que el HBV, que causa en marmotas una enfermedad hepática con la misma sintomatología que la hepatitis B en el hombre¹⁰.

Dado que la respuesta al IFN- α en los pacientes infectados por HCV parece estar ligada al genotipo del virus⁹, el tipaje de éste sería de gran utilidad para establecer prioridades en el tratamiento. El tipaje del HCV puede llevarse a cabo con precisión mediante técnicas de biología molecular. Sin embargo, estas técnicas no son de fácil

ANALES Sis San Navarra 1999, 22 (Supl. 3): 93-102.

Departamento de Medicina Interna. Universidad de Navarra. Pamplona

Correspondencia:

F. Borrás-Cuesta
Departamento de Medicina Interna
Universidad de Navarra
Apdo. 177
Pamplona

manejo y no están al alcance de muchos laboratorios. Un ensayo alternativo sería un ELISA basado en péptidos sintéticos. Así, Simmonds y col¹¹, utilizando péptidos de la proteína NS4, logran tipar tres tipos de virus. Sin embargo, este método no permite diferenciar entre los genotipos 1a y 1b. Pensamos que el empleo de un panel de péptidos más amplio, provenientes de las diferentes proteínas del HCV, permitiría desarrollar un ensayo capaz de diferenciar no solamente tipos sino también subtipos.

Según estas premisas nos propusimos los siguientes objetivos:

- Estudiar si la inmunización conjunta con antígeno de superficie del WHV (WHsAg) y un péptido DTh adecuado es capaz de inducir una respuesta humoral frente al antígeno en marmotas con hepatitis crónica.

- Estudiar la respuesta humoral frente a las distintas proteínas del HCV en pacientes infectados con virus de distintos genotipos, con el objeto de encontrar péptidos específicos de tipo y subtipo que pudieran ser utilizados en un ELISA de serotipaje.

MATERIAL Y MÉTODOS

Antígeno y péptidos. Hepatitis B

El antígeno de superficie del WHV (WHsAg) se aisló de una mezcla de sueros de animales crónicamente infectados por WHV, mediante centrifugación en gradiente de sacarosa y posterior centrifugación en gradiente de cloruro de cesio¹². El péptido Mb106-118, que comprende los residuos 106-118 de la mioglobina de esperma de ballena y cuya secuencia de aminoácidos es FISEAHVLHSR, se sintetizó manualmente siguiendo el método en fase sólida de Merrifield¹³ y la alternativa F-moc¹⁴. Se usó el test de la ninhidrina para controlar cada paso de la síntesis¹⁵.

Inmunización de las marmotas y seguimiento de los marcadores virales y del daño hepático. Hepatitis B

Se inmunizaron tres marmotas crónicamente infectadas por el WHV (M845, M848 y M023) y una no infectada (M1D) con el antígeno de superficie del WHV (WHsAg) conjuntamente con el péptido Mb106-118

(50 mg y 200 mg respectivamente por marmota). Este péptido fue escogido por haber demostrado ser un buen Determinante T Helper (DTh) en diversas cepas de ratón, aunque no sabíamos si sería reconocido como DTh por las marmotas. Como control, se inmunizó una marmota crónicamente infectada por WHV (M079) sólo con el péptido Mb106-118 (200 mg) y otra marmota (M342), también portadora crónica del virus, sólo con WHsAg (50 mg). Las marmotas recibieron tres dosis de recuerdo cada 30 días. Se extrajeron muestras de suero cada 15 días. Las marmotas fueron seguidas hasta 2 meses después de la última inmunización. Los marcadores virales estudiados fueron los niveles séricos del DNA viral, medido por Dot Blot, y los niveles séricos del WHsAg, por ELISA. Como indicadores del daño hepático se consideraron los niveles séricos de la gamma-glutamiltanspeptidasa (γ -GTP) y los de la bilirrubina total, ambos medidos por pruebas bioquímicas.

Estudio de las respuestas humoral y T helper inducidas. Hepatitis B

Los títulos de anticuerpos (Ac) inducidos frente al WHsAg y frente al péptido Mb106-118 se midieron mediante ELISA, pegando en la placa el antígeno correspondiente (WHsAg o Mb106-118) y revelando con proteína-A peroxidasa. El estudio de la respuesta T helper se realizó mediante el ensayo de producción de IL-2. Los linfocitos de sangre periférica de las marmotas inmunizadas se reestimularon *in vitro* con WHsAg y/o con Mb106-118. Tras 24 horas de cultivo, se tomaron 50 ml de sobrenadante y se midió la cantidad de IL-2 producida por un bioensayo basado en la dependencia del IL-2 por parte de la línea celular CTL.L. Los resultados obtenidos, en cuentas por minuto (cpm), se expresan como índices de estimulación (IE) (cociente de la media de las cpm obtenidas por triplicado frente al WHsAg o al Mb106-118 y la media de las cpm obtenidas de tres controles negativo con medio de cultivo). Se consideraron significativos $IE \geq 3$.

Péptidos sintetizados. Hepatitis C

Se sintetizaron 601 péptidos de los distintos genotipos, pertenecientes a las dis-

tintas proteínas del virus: 6 péptidos pertenecientes a 2 zonas de la proteína *core*, 93 de 14 zonas de la proteína E1, 29 de 7 zonas de la proteína E2, 10 de 2 zonas de la proteína NS2a, 50 de 10 zonas de la proteína NS2b, 67 de 14 zonas de la proteína NS3, 15 de 2 zonas de la proteína NS4a, 47 de 13 zonas de NS4b, 153 de 31 zonas de NS5a y 134 péptidos de 27 zonas de NS5b. La longitud de los péptidos varió entre 7 y 16 aminoácidos.

Genotipaje de sueros. Hepatitis C

Se estudiaron tres grupos de sueros de pacientes con hepatitis crónica C. El primero, formado por 92 sueros de la seroteca del Departamento de Medicina Interna de la Universidad de Navarra (Navarra-1), se utilizó para estudiar la presencia de anticuerpos frente a todos los péptidos sintetizados. Los otros dos grupos de sueros: 114 sueros de Méjico y 58 nuevos sueros de la seroteca del Departamento de Medicina Interna (Navarra-2), se utilizaron para ampliar y confirmar los resultados obtenidos con el primer grupo. Los sueros de los tres grupos fueron genotipados utilizando la técnica de hibridación con son-

das específicas de genotipo. Como control se usó un grupo de 35 sueros de individuos sanos.

RESULTADOS

Hepatitis B

La inmunización conjunta con WHsAg y el péptido Mb106-118 fue capaz de inducir Ac contra dicho antígeno (anti-WHs) en la marmota no infectada (M1D) y en 3/3 marmotas crónicamente infectadas por WHV (M1D2I, M845 y M848), sin embargo, no se detectaron Ac anti-WHs en la marmota inmunizada sólo con WHsAg (M342) (Tabla 1). Los títulos de Ac anti-WHs fueron bajos (1/50) en las marmotas M845 y M848, medios-altos en la marmota M1D y altos en la marmota M1D2I. En todas las marmotas inmunizadas con WHsAg y Mb106-118 o sólo con Mb106-118 (M079) se detectaron Ac frente al péptido Mb106-118 (datos no mostrados). Al realizar el ensayo de producción de IL-2 en las marmotas inmunizadas con WHsAg y Mb106-118, sólo se detectaron IE significativos (IE \geq 3) frente al péptido Mb106-118 pero no en cambio frente al WHsAg (Tabla 1). También se

Tabla 1. Títulos de Ac anti-WHs, respuesta T helper y evolución de los marcadores virales tras la inmunización conjunta con WHsAg y Mb 106-118 o con cada antígeno por separado.

Marmotas ^(A)	Anti-WHs título máx.	R. T helper (IE)		Niveles de los marcadores virales					
		WHsAg	Mb106-118	Basales ^(B)		Máximo ^(C)		Finales ^(D)	
				DNA	WHsAg	DNA	WHsAg	DNA	WHsAg
M1D (ni)	500	1,1	5,6	-	-	-	-	-	-
WHsAg+Mb106-118									
M1D2I (c)	1600	0,8	8,9	<u>10</u>	340	<u>150</u>	1200	<u>0</u>	400
WHsAg+Mb106-118									
M845 (c)	50	1,7	15,0	<u>60</u>	790	<u>250</u>	1500	<u>3</u>	750
WHsAg+Mb106-118									
M848 (c)	40	1,1	4,7	<u>130</u>	790	<u>1100</u>	1100	<u>30</u>	600
WHsAg+Mb106-118									
M342 (c)	0	1,0	NM	<u>20</u>	870	<u>50</u>	1700	<u>20</u>	300
WHsAg									
M079 (c)	0	NM	109,7	<u>3500</u>	1400	<u>16300</u>	11200	<u>2300</u>	4800
Mb106-118									

(A) Las marmotas fueron inmunizadas con WHsAg y Mb106-118 (M1D, M1D2I, M845, M848), sólo con WHsAg (M342) o sólo con Mb106-118 (M079). (B) Como niveles basales del DNA viral y del WHsAg en el suero se tomaron los del día 0 del tratamiento. (C) Durante el tratamiento se observó una elevación de los niveles séricos del DNA viral y del WHsAg. En la tabla se muestran los valores máximo observados. (D) Como niveles finales se consideraron los correspondientes a 2 meses después de la última inmunización. Los niveles del DNA viral se expresan en ng/ml y los del WHsAg en ug/ml. Abreviaturas: (ni)= marmota no infectada por WHV, (c)= marmota con infección crónica por WHV, (NM)= No Medido.

detectará IE significativos frente al Mb106-118 en la marmota inmunizada sólo con Mb106-118. No se detectaron IE significativos frente al WHsAg en la marmota inmunizada sólo con WHsAg.

En todas las marmotas crónicamente infectadas por WHV e inmunizadas con WHsAg+Mb106-118, se observó un aumento transitorio de los niveles séricos del DNA viral así como del WHsAg, que es seguido de un descenso, alcanzando en el caso del DNA valores por debajo de los basales y en el caso del WHsAg, similares a los basales (Tabla 1). En la marmota M1D2I los niveles finales del DNA fueron indetectable por Dot Blot. En las marmotas inmunizadas sólo con WHsAg (M342) o sólo con Mb106-118 (M079), si bien se observó un aumento transitorio de los niveles de dichos marcadores durante el tratamiento, los niveles finales no variaron significativamente de los basales (Tabla 1).

En todas las marmotas crónicamente infectadas por WHV e inmunizadas con WHsAg+Mb106-118 se observó una reactivación del daño hepático, que vino indicado por un aumento transitorio de los niveles de la g-GTP (datos no mostrados). Este aumento fue especialmente significativo en la marmota 845 y coincidía con el descenso del DNA viral. También se observó un aumento de los niveles de la bilirrubina total en la marmota M1D2I, alcanzando el máximo nivel en la semana 22 del tratamiento (datos no mostrados). La marmota M1D2I, en la que se indujeron los títulos de anti-WHs más altos, murió en la semana 23 del tratamiento. El estudio citológico del hígado reveló que había muerto de hepatitis fulminante (datos no mostrados).

Hepatitis C

Respuesta del grupo de sueros Navarra-1 y de los controles frente a los péptidos

Los péptidos sintetizados se enfrentaron mediante un ensayo ELISA al conjunto de sueros Navarra-1 con objeto de encontrar péptidos específicos de genotipo. Se encontraron siete patrones diferentes de reconocimiento de péptidos:

– Péptidos no reconocidos por ningún suero.

– Péptidos reconocidos de forma específica por sueros de pacientes y no por sueros de controles, pero sin ser específicos de genotipo.

– Péptidos inespecíficos, reconocidos tanto por pacientes como por controles.

– Péptidos cuyo reconocimiento fue específico de genotipo.

– Péptidos reconocidos preferentemente por algunos genotipos virales, pero reconocidos también ocasionalmente por sueros de controles sanos.

– Péptidos específicos de genotipo, pero reconocidos por sueros de un genotipo que no correspondía a su secuencia.

– Péptidos reconocidos de forma importante por sueros de su mismo genotipo y, en una pequeña proporción, por sueros de un genotipo distinto al suyo.

Modificación de péptidos

Una vez enfrentados los péptidos al conjunto de sueros Navarra-1, se escogieron aquellos péptidos que reconocían a un gran número de sueros, pero presentaban reacciones cruzadas y se intentó aumentar la especificidad de los mismos realizando varios tipos de modificaciones. Las modificaciones que se realizaron fueron las siguientes:

– Desplazamiento de la secuencia del péptido hacia los extremos amino o carboxilo terminal

Una de las modificaciones que se realizó fue la de desplazar la zona elegida anteriormente hacia los extremos amino o carboxilo terminal de la poliproteína, para tratar de eliminar el fragmento del péptido responsable de las reacciones cruzadas. Estos péptidos se enfrentaron al panel de sueros Navarra-1 y al conjunto de sueros control. De los 40 péptidos sintetizados, en 8 se consiguió el objetivo esperado. En algunos de los casos, se eliminó totalmente el reconocimiento y en otros la modificación transformó al péptido en inespecífico ya que pasó a ser reconocido también por controles.

– Disminución de la longitud del péptido

Otra de las modificaciones consistió en sintetizar péptidos de menor longitud que los iniciales con el objeto de eliminar las posibles zonas causantes de reacciones cruzadas. Para ello, se compararon los péptidos de distintos genotipos correspondientes a una misma zona y se vio qué zona era común en todos ellos. Esta zona se eliminó y se dejó aquella que variase de un genotipo a otro. En algunos de los casos se añadieron alaninas a ambos lados del péptido para evitar así posibles problemas en el pegado del péptido a la placa ya que los péptidos demasiado pequeños no se pegan bien. Estos péptidos se enfrentaron al panel de sueros Navarra-1 y al conjunto de sueros control. De los 61 péptidos modificados por este procedimiento, en 12 se consiguió el objetivo esperando.

– Sustitución de aminoácidos

Utilizando el programa Hyperchem (*Hypercube and Autodesk Inc. San Rafael, California, USA*), se representaron los péptidos candidatos a ser modificados. Se marcaron los aminoácidos de un mismo lado de la α -hélice que se pensaba podían constituir los epítopes reconocidos por los anticuerpos. En los péptidos modificados se respetaron estos aminoácidos y se sustituyó el resto por alaninas. Estos péptidos se enfrentaron al panel de sueros de Navarra-1 y al conjunto de sueros control. De los 15 péptidos modificados por este procedimiento, sólo en uno se consiguió el objetivo esperado.

Selección de péptidos

Una vez estudiado el comportamiento de todos los péptidos sintetizados (originales y modificados) con el conjunto de sueros Navarra-1, se eligieron aquellos específicos de genotipo que no habían sido reconocidos por ningún suero control. Los péptidos seleccionados se enfrentaron con el grupo de sueros de Méjico y con el panel de sueros Navarra-2, para ver si se confirmaban los resultados obtenidos con el conjunto de sueros Navarra-1. En algunos de los péptidos se perdió la especificidad al enfrentarlos a los sueros del grupo Navarra-2 y de Méjico. Algunos de los péptidos seleccionados inicialmente resultaron inespecíficos frente a los sueros de Méjico y Navarra-2,

por ello se hizo una segunda selección eliminando los péptidos que habían dado reacciones cruzadas.

Homopolímeros

Se intentó mejorar la presentación de los péptidos para así poder aumentar la sensibilidad de los mismos. Para ello, se sintetizaron homopolímeros de los péptidos de la primera selección (algunos de ellos modificados). Estos polímeros fueron sintetizados porque se había observado previamente en nuestro laboratorio que los homopolímeros de un péptido pueden aumentar la sensibilidad en el ensayo ELISA¹. Los homopolímeros tuvieron tres tipos de comportamientos: eliminación de la respuesta, aumento de la inespecificidad por reconocimiento de controles y/o sueros de otros genotipos y aumento de la sensibilidad.

Péptidos y homopolímeros elegidos para serotipar

Con todos los resultados anteriores se eligieron los mejores péptidos para serotipar. En algunos casos se utilizó el péptido, en otros se sustituyó el péptido por el polímero y en algunos casos se utilizaron los dos, ya que se complementaba la acción de ambos. Las figuras muestran los resultados de enfrentar los péptidos y polímeros seleccionados al grupo de sueros Navarra-1 y los controles (Fig. 1) y a los sueros de Méjico (Fig. 2). Los resultados del reconocimiento de péptidos y homopolímeros por el grupo de sueros Navarra-2 son similares (datos no mostrados). En la Tabla 2 se muestra un resumen de los porcentajes de sueros serotipados con los péptidos y polímeros seleccionados con los tres grupos de sueros. Se observa que la sensibilidad de asignación del genotipo viral por ELISA es de un 60%, quedando un 40% de sueros sin genotipar.

DISCUSIÓN

Hepatitis B

La inmunización conjunta con WHsAg y Mb106-118 induce Ac anti-WHs en marmotas con hepatitis crónica. Los resultados del ensayo de producción de IL-2, junto con el hecho de que sólo en las marmotas inmunizadas con WHsAg+Mb106-118 se

PÉPTIDOS SINTÉTICOS PARA LA INDUCCIÓN DE UNA RESPUESTA INMUNE...

	SUERO	1a		1b		1		2		3	
		1a	1b	1a	1b	1a	1b	2a	2b	3a	3b
1a	MB-36										
	MB-40										
	MB-45										
	MB-50										
	MB-54										
	MB-87										
	MB-95										
	MB-98										
	MB-103										
	MB-107										
	MB-108										
1b	MB-2										
	MB-3										
	MB-4										
	MB-5										
	MB-6										
	MB-7										
	MB-8										
	MB-9										
	MB-10										
	MB-11										
	MB-15										
MB-16											
MB-18											
MB-19											
MB-25											
MB-26											
MB-27											
MB-32											
MB-33											
MB-36											
MB-38											
MB-41											
MB-43											
MB-44											
MB-46											
MB-47											
MB-48											
MB-49											
MB-51											
MB-52											
MB-55											
MB-56											
MB-57											
MB-59											
MB-60											
MB-61											
MB-62											
MB-63											
MB-64											
MB-66											
MB-67											
MB-68											
MB-70											
MB-71											
MB-72											
MB-73											
MB-77											
MB-78											
MB-81											
MB-82											
MB-83											
MB-84											
MB-86											
MB-89											
MB-90											
MB-91											
MB-92											
MB-96											
MB-97											
MB-101											
MB-102											
MB-104											
MB-105											
MB-106											
MB-110											
MB-112											
MB-114											
MB-115											
MB-116											
1a, 1b	MB-24										
	MB-53										
	MB-79										
2	MB-88										
	MB-1										
	MB-31										
2a	MB-34										
	MB-39										
	MB-75										
2b	MB-12										
	MB-13										
	MB-69										
2c	MB-93										
	MB-94										
	MB-111										
3	MB-23										
	MB-37										
	MB-100										
1a, 1b, 2a	MB-22										
	MB-42										
	MB-75										
1a, 3	MB-20										
	MB-21										
	MB-22										
PCR	MB-24										
	MB-20										
	MB-21										

Figura 2. Reconocimiento de los péptidos y homopolímeros elegidos para el serotipaje por los sueros de Méjico. Abscisa: péptidos de diferentes genotipos. Los números seguidos de una letra indican el genotipo (pe. 1a), se indica también la posición de los péptidos en la poliproteína del virus. Una p delante de la secuencia del péptido indica que se trata del polímero. Ordenada: sueros de pacientes de Méjico. Se indica también el genotipo del suero. El color negro representa un reconocimiento positivo de los péptidos por parte de los sueros y el gris indica un reconocimiento débilmente positivo.

Tabla 2. Resultado global del serotipaje.

Genotipo	n	Serot 1a	Serot 1b	Serot 1	Serot 2	Serot 3	total serotipados	no serotipados
1a	41	14 (34%)	-	15 (37%)	-	-	29 (71%)	12 (29%)
1b	132	-	64 (48%)	30 (23%)	-	-	94 (71%)	38 (29%)
2*	24	-	-	-	14 (58%)	-	14 (58%)	10 (42%)
3	45	-	-	-	-	22 (49%)	22 (49%)	23 (51%)
4	3	-	-	-	-	-	-	3 (100%)
1a+1b	4	-	-	-	-	1 (25%)	1 (25%)	3 (75%)
1b+4	5	-	2 (40%)	-	-	-	2 (40%)	3 (60%)
1b+2b	3	-	3 (100%)	-	1 (33%)	-	4 (100%)	-
1a+1b+2a	1	-	-	-	-	-	-	1 (100%)
1a+3	1	-	-	-	-	-	-	1 (100%)
2+3	1	-	-	-	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	-
Total							166 (64%)	94 (36%)

Junto al número de sueros se indican entre paréntesis los porcentajes. n: número total de sueros. no serotipados: sueros que no fueron reconocidos por ningún péptido. *Los sueros 2a, 2b y 2c se incluyen en el genotipo 2. De los 2 sueros 1b+2 uno resultó serotipo 1 y el otro serotipo 1 y 2.

indujeran Ac anti-WHs sugieren que el péptido Mb106-118 es el responsable de la ayuda T para la inducción de estos Ac. Como consecuencia de la inmunización se observa un descenso final de los niveles séricos del DNA viral, con respecto a los niveles basales, pero no de los niveles séricos del WHsAg. El descenso de la carga viral está acompañado de una reactivación del daño hepático. La intensidad del daño hepático se correlaciona con los títulos de Ac inducidos. En aquella marmota en la que se indujeron los títulos más altos, la lesión hepática fue muy intensa, llegando a ser fatal (hepatitis fulminante).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que, desde el punto de vista terapéutico, la inmunización conjunta con antígeno de superficie y un péptido DTh, podría reducir la carga viral en pacientes crónicamente infectados por HBV. No obstante, es necesario profundizar en estrategias de inmunoterapia más efectivas, así como aprender a modular la respuesta inmune. Dado que la transferencia adoptiva de inmunidad frente al HBV, después del trasplante de médula ósea, puede conducir al aclaramiento del virus¹⁶ pero también a la hepatitis fulminante¹⁷ y tomando en cuenta nuestros resultados en marmotas, se puede concluir que el aumento de la respuesta inmune en portadores crónicos

podría tener efectos indeseables. Por este motivo, debería tenerse sumo cuidado al estudiar los efectos de la vacunación terapéutica en el hombre.

Hepatitis C

El proceso de selección de péptidos de las proteínas del HCV puso en evidencia diferentes aspectos inmunológicos:

- Algunos péptidos de un determinado genotipo no fueron reconocidos por el suero de pacientes infectados con ese genotipo. Sin embargo, el suero de pacientes infectados con otros genotipos reaccionaron en forma cruzada con esos péptidos y reconocieron el péptido de su mismo genotipo con mayor intensidad. Este resultado podría explicarse suponiendo que una región de una proteína puede ser inmunogénica en un genotipo pero no en otros.

- Los experimentos de acortamiento de los péptidos mostraron que los epítopes B para una proteína dada se sitúan en posiciones ligeramente diferentes que dependen del genotipo viral del cual procede la proteína.

- No todos los pacientes infectados con el mismo genotipo del HCV reconocieron a los mismos péptidos. Esto podría ser debido a diferencias en el repertorio de células

B de los pacientes o a la activación preferencial de linfocitos B de diferentes especificidades. En este último caso la explicación podría estar relacionada con las moléculas del Complejo Mayor de Histo-compatibilidad de clase II de los pacientes.

- Durante la selección de los péptidos se observó que alrededor del 30% de ellos fueron reconocidos por a lo menos un suero de donante sano. Esto podría deberse a una reacción cruzada frente a los anticuerpos inducidos por uno de los tantos antígenos a los que hemos estado expuestos durante nuestra vida. Sin embargo, este alto porcentaje de reactividad cruzada podría ser debida a una estrategia de defensa del HCV frente a la presión inmune.

A pesar del gran número de péptidos utilizados en el presente estudio, la sensibilidad de asignación del genotipo viral por ELISA es bastante inferior a la lograda mediante técnicas de Biología Molecular (60% frente al 100%). Sin embargo, debido a su simplicidad, nuestro método podría utilizarse como primer ensayo que permitiría tipar una proporción importante de sueros. Aquellos que no pudieran ser tipados mediante péptidos, se estudiarían ahora por las técnicas de biología molecular. Esto limitaría el número de ensayos a realizar por estas técnicas, más complicadas y que requieren personal más especializado. En la actualidad estamos probando nuevos péptidos con el objeto de intentar mejorar la sensibilidad de tipaje mediante ELISA.

Finalmente, a lo largo de este trabajo se han identificado péptidos que, sin ser específicos de genotipo, son reconocidos de forma específica por sueros de pacientes pero no por sueros de controles. Estos péptidos, unidos a los identificados en trabajos previos¹, podrían aumentar la sensibilidad del kit de diagnóstico basado en péptidos sintéticos desarrollado por nuestro laboratorio¹.

BIBLIOGRAFÍA

1. BERASAIN C, GARCÍA-GRANERO M, RIEZU-BOJ JJ, PRIETO J, BORRÁS-CUESTA F. Detection of anti-hepatitis C virus antibodies by ELISA using synthetic peptides. *J Hepatol* 1993; 18: 80-84.
2. BORRÁS-CUESTA F, PETIT-CAMURDAN A, FEDON Y. Engineering of immunogenic peptides by co-linear synthesis of determinants recognized by B and T cells. *Eur J Immunol* 1987; 17: 1213-1215.
3. BORRÁS-CUESTA F, FEDON Y, PETIT-CAMURDAN A. Enhancement of peptide immunogenicity by linear polymerization. *Eur J Immunol* 1988; 18:199-202.
4. GOLVANO JJ, LASARTE JJ, SAROBE P, GULLÓN A, PRIETO J, BORRÁS-CUESTA F. Polarity of Immunogens. Implications for vaccine design. *Eur J Immunol* 1990; 20: 2363-2366.
5. SAROBE P, LASARTE JJ, GOLVANO JJ, GULLÓN A, CIVEIRA MP, PRIETO J et al. Induction of antibodies against a peptide hapten does not require covalent linkage between the hapten and a class II presentable peptide. *Eur J Immunol* 1991; 21: 1555-1558.
6. HERVÁS-STUBBS S, BERASAIN C, GOLVANO JJ, LASARTE JJ, PRIETO I, SAROBE P et al. Overcoming class II-linked non-responsiveness to hepatitis B vaccine. *Vaccine* 1994; 12: 867-871.
7. LASARTE JJ, SAROBE P, GULLÓN A, PRIETO J, BORRÁS-CUESTA F. Induction of cytotoxic T lymphocytes in mice against the principal neutralizing domain of HIV-1 by immunization with an engineered T-cytotoxic-T-helper synthetic peptide construct. *Cell Immunol* 1992; 141: 211-218.
8. THOMAS HC, KARAYIANNIS P, BROOK G. Treatment of hepatitis B virus infection with interferon. Factors predicting response to interferon. *J Hepatol* 1991; 13: 4-7.
9. YOSHIOKA K, KAKUMU S, WAKITA T, ISHIKAWA T, ITOH Y, TAKAYANAGI M et al. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon alpha therapy: relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 1992; 16: 293-299.
10. SUMMERS J, SMOLEC JM, SNYDER R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 4533-4537.
11. SIMMONDS P, ROSE KA, GRAHAM S, CHAN SW, MCOMISH F, DOW BC et al. Mapping of Serotype-Specific, immunodominant epitopes in the NS4 region of Hepatitis C virus (HCV): use of type-specific peptides to serologically differentiate infections with HCV types 1, 2 and 3. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1493-1503.
12. GERIN JL, FAUST RM, HOLLAND PV. Biophysical characterization of the adr subtype of

- hepatitis B antigen and preparation of anti-sera in rabbits. *J Immunol* 1975; 115: 100-105.
13. MERRIFIELD RB. Solid-phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc* 1963; 85: 2149-2154.
14. ATHERTON E, LOGAN JC, SHEPPARD RC. Peptide synthesis. II Procedures for solid phase synthesis using N-fluorenyl methoxycarbonyl amino acids on polyamide supports. Synthesis of substance P and of acyl carrier protein 65-74 decapeptide. *J Chem Soc Perkin Trans* 1989; 1: 538-1546.
15. KAISER E, COLESCOTT RL, BOSSINGER CD, COOK PI. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem* 1970; 34: 595-598.
16. ILAN Y, NAGLER A, ADLER R, TUR-KASPA R, SLAVIN S, SHOUVAL D. Ablation of persistent hepatitis B by bone marrow transplantation from a hepatitis B-immune donor. *Gastroenterology* 1993; 104: 1818-1821.
17. CASELITZ M, LINK H, HEIN R, TISCHLER HJ, MASCHECK HJ, BÖKER K et al. Fatal hepatitis B reactivation after bone marrow transplantation (Abstract). *J Hepatol* 1995; 23 (Suppl 1): 108 P/C1/86.