Interferón y Biotecnología, Vol. 6, No. 1, 52-56 (1989)

Síntesis química de un nonapéptido del antígeno de superficie del virus de hepatitis B

G. SÁNCHEZ,[1] Z. DIMITROVNA[2] y M. TITOV[2]

[1] Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba

[2] Centro de Investigaciones Cardiológicas, Academia de Ciencias Médicas, URSS

Recibido en octubre de 1988
Aprobado en noviembre de 1988

RESUMEN

Una de las proteínas más estudiadas con el fin de realizar ensayos inmunológicos ha sido el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B humana, tanto por su interés para la producción de una vacuna, como para disponer de nuevos métodos de diagnóstico de la enfermedad mediante la aplicación de la técnica de obtención de anticuerpos monoclonales. En este artículo se describe la síntesis por vía química en solución, del péptido correspondiente a la región 130-138 de la región pre-S del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, así como el estudio de los resultados obtenidos por espectrometría de masas, análisis de aminoácidos y secuencia aminoacídica manual, siguiendo el método de degradación de Edman.

SUMMARY

Human hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) has been widely studied and used as a vaccine and for diagnosis methods using monoclonal antibodies due to its antigenicity and immunogenicity. Here we describe the chemical synthesis in solution of a peptide corresponding to the 130-138 epitope of the pre-S region of this antigen and its characterization by mass spectrometry, aminoacid analysis and aminoacid sequence by manual Edman degradation.

INTRODUCCION

En la actualidad ha tomado gran auge la síntesis de péptidos con fines de utilización en estudios inmunológicos. Una de las proteínas más estudiadas en este sentido ha sido el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B humana, tanto por el interés de usarlo en forma de vacuna, como por la posibilidad de desarrollar métodos de diagnóstico mediante la obtención de determinados péptidos de su secuencia (Neurath, 1984).

Al mismo tiempo, la producción de anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra una región determinada del antígeno presenta interés, tanto en diagnóstico como en el desarrollo de métodos de purificación de este. Por tal razón consideramos importante la obtención por vía de síntesis química de un péptido correspondiente a la región pre-S del antígeno de superficie (Neurath, 1984a).

Copyright © 1989, Sociedad Iberolatinoamericana para Investigaciones sobre Interferón
Publicado por el Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba

La disponibilidad de este péptido nos permitiría la obtención de anticuerpos utilizables en la purificación del antígeno de superficie obtenido mediante ingeniería genética, que incluye la región pre-S del gen, como parte del proceso de obtención de la vacuna recombinante.

MATERIALES Y METODOS

Protección de aminoácidos

Todos los grupos alfa-amino se protegieron utilizando el cloruro de carbobenzoxilo (ZCl) (Fluka). De esta forma se obtuvieron los siguientes aminoácidos protegidos: Z-Ala-OH; Z-Leu-OH; Z-Asp-(OBut) -OH; Z-3-Arg-OH; Z-Val-OH.

En el caso del ácido aspártico se utilizó como producto de partida Asp-(OBut) -OH comercial (Reanal).

En el caso de Leu, Ala, Asp y Val, las condiciones de reacción fueron: 1,2 equivalentes de ZCl/2,0 equivalentes de hidroxido de sodio, a una temperatura entre 0 y 4°C, durante dos horas, manteniendo el pH entre 10,2 y 10,3.

La Z-3-Arg-OH se obtuvo en las siguientes condiciones: 3,0 equivalentes de ZCl/6 equivalentes de hidróxido de sodio, a una temperatura entre -10 y -5°C durante 2 horas, a pH 13.

El rendimiento de estas reacciones estuvo entre el 80 y el 90 %; todos los aminoácidos protegidos se aislaron por cristalización, excepto Z-Leu-OH, que se utilizó en forma de aceite.

Obtención de fragmentos intermediarios

Para obtener los péptidos intermediarios, las reacciones de acoplamiento se llevaron a cabo utilizando el método del éster activo. En todos los casos, el grupo carboxilo se activó con un equivalente de 4-nitrofenol (Fluka), excepto en el ácido aspártico, que se activó con un equivalente de N-hidroxi-succinimida. Estas reacciones se realizaron en presencia de un equivalente de diciclohexil carbodiimida (Fluka) a -40°C. Los productos fueron cristalizados de n-hexano y se purificaron por recristalización de isopropanol. Los rendimientos obtenidos estuvieron entre el 90 y el 95 %.

En las reacciones de acoplamiento el grupo carboxilo C-terminal se protegió mediante la formación de su sal de sodio, excepto en el caso del tetrapéptido, en que no fue necesario a causa de la presencia de una arginina en su estructura.

Las reacciones de desprotección del grupo amino en los intermediarios obtenidos se efectuaron mediante hidrogenólisis (Pd/C, 5 %, a presión atmosférica, durante una hora).

El último paso de síntesis que condujo a la obtención del nonapéptido consistió en el acoplamiento del tetrapéptido y el pentapéptido mediante el método del éster activo, pero utilizando como agente activante del grupo carboxilo el N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboxiimida (Fluka).

De esta forma se obtuvo el nonapéptido progegido: Z-Ala-Leu-Leu-Asp-(OBut)-Pro-Arg-Val-Arg-Gly.

La remoción de los grupos protectores se llevó a cabo utilizando ácido bromhídrico.

La pureza del péptido obtenido se analizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), utilizando una columna Spherisorb C-18, 4,6 x 250 mm y un gradiente lineal de 10 a 50 % de acetonitrilo en un tampón de fosfato ácido de potasio 50 mM, a pH 3,0, durante 20 minutos.

La purificación del péptido se efectuó mediante HPLC preparativa utilizando una columna ODS y se aplicó un gradiente lineal del 20 al 50 % de metanol en tampón de trietilamina-ácido acético 20 mM, y pH 4,0, durante 30 minutos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Para la selección de la secuencia de amionoácidos conveniente, se utilizó el programa diseñado por S. Fraga (Fraga, 1982) que toma en cuenta la contribución a la hidrofilicidad de cada aminoácido y los factores de reconocimiento correspondientes a las interacciones entre aminoácidos individuales. Este cálculo suministró como región más interesante la zona entre los aminoácidos 130 y 138 de la región pre-S-2, cuya secuencia es ALA-LEU-LEU-ASP-PRO-ARG-VAL-ARG-GLY.

La síntesis de este péptido se acometió mediante las técnicas de unión por bloques en solución, la estrategia se detalla en la figura 1.

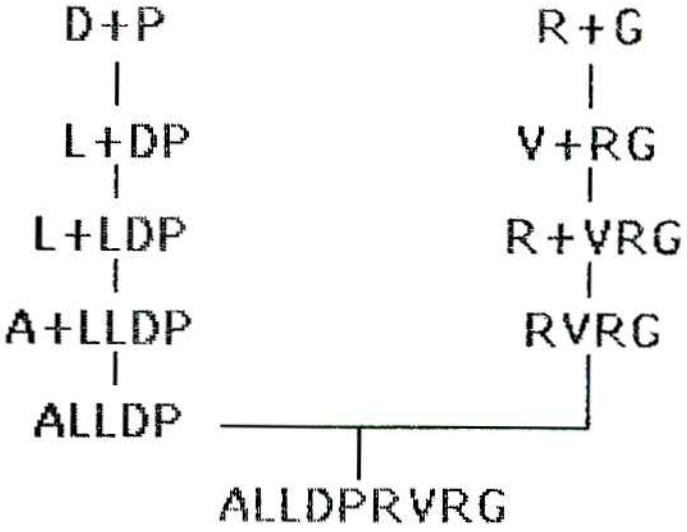

FIG. 1. Estrategia utilizada para la síntesis del péptido en solución.

En las reacciones intermedias para la síntesis del producto se obtuvieron buenos rendimientos, y en todos los casos el aislamiento de los productos intermediarios, así como su purificación, se llevó a cabo mediante la técnica de cristalización.

En la figura 2 se muestra el análisis llevado a cabo utilizando HPLC, donde aparece el producto final (tiempo de retención 17 min) y tres contaminantes.

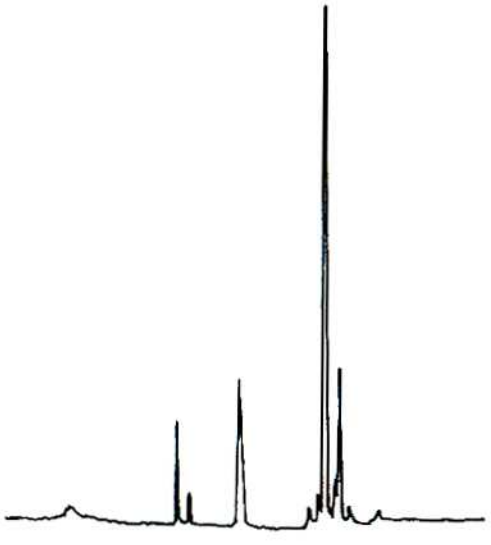

FIG. 2. HPLC analítico del nonapéptido antes de seguir los procedimientos de purificación.

Su purificación se efectuó utilizando esta misma vía. En la figura 3 se muestra el cromatograma analítico de la muestra después de purificada.

FIG. 3. HPLC analítico del producto final puro.

El análisis de aminoácidos del péptido aparece en la tabla 1, coincidiendo con la composición esperada.

Tabla 1

NONAPEPTIDO. COMPOSICION AMINOACIDICA

Aminoácido	*Valor teórico*	*Número de residuos*
D	1	0,52
T	-	-
S	-	-
E	-	-
G	1	0,96
A	1	0,86
Y	1	0,66
M	-	-
I	-	-
L	2	2
Y	-	-
F	-	-
H	-	-
K	-	-
R	2	1,80

El espectro de masa mediante la técnica de bombardeo atómico rápido (FAB-MS) confirmó el peso molecular del producto, identificándose el ión correspondiente a la relación M/Q 996.

Se efectuó la secuenciación manual del péptido hasta el sexto residuo. Los resultados concuerdan con la secuencia deseada.

Este péptido es utilizado para la obtención de un anticuerpo monoclonal dirigido al reconocimiento de la región pre-S del antígeno de superficie de HBV.

REFERENCIAS

NEURATH, A.R.; S.B.H. KENT y N. STRICK (1984). *Monoclonal antibodies to hepatitis B surface antigen (HBsAg) (S135-155) with unmodified Lysine (141).* Journal fo Virological Methods **9**: 341-346.

NEURATH, R.; S. KENT y N. STRICK (1984a). *Location and chemical synthesis of a Pre-S-gene coded immunodominant epitope of Hepatitis B virus.* Science **224**: 392-395.

FRAGA, S. (1982). *Theoretical prediction of protein antigenic determinants from aminoacid sequences.* Can. J. Chem. **60**: 2606-2610.