

R.10.396

T 811

**ESTUDIO DE LOS DETERMINANTES ANTIGENICOS
DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE DEL VIRUS DE LA
HEPATITIS B**

**Memoria presentada para
aspirar al Grado de Doctor
en Farmacia por Eloisa Guerrero Riscos**

Estudio de los determinantes antigénicos del antígeno
de superficie del virus de la hepatitis B

por


Eloisa Guerrero Riscos

Memoria presentada para aspirar
al Grado de Doctor en Farmacia.

Sevilla, Junio 1987

Fdo.: Eloisa Guerrero Riscos
Licenciada en Farmacia

El Catedrático Ponente



Fdo.: A. Relimpio Ferrer

El Director

Fdo.: Darrell L. Peterson

Indice de materias

Agradecimientos.....	I
Dedicatoria.....	III
Introducción.....	1
Objetivos.....	6
Revisión bibliográfica.....	8
Métodos.....	34
Resultados.....	49
Heterogeneidad del antígeno de superficie...	50
Sitios específicos de subtipo.....	70
Estudio de los lípidos del antígeno de superficie.....	87
Estructura del antígeno de superficie.....	111
Discusión.....	130
Conclusiones.....	142
Bibliografía.....	149

AGRADECIMIENTOS

En esta página me gustaría expresar mi agradecimiento a todos aquellos que me ayudaron a realizar esta tesis. Primeramente, tengo que mencionar la desinteresada ayuda del Dr. Relimpio en la presentación de este trabajo experimental. Igualmente agradezco la guía del Dr. Peterson y su grupo en el laboratorio. Muy especialmente tengo que reconocer la ayuda de mis amigos que aportaron sus conocimientos para hacer la lectura de la tesis más clara. Entre mis colaboradores se encuentran Jose, Maru, Claudio, Miguel, Angeles, Catheleen, etc.

Finalmente tengo que admitir que sin mi familia esta empresa doctoral no hubiese sido posible, su interés por mis estudios ha sido y es un estímulo muy importante. En este párrafo debo incluir a mi compañera de apartamento Dulce a la que agradezco su compañía y su incansable capacidad de crítica que me empuja a superarme o a aceptar con buen humor mis limitaciones.

DEDICATORIA

A Nicasio y Eloisa

INTRODUCCION

El primer brote inconfundible de hepatitis B viral (sérica) se registró en 1885 en relación con la administración de la vacuna de la viruela. Sin embargo, su carácter infeccioso no se demostró hasta 1942, mediante la transmisión experimental a voluntarios humanos utilizando aspirados duodenales o inyecciones de sangre procedente de pacientes que padecían hepatitis (1). En las dos décadas posteriores a la Segunda Guerra Mundial dos tipos de hepatitis vírica fueron definidos inmunológicamente, y se obtuvo información esencial sobre sus vías de transmisión, tiempos de incubación, duración de la viremia y liberación de los virus en pacientes con infección natural o provocada. No obstante, por aquellas fechas el único medio para identificar material infeccioso era la transmisión controlada a primates de susceptibilidad conocida.

El progreso científico en la investigación de la hepatitis B fue muy limitado hasta 1965 debido al desconocimiento del ciclo biológico del virus y a la falta de metodología apropiada para su estudio. Afortunadamente, en 1965, Blumberg, Alter and Visnich detectaron un nuevo antígeno que se encontraba tanto en el plasma de pacientes con leucemia o talasemia, como en el de individuos aparentemente sanos que vivían en regiones tropicales o subtropicales (1,2). Más tarde este antígeno se asoció con la hepatitis B, aunque se encontró en partículas que no contenían ácido nucleico y no se encontraron virus enteros en el suero de los individuos que portaban dichas partículas. Este nuevo antígeno se llamó el antígeno Australia. Poco después, el

virus de la hepatitis B (VHB) se identificó y caracterizó, sus determinantes serológicos fueron definidos y sus implicaciones biológicas reconocidas. En menos de diez años después de que esta información se obtuviese fue posible desarrollar una vacuna protectora y mejorar espectacularmente las técnicas de diagnóstico.

La profilaxis derivada de la vacunación contra el virus de la hepatitis B es de gran importancia clínica dados el carácter crónico de esta infección y su relación con el cancer de hígado. Sin embargo, la distribución actual de la vacuna es considerablemente limitada y , por tanto, no puede controlar eficazmente una enfermedad que infecta anualmente 200 millones de personas en todo el mundo (3). En orden a inmunizar aquellas comunidades en riesgo es necesario proporcionar una vacuna económicamente asequible e inocua para el individuo. La vacuna disponible actualmente incluye el antígeno de superficie del virus (AgHBs) aislado del plasma de portadores crónicos, utilizando métodos que se considera eliminan o inactivan agentes infecciosos (4) sin desnaturalizar el antígeno de superficie. El hecho de que el plasma sea la fuente de obtención del antígeno de superficie aumenta tremendamente su coste de producción y, además, puede ser responsable de la transmisión de agentes infecciosos indetectados presentes en el plasma del donante. Por lo tanto, es aconsejable encontrar nuevas fuentes de antígeno y desarrollar tecnologías que puedan producir una vacuna más conveniente. Para que una nueva vacuna pueda ser utilizada en todo el mundo deberá

ser además protectora contra todos los subtipos del virus de la hepatitis B, evitando así la reinfección (5).

La búsqueda de nuevas fuentes del antígeno de superficie de la hepatitis B está impedida por el restringido rango de especies susceptibles a la infección por el virus y por la falta de un sistema de cultivo celular apropiado para su propagación (6). Sin embargo, la síntesis de la proteína del antígeno de superficie ha sido posible en *E. coli*, levadura, células HeLa, fibroblastos de ratón, células del ovario de hamster, y en otras líneas celulares, gracias al clonaje del genoma vírico en estos sistemas (7-12). La inmunogenicidad protectora del antígeno de superficie producido en los sistemas citados está aún bajo estudio, aunque resultados recientes han demostrado su inocuidad y eficacia (13-15). No obstante, la producción industrial y comercialización de estos productos no ha alcanzado aún las metas deseables para su uso universal como vacuna contra la hepatitis, ya que el coste del material recombinante es similar al del antígeno aislado del plasma y su eficacia es comparable.

Aunque las especies proteicas más abundantes del antígeno de superficie se han aislado y caracterizado químicamente, la antigenicidad e inmunogenicidad de estas proteínas no están bien definidas. Por lo tanto, es muy importante estudiar los determinantes antigénicos en el virus de la hepatitis B, al objeto de seleccionar las proteínas más inmunogénicas. Estos estudios de antigenicidad no solo mejorarán la purificación de proteínas

antigénicas, sino también la síntesis de péptidos que puedan simular los determinantes antigénicos (15-22).

Entre las técnicas empleadas para definir la antigenicidad de una proteína vírica se encuentran los ensayos inmunogénicos con anticuerpos monoclonales y policlonales de afinidad específica. El uso de anticuerpos monoclonales puede hacer posible no solo el estudio de la participación de la secuencia primaria sino también de la importancia de la estructura secundaria en la antigenicidad. Aunque se han encontrado anticuerpos monoclonales que pueden unirse solo a un subtipo del virus de la hepatitis B (23), el estudio de todos y cada uno de los sitios implicados en la especificidad de subtipos no puede estar completo si no se utilizan anticuerpos policlonales específicos para un subtipo (APES). Los APES purificados en columna de afinidad pueden ser marcadores de aquellos sitios que no son compartidos por todos los subtipos, es decir, aquellos sitios que no serán reconocidos por el antisero obtenido contra otros subtipos. Por lo tanto los APES y los anticuerpos monoclonales contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B pueden complementarse en el estudio de la estructura de la proteína de dicho antígeno.

OBJETIVOS

Con esta tesis se ha intentado mejorar los conocimientos sobre la estructura del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, y sobre la relación entre estructura y actividad antigénica. En concreto, estos estudios se diseñaron para:

1.- Determinar si AgHBs es una población uniforme de partículas con determinantes antigénicos definidos.

2.- Identificar los sitios antigénicos específicos de subtipo, particularmente los responsables de los subtipos **d** e **y**, determinando su número y localización en la proteína.

3.- Examinar el papel de los lípidos del AgHBs en relación al mantenimiento de la estructura de la proteína y su actividad antigénica.

4.- Localizar los dominios estructurales de que se compone la partícula del antígeno de superficie.

REVISION BIBLIOGRAFICA

Virus de la familia Hepadnaviridae: virus de la hepatitis B

Los virus de la familia Hepadna (del inglés Hepatitis-DNA-virus), son un grupo de virus que infectan el hígado de ciertas especies de mamíferos y aves. Este grupo incluye: el virus de la hepatitis de marmota (VHM), el virus de la hepatitis B de pato de Pekín (VHBPP), el virus de la hepatitis de ardilla Beechey (VHAB) y el virus de la hepatitis B en humanos (VHB). Esencialmente todos ellos comparten una arquitectura similar. El virión tiene un nucleocápside icosaédrico de 27nm de diámetro rodeado por una cubierta de lipoproteína. Las cubiertas vacías de los virus que infectan las especies de mamíferos, tienen un diámetro de 22nm, tanto en las partículas esféricas como en las filamentosas, mientras que el virus que infecta el hígado de pato presenta un diámetro mayor oscila entre 35 y 60nm (24).

El genoma del virus es un ADN bicatenario circular. La cadena (-) tiene una longitud que varía entre 3200 a 3300 nucleótidos, dependiendo de la especie, mientras que la cadena (+) está incompleta. Los genomas de los virus Hepadna tiene una organización muy similar e incluyen códigos para una proteína estructural de superficie, una proteína estructural de la nucleocápside, una polimerasa de ADN y una proteína de función aún desconocida. El ADN vírico libre e intermediarios de la replicación se encuentran en los hepatocitos infectados por cualquiera de los cuatro virus, pero solamente el virus de la hepatitis B en humanos y el que infecta a la marmota se han

encontrado integrados en el genoma del huésped (25,26). Finalmente, debido a su transcripción inversa durante la replicación, los virus Hepadna pueden considerarse como una nueva clase de retrovirus. De la misma manera que casi todos los retrovirus conocidos están relacionados con infecciones víricas crónicas y oncogénesis, el virus de la hepatitis B y el virus de la hepatitis en marmotas están relacionados con la enfermedad crónica del hígado y carcinoma hepático (27).

Biología molecular del virus de la hepatitis

En el suero de pacientes infectados con el virus de la hepatitis B se encuentran, en proporciones variables, tres entidades morfológicas (28). Las formas más numerosas (en concentraciones de hasta 10^{12} partículas por ml) son pequeñas estructuras esféricas, con un diámetro de 22nm, conocidas en el pasado como antígeno Australia. Estas partículas poseen principalmente antígenos de la superficie del virus (AgHBs), carecen de ácidos nucleicos y se consideran partículas subvirales incompletas. También se han observado formas tubulares o filamentosas de 22nm de diámetro, correspondientes a agregados del antígeno de superficie. El virus B propiamente dicho es una partícula compleja de doble cubierta y un diámetro de 42nm. Dicha estructura, conocida como partícula Dane, posee un núcleo central (denominado "core" en inglés) de 27nm de diámetro que contiene el genoma vírico, rodeado de una cubierta lipoproteica de 7nm de espesor (29,30).

El antígeno de superficie ha sido el más estudiado de todos los componentes de las partículas víricas. No obstante su caracterización ha llevado a resultados diferentes en los distintos laboratorios que lo estudiaron. De ahí que no haya acuerdo con respecto a su composición y a sus propiedades físicas (31). Aunque las técnicas utilizadas pueden ser responsables de estas diferencias, es muy posible que la propia variación de las partículas víricas pueda contribuir en gran manera a esta discordancia. El peso molecular de las partículas de AgHBs oscila entre 2,5 a 3,5 x 10⁶ daltons , conteniendo 40-70% de proteínas, 4-7% de carbohidratos y hasta 30% de lípidos. Diferentes análisis han revelado que todas las preparaciones del AgHBs comparten una especificidad antigénica común , designada a. Existen además dos grupos de determinantes antigénicos que son mutuamente excluyentes, d o y y w o r. Esto da lugar a cuatro subtipos víricos principales, clasificados por su antígeno de superficie: adw, ayw, adr y ayr (32).

La nucleocápside del VHB posee propiedades antigénicas de las que es responsable el polipéptido codificado en la región C del genoma vírico (AgHBc). Este polipéptido tiene un peso molecular de, aproximadamente, 19.000 daltons y deriva de un precursor de mayor longitud que es procesado en su extremo carboxílico. En la secuencia del antígeno core se encuentra un nonapéptido altamente hidrofóbico y que podría ser el punto de anclaje para el nucleocápside en la capa lipídica (33). Al mismo tiempo la región próxima al extremo carboxílico es rica en aminoácidos básicos que presumiblemente interaccionarían con el

ADN dentro del core (34). Esta proteína está altamente conservada entre los distintos subtipos de virus clasificados según su antígeno de superficie (6% de variación) (35), y es posible que los cambios observados en el core se relacionen con los del AgHBs.

Un tercer antígeno asociado con VHB es el AgHBe. Este antígeno tiene una naturaleza enteramente proteica y se denomina a veces como el antígeno soluble. Hasta ahora se ha utilizado por su alto poder diagnóstico en la detección de plasmas infecciosos. Se obtiene al desnaturalizar el nucleocápside y se han encontrado al menos tres subtipos distintos. Su peso molecular es 15.500 daltons, aunque a veces se ha detectado actividad AgHBe en compuesto de más alto peso molecular, quizás como consecuencia de su asociación a inmunoglobulinas. Aunque se desconoce su función en el ciclo vital del virus, se cree que puede estar relacionado con la replicación del ADN vírico, por lo que puede tener un papel importante en el control de la infectividad vírica. Tras secuenciar el extremo carboxílico del AgHBe se ha sugerido que deriva del polipéptido de 19.000 daltons presente en el AgHBc tras proteólisis de su extremo amino (36).

El mecanismo de replicación del virus se ha estudiado muy poco debido a la imposibilidad de multiplicarlo en cultivos celulares. Se cree que una vez que el virus penetra en la célula y pierde su envoltura lipoproteica, el nucleocápside entra en el núcleo donde la ADN polimerasa repara la cadena incompleta del ADN vírico. A continuación se integra en el

cromosoma celular, y se replica usando enzimas de la célula huésped, desintegrándose luego para ser recircularizado y empaquetado en nucleocápsides de nueva síntesis. En efecto, existen numerosas evidencias que indican que tanto el VHB como otros hepadnavirus de animales son capaces de integrarse en el ADN cromosómico de la célula huésped en casos de hepatitis crónica (37,38). Estudiando las secuencias de una línea celular derivada de un carcinoma hepático primario (PLC\PRF\5, "células Alexander") (39,40), se puede proponer un modelo de integración en el cual la ADN polimerasa celular comienza a copiar el ADN vírico en la región de cadena sencilla; luego, mediante un fenómeno de recombinación la cadena larga se uniría con la cadena de ADN celular que antes sirvió de molde. Por otra parte, aunque el VHB se ha clasificado como virus de cadena doble, recientemente se ha demostrado que se puede replicar mediante la transcripción inversa de un ARN intermedio. Esta última observación está apoyada por el hecho de que la polimerasa vírica comparte la secuencia de transcriptasas inversas de retrovirus, y gran parte del genoma del VHB es homólogo al de los retrovirus del tipo C. Un análisis más detallado de estas similitudes ha llevado a pensar que el VHB y los retrovirus tienen un origen de evolución común, surgiendo VHB tras un proceso de delección del genoma primario de retrovirus, o similar predecesor (40).

Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B

En el suero de pacientes infectados por el virus de la hepatitis B, existen partículas esféricas y tubulares de distintos tamaños, que forman agregados mixtos cuando reaccionan con antisuero en contra del virus de la hepatitis B, indicando que todas ellas comparten antígenos de superficie comunes. Imágenes del plasma infectado, obtenidas mediante microscopía electrónica, sugieren que las grandes partículas esféricas de 42nm de diámetro representan el virus completo de la hepatitis B, mientras que las partículas esféricas y tubulares de 22nm de diámetro son formas del antígeno, no infecciosas, que no contienen ácidos nucleicos, y que proceden de un exceso de proteína vírica cápsular (42).

Se ha aislado y purificado el antígeno de superficie de plasma infectado haciendo uso de diversas variantes de dos procedimientos básicos: ultracentrifugación y cromatografía. Independientemente del método de purificación, las partículas purificadas tienen las mismas propiedades físicas y bioquímicas (43).

Proteínas víricas presentes en AgHBs

Después de caracterizar las partículas del antígeno de superficie y el genoma del virus de la hepatitis B, se pudo concluir que dicho virus sintetiza fundamentalmente una proteína capsular. Dicha proteína capsular está codificada en la región del genoma denominada S y contiene 226 aminoácidos, pudiendo existir en forma glicosilada (GP-30) y no-glicosilada (P-25). La secuencia de esta proteína dentro de los subtipos más

comunes del virus de la hepatitis B está altamente conservada, encontrándose solo un 10% de variación en las distintas regiones S (44).

La región precedente a la S se denomina pre-S y posee dos codones de iniciación (AUG) en secuencia lineal con el codón de iniciación de la proteína S, según el codón que se exprese se pueden codificar dos polipéptidos de 55 y 163 aminoácidos que unidos a la proteína S dan lugar a proteínas capsulares de alto peso molecular. El primer codón cercano a la región S sintetiza la proteína pre-S₂, que puede estar glicosilada y contiene un receptor de polialbumina. Los pesos moleculares de estas proteínas varían de 31.000 a 36.000 daltons, y aunque su peso se conserva en los distintos subtipos su secuencia varía el doble que en la región S. El segundo codón de iniciación da lugar a la proteína pre-S₁, que al igual que la pre-S₂ puede estar o no glicosilada y cuyo peso molecular oscila de 39.000 a 42.000 daltons. El gran tamaño de las proteínas pre-S podría impedir su secreción celular in vivo, tal como se ha descrito en cultivos celulares (45,46). La dificultad de secreción de estas partículas conteniendo los péptidos pre-S puede ser la causa por la que su concentración en plasma es considerablemente inferior a la de partículas con alta concentración en proteína S (47). Hasta 1982 (ver Gerlich) estas proteínas han sido prácticamente desconocidas, no solamente debido a su baja concentración en plasma, sino también a su destrucción debida a las técnicas proteolíticas empleadas en la purificación de AgHBs.

Lípidos contenidos en la lipoproteína capsular

Casi un 30% del peso molecular del AgHBs son lípidos procedentes de la membrana plasmática del hepatocito (48), lo que contribuye a la baja densidad de estas partículas tal y como se comprueba en los gradientes de equilibrio. Los primeros estudios de estos lípidos se realizaron con el objeto de obtener información para la producción de vacunas sintéticas, ya que se había sugerido anteriormente la importancia de estos componentes en la antigenicidad de AgHBs (49). Análisis de los tipos de lípidos en AgHBs demostraron la presencia de fosfolípidos (67%), colesterol libre (15%) y esterificado (14%), y además un 3% de triglicéridos. Un 90% del peso de los fosfolípidos es fosfatidilcolina; y el resto está compuesto de fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, esfingomiélin y otros componentes menores (48). Tras estudiar los lípidos procedentes de distintos portadores y a distintas etapas, se llegó a la conclusión de que la composición lípidica debe ser constante y uniforme.

Glicosilación de AgHBs

Los oligosacáridos son una parte integral en las proteínas de la superficie de virus y células eucarióticas. Su función se desconoce, aunque puede ser que jueguen un papel importante en el reconocimiento celular, ya sea entre células o con la matriz extracelular (50). En el caso de los retrovirus, el interés se ha centrado en las glicoproteínas de la cápsula, que pueden contener múltiples cadenas laterales de oligosacáridos, y cuya

función pudiera ser la identificación de la célula huésped, determinando de esta forma las células a infectar (51). Es probable que los carbohidratos protejan a los retrovirus del sistema inmune del huésped en la infección vírica primaria, según se concluye de estudios recientes realizados sobre la glicoproteína del virus de la leucemia de Rauschner (52).

Los residuos glicosílicos del AgHBs se han caracterizado con el fin de determinar su función biológica, así como la relación entre la proteína S y su forma glicosilada. Mediante análisis por cromatografía de gases se ha estimado que el componente más abundante es N-acetilglucosamina, aunque también en menor concentración se encuentran residuos de manosa, galactosa y ácido siálico. Como componentes en trazas se pueden detectar fucosa y glucosa (53,54). La caracterización antigénica de la proteína glicosilada es difícil, ya que las endoglicosidasas más comunmente empleadas en estudios de carbohidratos no afectan al enlace de nitrógeno que une el carbohidrato al residuo de asparragina. A pesar de ello la glicosilación del AgHBs se ha podido estudiar recientemente en partículas sintetizadas en cultivos celulares. Si se añade tunicamicina al medio de cultivo se inhibe el paso de partículas antigénicas a través del aparato de Golgi y, de este modo, los antígenos que se sintetizan estarán libres de carbohidratos. Mediante experimentos de este tipo se ha estudiado la relación que pudiera existir entre la glicosilación y los receptores de polialbumina, observándose que dichos receptores aumentan su capacidad de unión en las proteínas no glicosiladas. Todo ello

sugiere que la glicosilación pudiera regular la actividad de dichos receptores (25). Finalmente, se ha observado que la presencia de ácido siálico alarga la vida media de la proteína antigénica. Este fenómeno, detectado ya en otros casos, parece ser debido a que las asialoproteínas en plasma provocan una mayor respuesta inmune, lo que hace que su eliminación sea más rápida.

Propiedades físicas del AgHBs

La asociación de componentes del suero con las partículas de AgHBs ha obstaculizado la caracterización precisa del antígeno, y solo se ha llegado a un acuerdo parcial sobre las propiedades físico-químicas del mismo. Básicamente las partículas antigénicas presentan gran resistencia a la desnaturalización química, o enzimática, sugiriendo una estructura física muy compacta y una estructura antigénica estable. Poseen una termoestabilidad elevada y conservan su morfología incluso después de ser incubadas a 100°C durante 18 horas (55). Son altamente hidrofóbicas y no se desnaturalizan en presencia de altas concentraciones de sales, ni por cambios drásticos de pH, siendo aún estables a pH ácido por encima de 2 y básico por debajo de 9. Tras el tratamiento con agentes reductores, el antígeno conserva su conformación tal y como se observa mediante dicroísmo circular (56), sin embargo, pierde su capacidad de unión a los anticuerpos neutralizantes. De ahí que se crea en la existencia de una estructura secundaria o terciaria esencial para la conservación de sus determinantes

antigénicos, por lo que muchos de ellos se podrían considerar conformacionales, tanto a nivel de grupo como de subtipo (57,58,59). La modificación química de distintos aminoácidos en el antígeno de superficie, así como su fragmentación por métodos químicos o físicos se ha llevado a cabo en un intento de identificar sus determinantes, especialmente con el fin de poder sintetizarlos y utilizar péptidos sintéticos como vacuna. De igual forma, el antígeno se ha solubilizado con el fin de purificar sus polipéptidos y administrarlos para provocar la respuesta inmune. Los detergentes que más se emplean en estos estudios son no iónicos, principalmente triton X-100 y octilglucósido, ya que no suelen afectar a la proteína y así conservan su antigenicidad (60). Mediante estos tratamientos y utilizando geles de poliacrilamida en ausencia de agentes reductores, se ha observado la existencia de formas diméricas de la proteína antigénica (61).

Determinantes antigénicos del AgHBs

Tradicionalmente el antisuero de humanos infectados con el virus de la hepatitis B se clasifica de acuerdo con su similitud a un patrón previamente establecido de plasmas infectados. De esta manera los determinantes compartidos por todos los antígenos de superficie se han denominado **a**, y son considerados determinantes de grupo. Otros determinantes, tales como **d\y** o **w\r** se refieren a determinantes de subtipo (62). La combinación de determinantes de subtipo, como ya se ha mencionado anteriormente, origina cuatro fenotipos antigénicos básicos,

denominados adw, ayw, adr y ayr; sin embargo actualmente se han identificado nuevas variedades lo que ha dado lugar a una nueva clasificación de acuerdo con el Instituto Nacional para la Alergia y las Enfermedades Infecciosas de Estados Unidos, que reconoce diez subtipos de referencia. Los subtipos de referencia presumiblemente reflejan variaciones en la estructura de la proteína del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, si bien la base estructural de estas diferencias se ha empezando a comprender sólo recientemente.

Determinantes antigénicos del grupo a

La complejidad del AgHBs puede apreciarse en su heterogeneidad serológica. El determinante común a se puede subdividir según especificidades: a₁, a₂ y a₃, encontradas en sueros de distintos pacientes (63). La dependencia conformacional del determinante a aumenta la dificultad de su estudio. Por ello se ha intentado caracterizarlo mediante anticuerpos policlonales obtenidos en animales experimentales, tras la inmunización con péptidos que simulan secuencias antigénicas de supuesta implicación con dicho determinante (que como ya se ha dicho es común a todos los subtipos del virus). Aunque existen dos regiones hidrofílicas (que se preveen) en el exterior de la proteína antigénica (32-80 y 110-179), solo la secuencia primaria 110-160 es capaz de fragmentarse en péptidos inmunogénicos. Cuando la especificidad de estos anticuerpos antipéptidos se estudió en inmunoensayos con anticuerpos monoclonales que reconocen AgHBs, se pudo comprobar que la

denominación **a** comprende más de un determinante y su antigenicidad puede variar en distintos subtipos, aunque todos ellos pueden reconocer los mismos epítomos (64). Estos sitios agrupados como **a** parecían extenderse en la región hidrofílica anteriormente mencionada, y solo uno de ellos pudo unirse al antígeno desnaturalizado.

Determinantes de subtipo **d** y **y**

La modificación química del AgHBs ha revelado la existencia de determinantes antigénicos exclusivos de ciertos subtipos. Tras la metilación reductora de la lisina 122 presente en el subtipo **d**, el antígeno pierde antigenicidad frente a un anticuerpo monoclonal específico de ese subtipo. Sin embargo, si se modifica la arginina presente en el subtipo **y**, la antigenicidad, medida con el anticuerpo monoclonal específico, no varía. Comparando las secuencias genómicas de antígenos de ambos subtipos se ha observado que las diferencias en aminoácidos suponen aproximadamente un 10% de la proteína total, encontrándose más variación en las regiones hidrofílicas que en las hidrofóbicas. Algunos autores sugieren la existencia de diferentes perfiles de polipéptidos presentes en cada subtipo (65,66,67,68), mientras otros han encontrado polipéptidos similares (69,70,71). La base estructural de las distintas especificidades inmunológicas subtípicas es aún desconocida, aunque su estudio puede aportar una información importante en el diseño de vacunas con carácter universal.

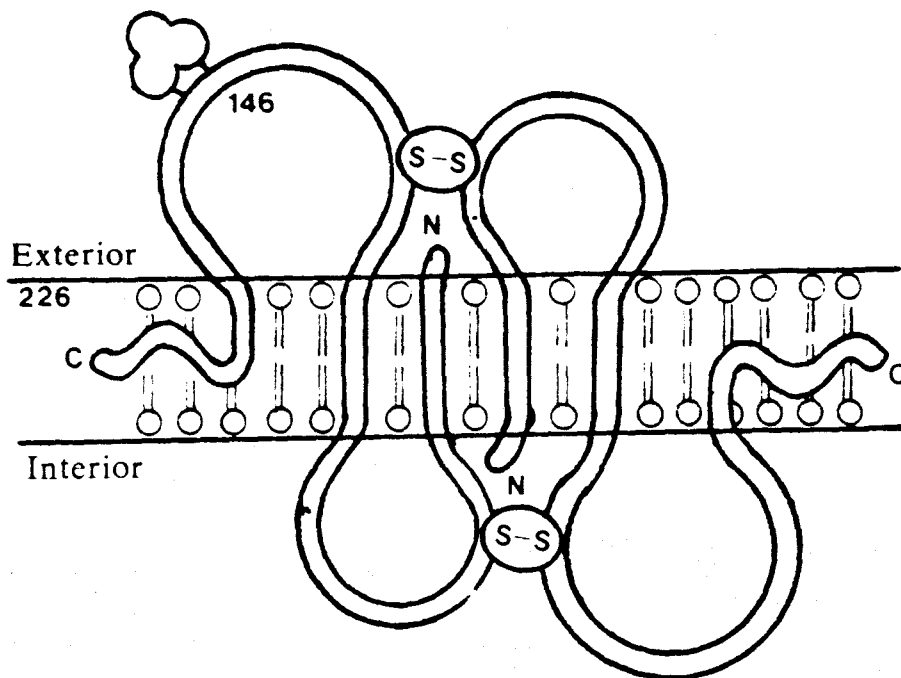
Disposición de las proteínas en la capa lipídica del AgHBs

El estudio de la estructura del AgHBs ha estado limitado por la imposibilidad de utilizar técnicas de cristalografía de rayos X. Por lo tanto, solamente han podido utilizarse métodos predictivos y evidencias experimentales menos directas para caracterizar su estructura. No obstante, se ha propuesto un modelo detallado que representa la integración de la proteína en la bicapa lipídica y la asociación de los polipéptidos en las partículas antigénicas (figura 1) (35). El modelo predice la estructura secundaria basándose en la primaria, es decir, en la naturaleza y situación de cada aminoácido, aunque también considera algunas características físicas. De acuerdo con dicho modelo las proteínas denominadas P-25 y GP-30 tienen tres áreas hidrofóbicas localizadas dentro de la matriz lipídica (aminoácidos: 7-23, 80-98, y 169-226); y dos regiones hidrofílicas (aminoácidos: 1-6 y 99-168), con distinta localización en P-25 y GP-30. Mientras los residuos 99-168 están expuestos en GP-30, en P-25 se encuentran en el interior de la partícula vírica; por esto la glicosilación de GP-30 en el residuo 146 sería posible, mientras que este mismo residuo en P-25 no estaría accesible para la glicosilación. Si la proteína está plegada de esta forma se pueden formar dos puentes disulfuro entre GP-30 y P-25 y por tanto el modelo asume que la unidad morfológica del antígeno de superficie es un dímero.

Este modelo que predice la unidad de la estructura como un dímero de P-25 y GP-30 (35) muestra discrepancias muy claras con evidencias experimentales. En primer lugar, la razón

Figura 1. Modelo de la disposición de proteínas del AgHBs propuesto por Tiollais y Wain-Hobson (35). En esta figura están representados dos monómeros de proteína, P-25 y GP-30, formando un dímero cuyos extremos carboxílicos están en el interior de la capa lipídica de la envoltura vírica. Por el contrario los extremos aminos no están situados en la matriz pero tampoco son fácilmente accesibles desde el exterior. Los monómeros se encuentran unidos por dos puentes disulfuro, uno en el interior y otro en el exterior de la partícula antigénica. La región hidrofílica de GP-30 que contiene la Asn 146 está expuesta al exterior mientras que esta misma región en P-25 se encuentra en el interior.

Residuo Glucosídico



molar de estos componentes, tal como se estima en geles de poliacrilamida con SDS, raramente es 1:1 (72). En segundo lugar, la digestión con tripsina parece cortar ambas, proteína y glicoproteína, en el mismo residuo, que, sin embargo, no se encuentra igualmente expuesto en el modelo (72). En tercer lugar, las partículas del antígeno de superficie visualizadas mediante dispersión de rayos X a bajo ángulo, muestran un reducido número de subunidades morfológicas (30). Más aún, según este modelo un 50% de la proteína estaría proyectada hacia el exterior de la capa lipídica. Sin embargo, el valor estimado, mediante los estudios de rayos X antes mencionados, se acerca al 75% (30).

Con respecto a las subunidades que pudieran existir en la envuelta vírica no hay información precisa. Utilizando los datos cristalográficos disponibles no es posible clasificar al virus en ningún grupo de simetría conocido. La simetría icosaédrica encontrada en muchos casos puede descartarse en esta situación teniendo en cuenta el posible número de monómeros, estimado en base a los pesos moleculares de las proteínas y las partículas. Quizás, la heterogeneidad en la estructura de las muestras estudiadas pueda ser responsable de esta discrepancia con respecto a los grupos de simetría conocidos. A pesar de esto los ejes de simetría binarios y ternarios observados (62) sugieren una distribución simétrica no esférica de la proteína, que recuerda la simetría cúbica propuesta para la lipoproteína de baja densidad del suero (73).

Interacción de la proteína y los lípidos en el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.

La disposición propuesta de la proteína en el modelo dimérico muestra dos regiones hidrofílicas intercaladas entre tres segmentos hidrofóbicos (74). Así mismo el modelo predice que los dos primeros segmentos hidrofóbicos atraviesan la membrana, mientras que los hidrofílicos estarían más expuestos, conteniendo así la mayoría, o todos, los determinantes antigénicos del antígeno de superficie, incluyendo los sitios responsables de la especificidad de subtipo. El dímero está formado de dos monómeros de la proteína del antígeno de superficie codificados por el gen S. Uno de ellos está glicosilado en el residuo 146, y ambos están estabilizados en el dímero por puentes disulfuro intermoleculares.

Se ha propuesto que la estructura secundaria de la proteína en el dímero es, fundamentalmente, estructura beta plegada, con una baja proporción de alfa hélice. Además, se han realizado estudios con distintas endo y exopeptidasas que han revelado las regiones externas susceptibles a la proteólisis. Sin embargo, los distintos grupos de investigación discrepan en cuanto a los polipéptidos obtenidos después de la digestión enzimática (28,43,75). Por ello, aún existe controversia en cuanto a las regiones incluídas en la capa lipídica. Al existir tres regiones altamente hidrofóbicas cualquiera de ellas podría estar interaccionando con los lípidos, y ser responsable de la estructura secundaria ordenada que se observa en el espectro de dicroísmo circular y dispersión óptica rotatoria.

Estudios con anticuerpos monoclonales

El uso de anticuerpos monoclonales puede ayudar a localizar los determinantes antigénicos en el antígeno de superficie, ya que se unen a un único epítipo. Como resultado de estos estudios, se ha demostrado que el antígeno de superficie es más heterogéneo de lo que se había creído previamente (76). Distintos determinantes podrían residir en un dominio común a todos los subtipos, aunque habría diferencias cualitativas y cuantitativas en la densidad de los epítipos de los distintos subgrupos (76). Anticuerpos monoclonales se han utilizado también para identificar determinantes específicos de subtipo, lo que podría conducir al descubrimiento de las diferencias estructurales entre los distintos subtipos; por ejemplo, se han encontrado anticuerpos monoclonales que solo reaccionan con antígenos del subtipo **d** o **y** (64). Algunos estudios clínicos han mostrado ya las ventajas del uso de anticuerpos monoclonales en diagnosis, así como en el control de la inmunización contra el virus de la hepatitis B (77). Más aun, estudios inmunoquímicos con anticuerpos monoclonales han posibilitado la definición de regiones inmunogénicas más relacionadas con la protección a la infección, y el estudio del efecto de modificaciones químicas sobre la antigenicidad (72). Algunos de los descubrimientos más importantes en este tipo de estudios incluyen: la heterogeneidad de los determinantes del grupo **a** (23), la diferente localización de los determinantes del subtipo **d** y **y** (23) y la demostración de la heterogeneidad de partículas del antígeno de superficie

del mismo tipo (76). Aunque los anticuerpos monoclonales han sido muy útiles, algunos autores han advertido acerca de la posible sobreestimación de la inmunogenicidad de algunos determinantes antigénicos, debido a una mayor afinidad del anticuerpo monoclonal en comparación con el antisuero policlonal.

Estudios con anticuerpos policlonales específicos de subtipos

Los anticuerpos policlonales específicos también pueden usarse en estudios estructurales de la proteína antigénica. En algunos casos presentan ventajas sobre los monoclonales debido a su más alta capacidad de unión a la proteína antigénica dada la diversidad de sitios cubiertos por los anticuerpos de origen policlonal. Sorprendentemente, no se utilizan tanto como podría esperarse, incluso aunque su valor diagnóstico se haya reconocido (5,78).

Vacunas sintéticas del antígeno de superficie: polipéptidicas y oligopéptidicas

La utilización en vacunas de antígenos caracterizados químicamente es ventajoso ya que la respuesta inmune es más fácilmente predecible y no contiene agentes nocivos desconocidos (79). Los polipéptidos inmunogénicos se han aislado ya del antígeno de superficie, pero su uso como vacuna está limitado por su reducida solubilidad y su relativamente baja inmunogenicidad. Distintos detergentes se han utilizado en la formación de micelas antigénicas no desnaturalizadas, siendo los

no iónicos los más convenientes (79). Algunos autores sostienen que han solubilizado dímeros de polipéptidos altamente inmunogénicos procedentes de partículas de 22nm de diámetro. Los polipéptidos en los dímeros se consideraron unidos por puentes disulfuro entre los monómeros de P-25 y GP-30 (61,79). Aparentemente, los anticuerpos producidos contra estos polipéptidos son protectores, e incluyen anticuerpos del grupo a de determinantes. No obstante, para poder aceptarse como vacuna, la estabilidad de estas micelas polipépticas tendría que ser igual o mejor que la de las partículas de 22nm, y al mismo tiempo deberían inducir una producción similar de anticuerpos protectores. Muchos investigadores han intentado digerir la proteína en fragmentos antigénicos, sin embargo el rendimiento de estos fragmentos es pobre y el complicado proceso de purificación haría desventajosa la vacuna desde un punto de vista económico. Además, estos polipéptidos no han sido completamente caracterizados. Al mismo tiempo, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos del AgHBs que contiene epítomos responsables de la producción de anticuerpos ha servido para sintetizar vacunas oligopeptídicas. Los péptidos utilizados suelen ser de 8 a 18 aminoácidos, son lineales o cíclicos, están conjugados con haptenos y administrados con adyuvantes para provocar la respuesta inmune. La producción de anticuerpos anti-AgHBs en animales experimentales ha sido posible tras la inoculación con preparaciones peptídicas del AgHBs, aunque no se ha confirmado su eficacia en la neutralización del virus. No obstante se puede predecir una

respuesta neutralizante del virus ya que estos anticuerpos son de características similares a los detectados en el suero de pacientes que se recuperaron tras la infección de VHB (80). Podría concluirse que los experimentos citados anteriormente proporcionan datos importantes para la comprensión de los determinantes antigénicos en el antígeno de superficie, así como en la comprensión de la interacción entre proteínas, lípidos y carbohidratos; proporcionando, por tanto, información básica esencial para la obtención de una nueva vacuna.

METODOS

TECNICAS PREPARATIVAS

Aislamiento del AgsHB del plasma humano.

AgsHB de los subtipos adw y ayw se aislaron del plasma de portadores crónicos, y se purificaron siguiendo métodos descritos previamente (43). Básicamente la purificación del antígeno consistió en una primera ultracentrifugación del plasma en la que se sedimentaron las partículas antigénicas, seguidas de dos gradientes de equilibrio en BrK y en CsCl. La preparación de esta muestra incluye una digestión con pepsina a pH ácido. La densidad del AgHBs de 1,21 g/ml se consideró como criterio para separar el antígeno del resto de las proteínas plasmáticas.

Subfraccionamiento del AgsHB purificado en HPLC.

El AgsHB se purificó del plasma humano y se estimó que su concentración de proteína vírica era de 5 mg/ml. 1,5 ml de esta muestra antigénica se inyectaron en una columna de HPLC (75 x 7,5 mm) de intercambio iónico (TSK-DEAE 5PW). La muestra se eluyó usando un gradiente de 10 mM de Tris-ClH pH 7 (solución A) a 600 mM Tris-ClH pH 7 (solución B). Las fracciones recogidas correspondieron a los picos de absorbancia a 280 nm.

Purificación de anticuerpos APES: Unión de AgsHB a Sepharosa 4B.

Para preparar una columna de afinidad de 5 ml de AgsHB, se hidrataron 1.5 g de Sepharosa 4B activada con cianuro en 10 ml de ClH 1mM durante 15 minutos, luego se filtraron a través de un filtro de vidrio escinterado de gran porosidad. El gel se lavó con 290 ml de un ClH 1mM adicionales, y también con 7.5 ml del buffer de unión (0,15 M CO_3HNa , 0,5 M ClNa pH 8,3). Tras resuspender el gel en 4 ml de este último buffer, se transfirió a un tubo cónico de centrifugación donde se mezcló con AgsHB disuelto en una solución de buffer de acoplamiento (aproximadamente 10 mg de antígeno en una solución de 12ml), se obtuvo así una proporción de gel:solución antigénica de 1:2. Esta suspensión se agitó (de un extremo a otro) durante dos horas a temperatura ambiente. Después del período de agitación la capa superior de buffer se extrajo, y en ella se determinó la concentración de antígeno para calcular la eficiencia de acoplamiento de éste a la Sepharosa. El gel se lavó una vez más con el buffer de unión (aproximadamente 20 ml), a continuación se lavó con glicina 0,2 M y finalmente se resuspendió en unos 20 ml de glicina 0,2 M. Esta suspensión se agitó (de un extremo a otro) durante otras dos horas a temperatura ambiente. Seguidamente, el gel se lavó alternativamente con 20ml de buffer de acoplamiento y 20ml de un buffer de acetato (acetato sódico 0,1M, ClNa 0,5M, pH 4). Se realizaron cinco lavados sucesivos de esta forma, terminando con el lavado de buffer de acoplamiento. Antes de empaquetar

la columna el gel se lavó con BSF (buffer salino de fosfato, fosfato sódico 10mM, ClNa 150mM, pH 7,5). Una vez empaquetada la columna , el gel se lavó con 50 ml de BSF, seguidos de 15ml de glicina 0,1 pH 2,3 y 250 ml de BSF. Todos las fracciones recogidas de estos lavados se ensayaron para detectar el AgsHB presente. El total de la proteína procedente de estos eluados se determinó por su densidad óptica, y la eficiencia de acoplamiento al gel se calculó substrayendo la proteína presente en las fracciones de la contenida en la solución de partida que se mezcló con el gel.

Elución de los anticuerpos policlonales específicos de subtipo utilizando una columna de afinidad conteniendo AgsHB.

Se aplicaron Antisueros de conejos contra el antígeno adw o ayw a una columna de afinidad a la cual se había unido previamente el antígeno del otro subtipo. El volumen aplicado era igual o menor que la mitad del volumen total de la columna. La muestra sérica se dejó incubar con el gel de la columna durante 30 minutos y luego se eluyó con BSF. Las fracciones conteniendo mayor contenido de proteína se recogieron y sometieron de nuevo al proceso cromatográfico una vez que la columna había sido tratada con 5 volúmenes de glicina 0,1M conteniendo ClNa 0,15M a pH 2,3 y reequilibrada con aproximadamente 50 volúmenes de BSF.

Gradientes de densidad en cloruro de cesio

Los gradientes de densidad se prepararon mezclando gradualmente dos soluciones de cloruro de cesio con una concentración de 1,10 y 1,45 g/ml. Los gradientes lineales tenían un volumen de 10 ml y la muestra que se aplicó sobre el gradiente tenía un volumen de 0,5-0,7 ml. Los tubos conteniendo el gradiente se colocaron en un rotor SW41 y se centrifugaron en una ultracentrífuga Beckmann L5 75 a 35K rpm, durante 4 horas a temperatura ambiente. Se recogió la parte superior del gradiente utilizando un aparato Densi-Flow de Buchler.

Ultracentrifugación analítica

El antígeno adw se concentró a 2 mg/ml y se incubó aproximadamente 16 horas a 37°C en 2% SDS. Se añadió a la muestra 2-mercaptoetanol en una proporción 0,1% obteniéndose así un entorno reductor. La ultracentrifugación se llevó a cabo en una ultracentrífuga analítica Beckmann modelo E con equipo óptico Schlieren, a una velocidad de 40K rpm, y las fotografías se tomaron cada 5 minutos con una exposición de 3 segundos.

ESPECTROS DE DICROISMO CIRCULAR (DC) Y ULTRAVIOLETA (UV)

DC espectropolarímetro.

Los espectros de DC se obtuvieron en un espectropolarímetro JASCO J-500 conectado con un modelo DP-500N para procesar los datos. Las medidas se hicieron usando una célula de un recorrido óptico de 1 mm con una velocidad de barrido de 5nm\min y una constante de tiempo de 2 segundos. Los espectros recogidos son la media de más de dos barridos. Los datos se analizaron a intervalos de 1nm entre 185 y 250 nm. El contenido de alfa hélice se estimó usando como patrón de referencia datos derivados del espectro DC de proteínas con una estructura cristalográfica conocida (81).

Espectro de absorción ultravioleta

Las muestras usadas para espectros DC se colocaron en una cubeta ultravioleta de cuarzo y su espectro ultravioleta se registró en un rango de 350 a 240 nm. Los espectros se hicieron con un espectrofotómetro Cary 210.

INMUNOENSAYOS

Radioinmunoensayos de inhibición con anticuerpos monoclonales anti-AgsHB

La actividad antigénica de las fracciones AgsHB se determinó en un experimento de inhibición por anticuerpos basado en un ensayo descrito previamente (78). Las muestras antigénicas se prepararon en plasma humano recalcificado (PHR) en un rango de diluciones de acuerdo con el título de las soluciones ensayadas. Se diluyeron anticuerpos monoclonales anti-AgsHB en PHR a concentraciones que se encontraban dentro de la porción lineal del ensayo AUSAB (Laboratorios Abbott), y luego se añadieron a cada dilución del antígeno, así como al control sin antígeno, y se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. Las mezclas incubadas se ensayaron para detectar anticuerpos monoclonales anti-AgHBs libres usando radioinmunoensayo AUSAB. Todos los ensayos se hicieron por duplicado.

Caracterización de anticuerpos policlonales específicos de subtipo (APES) con el panel de AgHBs del Instituto Nacional de Alergia y enfermedades infecciosas (INAEI)

La especificidad de subtipo AgHBs en las soluciones de los APES se determinó mediante ensayos de inhibición de anticuerpos (AUSAB) usando un panel AgHBs (procedentes del INAEI). El panel del INAEI consiste en nueve muestras de AgHBs sérico de los subtipos definidos: ayw₁, ayw₂, ayw₃, ayw₄, ayr, adw₂, adw₄, adr y adyw (32, 82). Se incubó una dilución 1/500 de cada muestra del panel con las soluciones APES ensayadas y con el antisuero de partida durante dos horas a temperatura ambiente, y luego se ensayó la inhibición de anticuerpos en AUSAB (78), como se describió previamente en los radioinmunoensayos de inhibición de anticuerpos monoclonales anti-AgHBs.

Radioinmunoensayo de inhibición de APES anti-AgHBs

Los APES anti-AgHBs se diluyeron a una concentración similar al control positivo AUSAB, y se incubaron con AgHBs nativo y modificado a diferentes concentraciones. Después de una incubación de dos horas a temperatura ambiente las mezclas se ensayaron para determinar la inhibición de la actividad del anticuerpo en AUSAB (78), como se describió

anteriormente en los radioinmunoensayos de inhibición de anticuerpos monoclonales anti-AgHBs.

Caracterización de APES anti-AgHBs por competición con anticuerpos monoclonales anti-AgHBs en radioinmunoensayos

Se incubaron altas concentraciones de APES anti-AgHBs con la fase sólida del AUSAB durante cuatro horas a temperatura ambiente. Después de esta incubación se añadió una solución de anticuerpos monoclonales anti-AgHBs a un volumen igual a la tercera parte de la mezcla previamente incubada. Las soluciones de anticuerpos monoclonales anti-AgHBs se prepararon añadiendo a anticuerpos monoclonales anti-AgHBs marcados con I^{125} en PHR suficiente concentración de anticuerpos monoclonales anti-AgHBs sin marcar para cubrir así todos los posibles sitios de unión en el antígeno de la fase sólida. En previos experimentos se encontró que estas concentraciones eran diferentes para cada anticuerpo monoclonal: H5, H12, H35 y H95 se añadieron en una concentración de 10 ug por pocillo; H10 y H53 necesitaron sólo 5 ug por pocillo y H166 necesitó 25 ug por pocillo. Las soluciones de anticuerpos monoclonales se incubaron con la fase sólida 16 horas a temperatura ambiente. Al final del período de incubación la fase sólida se lavó dos veces y se determinó la cantidad de radioactividad. Además de estos pocillos con las

diferentes muestras, el ensayo también incluía los controles siguientes:

-Control negativo: pocillos con PHR en lugar de APES anti-AgHBs.

-Control positivo: pocillos con anticuerpos monoclonales anti-AgHBs marcados con I^{125} y monoclonales anti-AgHBs sin marcar.

-Control de competición: pocillos con anticuerpos monoclonales anti-AgHBs marcados con I^{125} y monoclonales anti-AgHBs no marcados a una concentración diez veces mayor de la necesaria para cubrir los determinantes de la fase sólida.

Ensayos de inhibición de APES anti-AgHBs utilizando anticuerpos monoclonales y la técnica del marcador enzimático (ELISA)

Los APES se diluyeron a concentraciones similares al control positivo AUSAB y se incubaron con un exceso de monoclonales anti-AgHBs que competían en la unión con el antígeno de la fase sólida. Después de dos horas de preincubación a temperatura ambiente el antígeno de la fase sólida se añadió a los pocillos y se incubaron durante más de 16 horas a temperatura ambiente. La fase sólida se lavó tres veces con agua. Se añadió luego una solución con un segundo anticuerpo contra los APES anti-AgHBs incubándose durante una hora a 45°C . La fase sólida se volvió a lavar otras tres

veces. Seguidamente se transfirió a tubos en los que se habían añadido 300 μ l de una solución de ortofenilendiamina (OPD) para permitir la reacción del enzima ligado a este segundo anticuerpo. Estos tubos se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz. Se añadió un mililitro de ácido sulfúrico 1M, y se leyó la absorbancia de la mezcla a 492nm.

Radioinmunoensayo de inhibición de anticuerpos monoclonales anti-AgHBs por APES anti-AgHBs

Se hicieron competir los anticuerpos monoclonales con un exceso de APES anti-AgHBs. Se incubaron 175 μ l de APES anti-AgHBs con antígeno en fase sólida durante 4 horas a temperatura ambiente. Después de esta incubación se añadieron a la mezcla 110 μ l de la solución de anticuerpos monoclonales anti-AgHBs marcados con I^{125} y monoclonales anti-AgHBs sin marcar. Se dejaron incubar durante más de 16 horas y se lavaron tres veces con agua antes de determinar la radioactividad en un contador de centelleo gamma.

TECNICAS ELECTROFORETICAS

Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de sulfato dodecil sódico (EGPA-SDS)

Se realizó una electroforesis analítica vertical en geles de poliacrilamida con un gradiente lineal de 12,0% a 22,5%. La fase preparativa de la electroforesis consistió en un gel de poliacrilamida al 4%. Las composiciones del buffer y del gel fueron las de OÍFarrell (83), y la solución de tinción contenía azul de Coomasie. Los geles que tenían una baja concentración de proteínas se tiñeron usando un compuesto de plata (GELCODE, Upjohn Diagnostics, Kalamazoo, Michigan).

Inmunoelectroforesis

Las proteínas AgHBs se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (EGPA-SDS) y se transfirieron a filtros de nitrocelulosa. Para transferir las proteínas al filtro se colocó sobre una hoja de nitrocelulosa húmeda; ambos fueron colocados entre hojas de papel Whatmann número 17 y almohadillas esponjosas. La composición del buffer de transferencia fue la de OÍFarrell (83) a la que se añadió metanol hasta un 20%. Para llevar a cabo la electroforesis se usaron como electrodos dos placas de metal a

las que se aplicó una corriente de 199mAmp durante tres horas a 4⁰C.

Las proteínas AgHBs que se habían transferido al papel de nitrocelulosa se sometieron a inmunoadsorción con anticuerpos anti-AgHBs. Las bandas que adsorbieron anticuerpos se detectaron con una reacción de color mediada por la peroxidasa conjugada con anticuerpos que reconocían la inmunoglobulina anti-AgHBs. Para llevar a cabo esta reacción el papel de nitrocelulosa que contenía las proteínas antigénicas transferidas se incubó primero con PHR durante 30 minutos a 37⁰C agitándose constantemente, y luego se añadió a esta solución anti-AgHBs prosiguiendo la incubación en agitación durante dos horas más a 37⁰C. El filtro se lavó tres veces con 10% PHR en un buffer de fosfato (BSF) y a continuación se incubó luego durante una hora con una dilución apropiada de anticuerpos (conjugados con peroxidasa) que reconocían la inmunoglobulina anti-AgHBs. Después de la unión al segundo anticuerpo se realizaron tres lavados con 10% PHR y finalmente, se añadió H₂O₂ y 4-cloro-1-naftol como sustrato para obtener la coloración. El color apareció en los cinco primeros minutos. Después de teñir el filtro se lavó la hoja con agua y se guardó sec en ausencia de luz. Esta técnica se denomina también Western blotting (84).

ANÁLISIS Y MODIFICACIONES QUÍMICAS

Análisis de aminoácidos

Se hidrolizaron con ClH 6N alícuotas de cada muestra antigénica en tubos sellados al vacío durante 24 horas a 110°C. El análisis de aminoácidos se llevó a cabo en un analizador de aminoácidos Durrum MBF.

Modificaciones químicas de AgHBs: metilación reductora y carbodiimidación.

Se metilaron reductivamente 60ug de AgHBs usando formaldehído 2,8mM en presencia de cianoborohidrato sódico 9,8mM en un buffer de fosfato 0,05M pH 7 (85)(el cianoborohidrato sódico se añadió a la mezcla cinco minutos antes de añadir el formaldehído con objeto de conseguir una distribución uniforme). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante dos horas. Después de la incubación, dicha mezcla (171ul) se completó hasta un volumen de 1ml añadiendo PHR. Los grupos carboxilo de AgHBs se modificaron convirtiéndolos en amidas usando 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y ester de metil glicina (EMG) como grupo amino. Se usó cinco veces más amina que carbodiimida (0,1M EDC\0,5M EMG). El medio acuoso usado en la reacción consistió en una solución muy diluida de ClH a pH 4,75, y la

reacción se llevó a cabo durante dos horas a temperatura ambiente. Al final del período de incubación la reacción se detuvo añadiendo igual volumen de una solución de acetato a pH 4,5 de concentración diez veces molar la concentración de EDC (86).

Proteolisis de AgHBs

Los antígenos se incubaron con tripsina, quimiotripsina, proteasa V-8, leucina aminopeptidasa, carboxipeptidasa Y o carboxipeptidasa A, usando un cociente enzima\sustrato de 1\25. Se hidrolizó con 1% 2-mercaptoetanol en BSF pH 6,8, durante 16 horas a temperatura ambiente.

Solubilización de proteínas del antígeno de superficie

En este caso, los antígenos se incubaron a 37°C durante 16 horas en una solución de detergente al 2% (peso\volumen) en BSF.

RESULTADOS

Estudio de la heterogeneidad del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (AgsHB)

Como ya se ha mencionado en la introducción aunque la composición del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B es conocida, y se cree que es invariable, estudios llevados a cabo mediante microscopía electrónica de alta resolución y dispersión de rayos X de bajo ángulo sugieren que el antígeno de superficie purificado no consiste en una población uniforme (30). Por ello fue interesante fraccionar dicha población antigénica y diferenciar así si AgHBs es una población uniforme o no de partículas con determinantes antigénicos definidos. Los resultados de esta separación, obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando columnas TSK DEAE 5PW, se muestran en la figura 2. Se recogieron las fracciones que mostraron mayor concentración proteica y fueron sometidas nuevamente al mismo proceso de separación, como se muestra en la figura 2B, 2C y 2D. Seguidamente, se realizaron estudios espectroscópicos de estas partículas con el fin de investigar la posible asociación de la separación cromatográfica y la estructura de la proteína vírica. Además se analizaron los distintos determinantes antigénicos de AgsHB ya que es importante conocer si la heterogeneidad física antes descrita se refleja en una heterogeneidad en las propiedades antigénicas. Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS, análisis de aminoácidos, espectroscopía de absorción en ultravioleta-visible y dicroísmo

Figura 2. Separación de las partículas de AgHBs mediante cromatografía de intercambio iónico en una columna de HPLC modelo TSK DEAE 5PW. Se inyectaron en la columna dos mililitros de una muestra antigénica con una concentración de 5mg/ml. La elución de la muestra retenida se llevó a cabo mediante un gradiente lineal de Tris-ClH pH7 que fué de 10 a 600mM (como se indica por la línea continua que atraviesa el perfil cromatográfico). Las fracciones seleccionadas para estudios posteriores fueron aquellas contenidas en los corchetes. A) primera cromatografía de la muestra antigénica purificada del plasma de un portador crónico del virus de la hepatitis B, B) cromatografía de la fracción 2 indicada en la figura 2A, C) cromatografía de la fracción 3 indicada en la figura 2A, D) cromatografía de la fracción 4 indicada en la figura 2A.

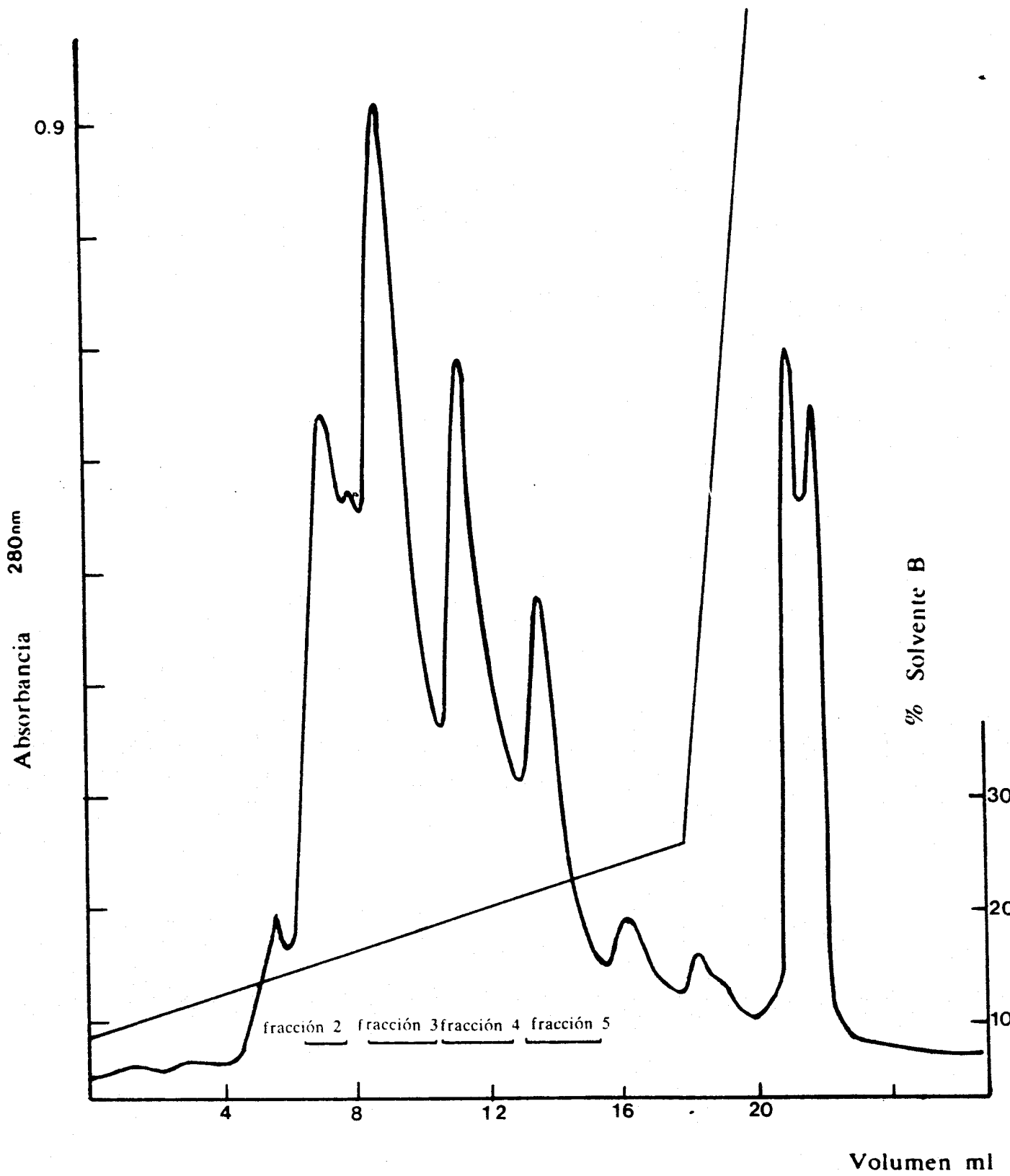


Figura 2A.

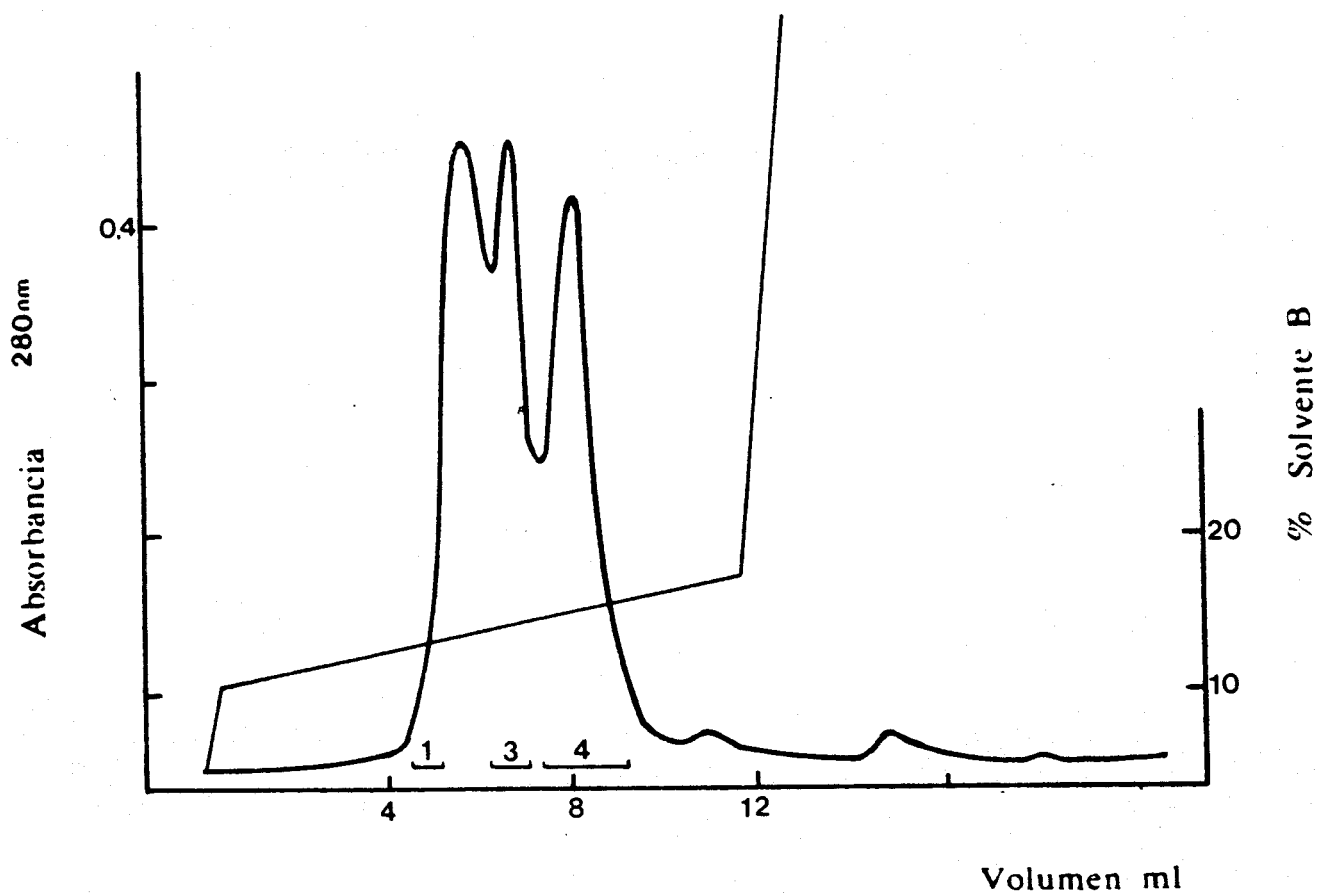


Figura 2B

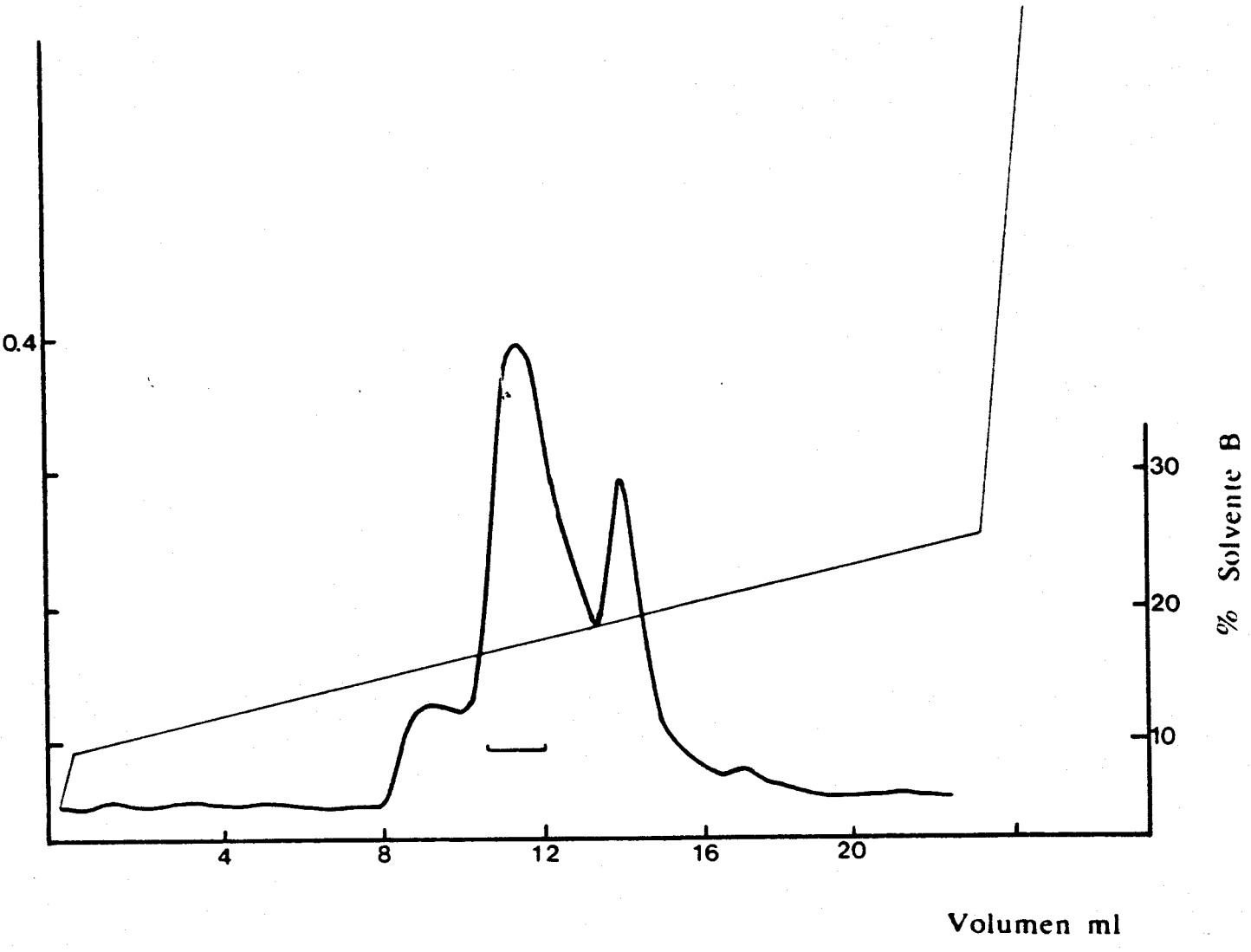


Figura 2C.

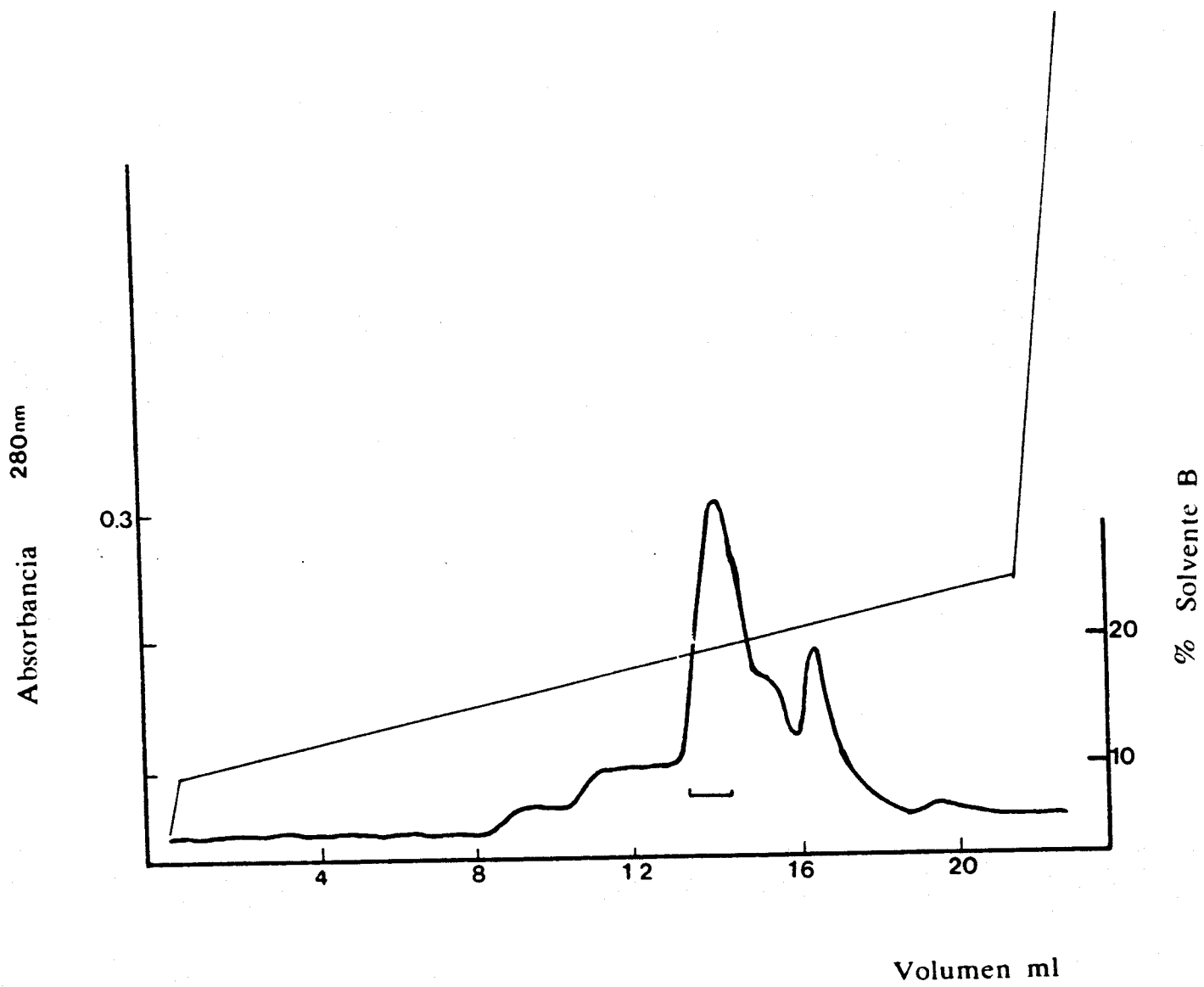


Figura 2D

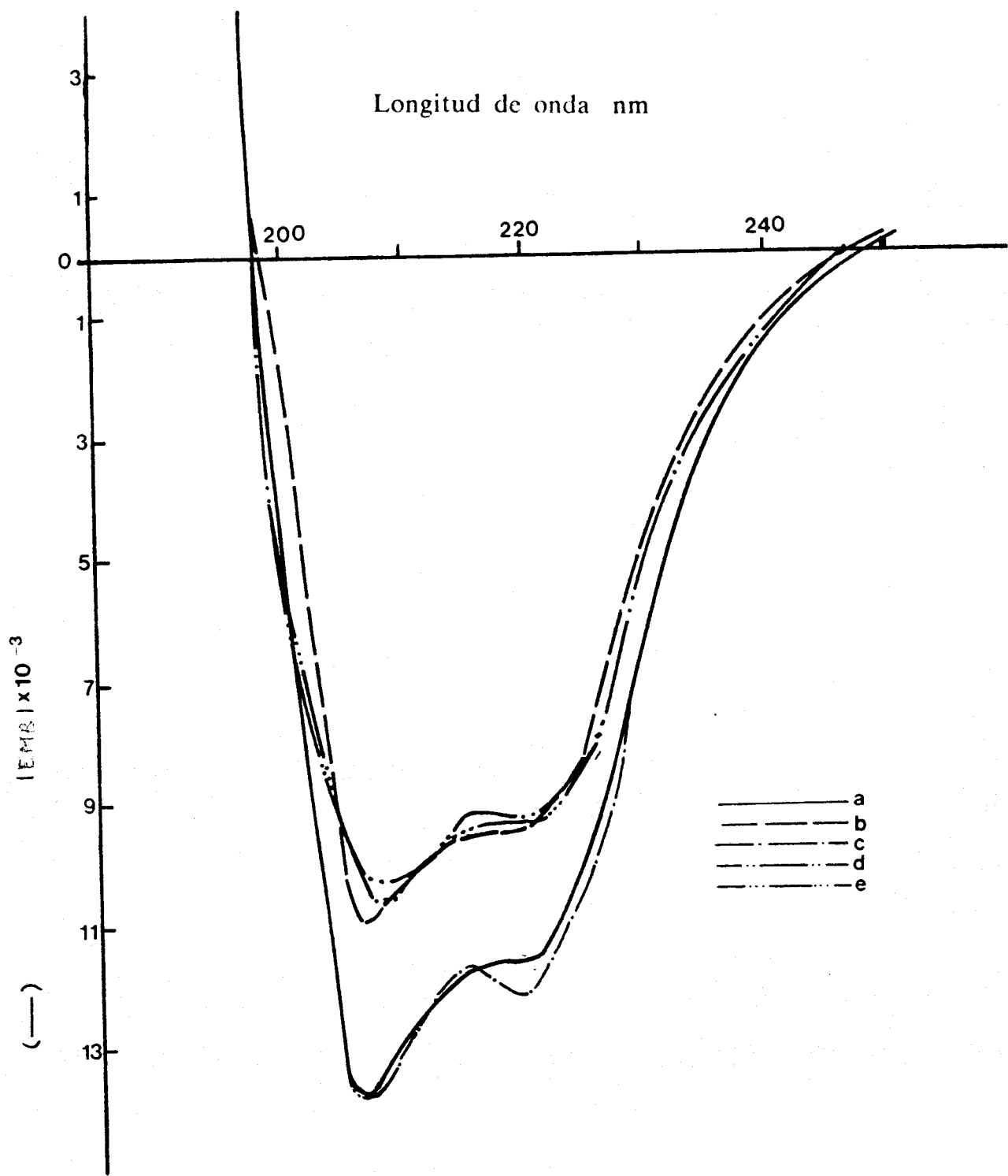
circular (DC) se intentó determinar si había una diferencia física clara entre sus componentes proteicos. La técnica de dicroísmo circular se utilizó dado que puede proporcionar una indicación de las diferencias conformacionales en proteínas. Por otra parte, se utilizaron ensayos inmunológicos con anticuerpos monoclonales para estudiar los distintos sitios antigénicos. todos estos análisis se detallan a continuación.

Estudio de la conformación de la proteína en las fracciones del antígeno de superficie con distinto comportamiento cromatográfico.

Las fracciones que se indican en los apartados B, C y D de la figura 2 se utilizaron para caracterizar la heterogeneidad del antígeno.

Las proteínas integrantes se analizaron mediante DC, una técnica que permite diferenciar proteínas con distinta conformación. En la figura 3 se recogen los espectros de las fracciones del antígeno clasificadas según el porcentaje del solvente B (600 mM Tris-ClH pH 7) al que se eluyeron. El espectropolarímetro Jasco empleado midió elipticidad en unidades de dicroísmo circular que fueron traducidas a elipticidad media por residuo (EMR) al incluir la molaridad de la muestra en el procesador de datos acoplado a este aparato. En estos espectros es importante considerar la EMR en las longitudes de onda en las que se observan las transiciones de los orbitales pi, que reflejan la conformación en alfa hélice. La estructura en alfa hélice tiene un doble mínimo característico a

Figura 3. Espectros de dicroísmo circular de las fracciones obtenidas mediante cromatografía de intercambio iónico del AgHBs\adw. Los espectros representan la elipticidad media por residuo (EMR) de las fracciones obtenidas a distintos % del gradiente lineal de Tris-ClH pH7 (10mM a 600mM): (a) 13,5, (b) 15,5, (c) 14,5, (d) 17,5, (e) 19,3.



222 y 210 nm, y un máximo a 193 nm, por lo tanto al espectro obtenido en la región comprendida entre 185 y 250 nm contribuye la absorción debida a esta estructura ordenada (86). Como se deduce de los experimentos de dicroísmo circular (figura 3), la conformación proteica difiere ligeramente en cada fracción seleccionada. No obstante la proporción de alfa hélice observada en la primera fracción fue 20% mayor que la observada en las últimas. Esta diferencia parece ser significativa, sin embargo, los espectros de dicroísmo circular deben interpretarse con precaución cuando se intenta caracterizar cambios conformacionales discretos en la proteína (48).

Estudio de la antigenicidad de fracciones del antígeno de superficie.

La antigenicidad es una herramienta importante en el estudio de las proteínas virales, ya que la unión de los anticuerpos a los distintos determinantes antigénicos en la proteína es altamente específica. Esta especificidad puede ser secuencial, conformacional o ambas cosas a la vez, y de ahí que los anticuerpos puedan utilizarse como pruebas sensibles a las diferencias y similitudes entre proteínas completamente distintas, o modificadas ligeramente. De acuerdo con esta estrategia, las fracciones cromatográficas del AgsHB se compararon con respecto a su habilidad para unir un grupo de siete anticuerpos monoclonales contra el antígeno de superficie. El grado de afinidad a estos anticuerpos podría revelar información

importante sobre la presencia e integridad de los diferentes sitios antigénicos. Presumiblemente cada partícula del antígeno de superficie contiene todos los epítomos reconocidos por estos anticuerpos monoclonales y por tanto las características del proceso de unión pueden ser comparadas.

Caracterización de los determinantes antigénicos en las fracciones del antígeno de superficie mediante anticuerpos monoclonales.

Se utilizaron para comparar las fracciones de AgHBs siete anticuerpos monoclonales contra el antígeno de superficie que reconocían diferentes epítomos con poco o ningún solapamiento. Entre ellos se incluyen dos anticuerpos monoclonales que sólo se unen a uno de los subtipos del antígeno, adw o ayw (H95, específico para el subtipo d, y H10 específico para el subtipo y). Tres de ellos fueron definidos anteriormente como específicos para el grupo a (H5, H35, H166), y de los otros dos (H53 y H12) se desconoce aún su especificidad. La tabla 1 recoge los resultados de los radioinmunoensayos de distintos anticuerpos monoclonales anti-AgHBs en presencia de distintas fracciones de AgHBs. En estos ensayos las partículas de AgHBs de las fracciones ensayadas compiten con la fase sólida que contiene AgHBs al que se pueden unir los anticuerpos monoclonales anti-AgHBs. El grado de inhibición de la unión del monoclonal aumenta en relación al reconocimiento por el monoclonal de los determinantes antigénicos en el AgHBs de la fracciones. Las fracciones están representadas por el tanto por ciento del

solvente B correspondiente a su elución. Las concentraciones de antígeno en las fracciones están estimadas por la densidad óptica a 280nm . Las concentraciones de anticuerpos monoclonales empleadas están expresadas en unidades de radioactividad correspondientes al radioinmunoensayo AUSAB (Laboratorios Abbott). Como se puede observar hay una disminución gradual en la afinidad de tres anticuerpos monoclonales (H5, H53 y H166) que se corresponde con el tiempo de elución. Así, la última fracción recogida presentaba sólo 43% de la capacidad de unión de la mostrada por la primera fracción con respecto al monoclonal H5. La capacidad de unión de H53 y H166 disminuyó también (38% y 36% respectivamente), desde el comienzo hasta el final del gradiente. Por tanto dos sitios a están asociados con las diferencias en la elución de AgHBs en una columna de intercambio iónico. Sorprendentemente el anticuerpo monoclonal específico del subtipo ayw (H10) parecía reconocer al antígeno contenido en algunas fracciones, especialmente la eluída con 14,5% del gradiente.

Comparación de los sitios antigénicos en las fracciones del gradiente de DEAE y en el material de partida.

La capacidad de unión al H5 del material de partida fue intermedia entre la de la primera y la última fracción del gradiente. La capacidad de unión a H12, H95 y H35 fue la misma que la de todas las fracciones del gradiente. Sin embargo, la capacidad de unión de H53 y H166 fue similar a la

observada en las últimas fracciones (tabla 1). Por tanto es posible que la antigenicidad del subtipo **ad** utilizado en estos experimentos se deba a un conjunto de partículas heterogéneas, siendo la forma dominante la que muestra un tiempo de retención mayor. Comparando la capacidad de unión de cada anticuerpo monoclonal a una fracción dada, así como las distintas capacidades de un anticuerpo monoclonal dado en distintas fracciones sería posible determinar cuál de las fracciones estudiadas se aproxima más al material de partida desde el punto de vista de la antigenicidad. Esta fracción resultó ser la correspondiente a un valor de gradiente de 17,5% . La proteína antigénica contenida en esta fracción se comportó de manera análoga al material de partida cuando se realizaron los estudios de inhibición de anticuerpos monoclonales descritos en la sección de métodos empleados. Todos los anticuerpos monoclonales ensayados reconocieron a este antígeno de igual forma que al material de partida, a excepción del H166 cuya capacidad de unión a la proteína de la fracción fue más alta. Igualmente esta fracción mostró una capacidad de unión más alta a anticuerpos policlonales contra el antígeno de superficie (20% más antigenicidad, observación personal).

Las primeras fracciones eluidas de la columna contenían proteínas observadas en la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS del material de partida, y que no aparecen en las últimas fracciones (figuras 4 y 5). La figura 4 muestra el gel de poliacrilamida resultante de la electroforesis de las fracciones; su tinción se realizó con sales de plata con el fin de

Tabla I. Radioinmunoensayo (RIE) de anticuerpos monoclonales anti-AgHBs en presencia de AgHBs contenido en distintas fracciones. AgHBs/adw se eluyó en una columna TSK-DEAE 5PW mediante un gradiente lineal de Tris-ClH de 10 a 600 mM pH7. Las fracciones están indicadas según el % del gradiente correspondiente a su elución. Los valores en esta tabla indican el número de unidades RIE que no se unieron a la fase sólida del ensayo AUSAB debido al AgHBs/adw de la fracción ensayada.

FRACCION de AgHBs		MONOCLONAL ENSAYADO						
Gradiente %	Conc. A ₂₈₀ ng/ml	Unidades RIE inhibidas/ml						
		H5 ^a	H10	H12	H35	H53	H95	H166
		(424)	(436)	(268)	(512)	(183)	(442)	(346)
13.5	58.0	65	0	39	209	60	183	33
	5.8	12	9	0	200	15	52	13
14.5	132.0	67	45	42	513	51	410	36
	13.2	22	0	0	357	0	92	0
15.5	57.0	45	0	42	262	49	228	31
	5.7	7	16	10	234	0	49	0
17.0	57.0	45	0	38	213	48	200	29
	5.7	16	4	6	208	4	67	0
17.5(3)	48.0	38	6	35	222	39	192	31
	4.8	10	0	0	205	11	53	8
19.3(4)	68.0	28	7	43	202	37	171	21
	6.8	21	0	0	192	5	67	0
M.P. ^b	48.0	48	0	38	279	48	238	24
	4.8	0	0	0	239	10	62	8

^a	Anticuerpo monoclonal	anti-AgHBs	(Unidades RIE	RIE	totales)
^b	Material		de		partida

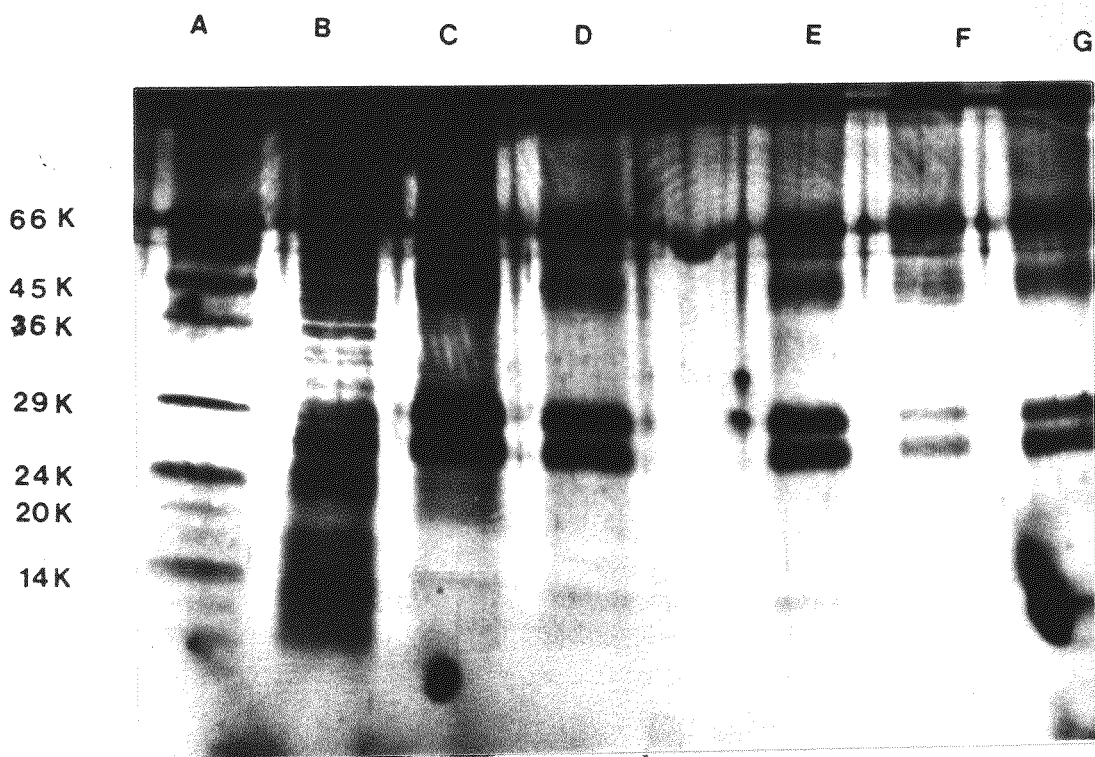
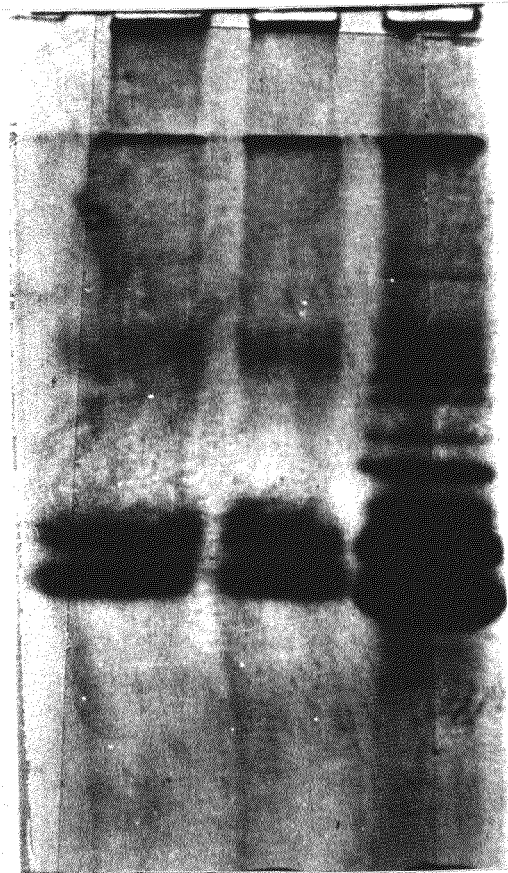


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las fracciones de AgHBs aisladas mediante cromatografía de intercambio iónico (figura 2). Las distintas fracciones están representadas de B a G y se indican según el % del gradiente lineal al que se eluyeron: A) Marcadores de peso molecular, B) 13,5, C) 14,5, D)17,5, F) 19,3, y G) fracción 4 de la figura 2. Las bandas proteicas se visualizaron mediante una tinción con sales de plata.

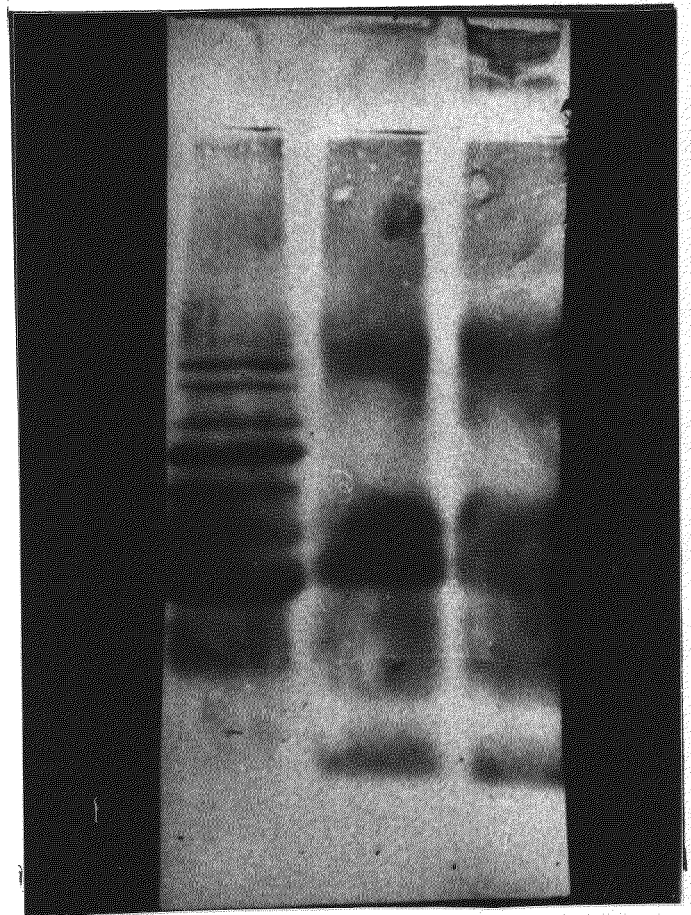
Figura 5. a) Electroforesis en gel de poliacrilamida de fracciones cromatográficas de AgHBs indicadas en la figura 2A. Las bandas proteicas se visualizaron mediante una tinción con azul de Coomasie. De A a C los pocillos se cargaron con :A) material de partida sin cromatografiar, B) fracción 3 y C) fracción 4. El apartado b) de esta figura muestra el filtro de nitrocelulosa al que se electrotransfirieron las bandas contenidas en a). Las bandas visualizadas en el papel son aquellas que se unieron al anticuerpo monoclonal H166 que reconoce epitopos del grupo **a** de AgHBs, su tinción fue posible mediante la reacción con un segundo anticuerpo que reconocía a la inmunoglobulina monoclonal y que tenía conjugada un enzima peroxidasa. El sustrato responsable de la reacción de coloración fue el 4-cloro-1-naftol. P-25 es la proteína de 226 aminoácidos expresada por el gen S, y GP-30 es su forma glicosilada.

C B A



GP-30
P-25

A B C



aumentar la sensibilidad y detectar componentes menores en estas muestras. A pesar de la baja resolución de las bandas correspondientes a la primera subfracción, se puede observar la mayor abundancia en especies de alto peso molecular. Quizás las bandas mencionadas podrían corresponder a las observadas en el material de partida en la figura 5a. Tras la elución de estos componentes en la fracción 13,5%, el resto de las fracciones parec estar libre de otras especies que no correspondan a la proteína antigénica P-25, o a su forma glicosilada GP-30. En la figura 5b se revelan las bandas polipéptidicas correspondientes al antígeno transferido a un filtro de nitrocelulosa; en este caso las banadas se visualizaron tratando el filtro con el anticuerpo monoclonal específico de grupo H166; tras la incubación con H166 hubo una segunda incubación con un anticuerpo que reconocía la inmunoglobulina monoclonal, este segundo anticuerpo tenía conjugada un enzima peroxidasa que en presencia de H_2O_2 podía oxidar un compuesto de naftol que liberaba color. Dado que todas las bandas observadas en material de partida reaccionaban con anticuerpos contra el antígeno de superficie (figura 5), esto podría indicar que la diferencia en antigenicidad de las primeras fracciones se debe a su contenido en estas proteínas antigénicas.

Es posible por tanto, que los epítomos reconocidos por H12, H35 y H95 pertenezcan a areas que permanecen inalteradas a pesar de los posibles cambios en las partículas víricas que alteran su tiempo de retención en la columna; quizás estos epítomos tienen un carácter secuencial y su conformación está

totalmente dictada por su secuencia. Por otra parte los epítomos reconocidos por H5, H53 y H166 podrían incluir áreas que dependen de la conformación de la partícula. La estructura del antígeno podría variar ligeramente debido a la incorporación en la partícula de proteínas víricas que se encuentran en menor concentración, lo que podría a su vez traducirse en un cambio conformacional que favorece la unión de monoclonales tales como H5, H53 y H166. Una posibilidad sería que las bandas adicionales observadas en la electroforesis en presencia de SDS se deban a aquellos productos resultantes de la expresión de regiones del genoma vírico que no se traducen siempre, y que podrían integrarse en algunas partículas sin cambiar notablemente su estructura, pero si los epítomos reconocidos por H5, H53 y H166. También es necesario considerar el grado de glicosilación de las proteínas antigénicas, ya que es posible la existencia de residuos glicosílicos con distinta carga iónica que podrían afectar la elución en una columna de intercambio iónico. A la vez, los residuos glicosílicos podrían ser responsables de un cambio en el peso molecular de las proteínas, observado en el gel de la electroforesis.

Conclusiones

En los estudios realizados en las partículas del antígeno de superficie de la hepatitis B del subtipo adw se ha podido comprobar que estas partículas purificadas del plasma pueden separarse en distintas poblaciones cuando se someten a cromatografía de intercambio iónico. A pesar de esta

heterogeneidad, la mayoría de las partículas se eluyeron en fracciones de carga similar. La diferencia entre las fracciones no parece ser consecuencia de cambios drásticos en la estructura física, de acuerdo con la evidencia obtenida mediante dicroísmo circular. La antigenicidad total de estas muestras fue similar, aunque la afinidad de siete anticuerpos monoclonales reveló algunas diferencias. Todas las fracciones fueron capaces de unir los siete anticuerpos utilizados; sin embargo las partículas menos retenidas por la columna mostraban una mayor capacidad de unión a H5, H53 y H166. Esta última observación podría estar relacionada con la existencia de algunas proteínas antigénicas en las fracciones con más capacidad de unión a los citados anticuerpos monoclonales.

No parece haber ninguna razón para atribuir una estructura proteica diferente a estas fracciones del antígeno de superficie, ya que el resto de los determinantes antigénicos parecen no afectarse por estas diferencias. Una posible explicación de la heterogeneidad observada, sin embargo, implicaría la extensión de la sialización en GP-30, así como la presencia de péptidos codificados por la región génica precedente al gen S. Aunque el papel de los carbohidratos del antígeno de superficie en la antigenicidad es desconocido en este momento, los péptidos de la región pre-S parecen ser muy activos en la respuesta inmune, y quizás su presencia podría afectar la antigenicidad de los determinantes de la región S.

Estudio de los sitios específicos de los subtipos d y y

Los anticuerpos monoclonales se han utilizado frecuentemente para estudiar los determinantes antigénicos de las proteínas debido a su gran especificidad. Sin embargo, esta gran especificidad puede también limitar su uso en estudios en los que no se pretende reconocer sitios concretos sino regiones antigénicas que pueden estar distribuidas por toda la partícula proteica y que incluyen más de un epítipo. Por lo tanto, en este último caso, se prefiere el uso de anticuerpos policlonales específicos. Estos anticuerpos pueden presentar mayor capacidad de unión y, además la visualización de las áreas afectadas se ve favorecida como, por ejemplo, en inmunoensayos que se llevan a cabo en filtro de nitrocelulosa al que se ha transferido la proteína antigénica. Por ello, en los estudios de la especificidad de subtipo del antígeno de superficie de la hepatitis B se han utilizado anticuerpos policlonales con especificidad selectiva para los distintos subtipos. En nuestro estudio obtuvimos los anticuerpos específicos utilizando columnas de afinidad que contenían distinto subtipo del antígeno de superficie, en concreto el **ad** y el **ay**. Los anticuerpos policlonales presentes en el antisuero en contra de cada subtipo se filtraron a través de la columna de afinidad contraria a su subtipo. Esta columna retuvo los anticuerpos que podían reconocer epítipos comunes a ambos subtipos, pero aquellos anticuerpos específicos para el antígeno inoculador pudieron eluirse fácilmente de la columna

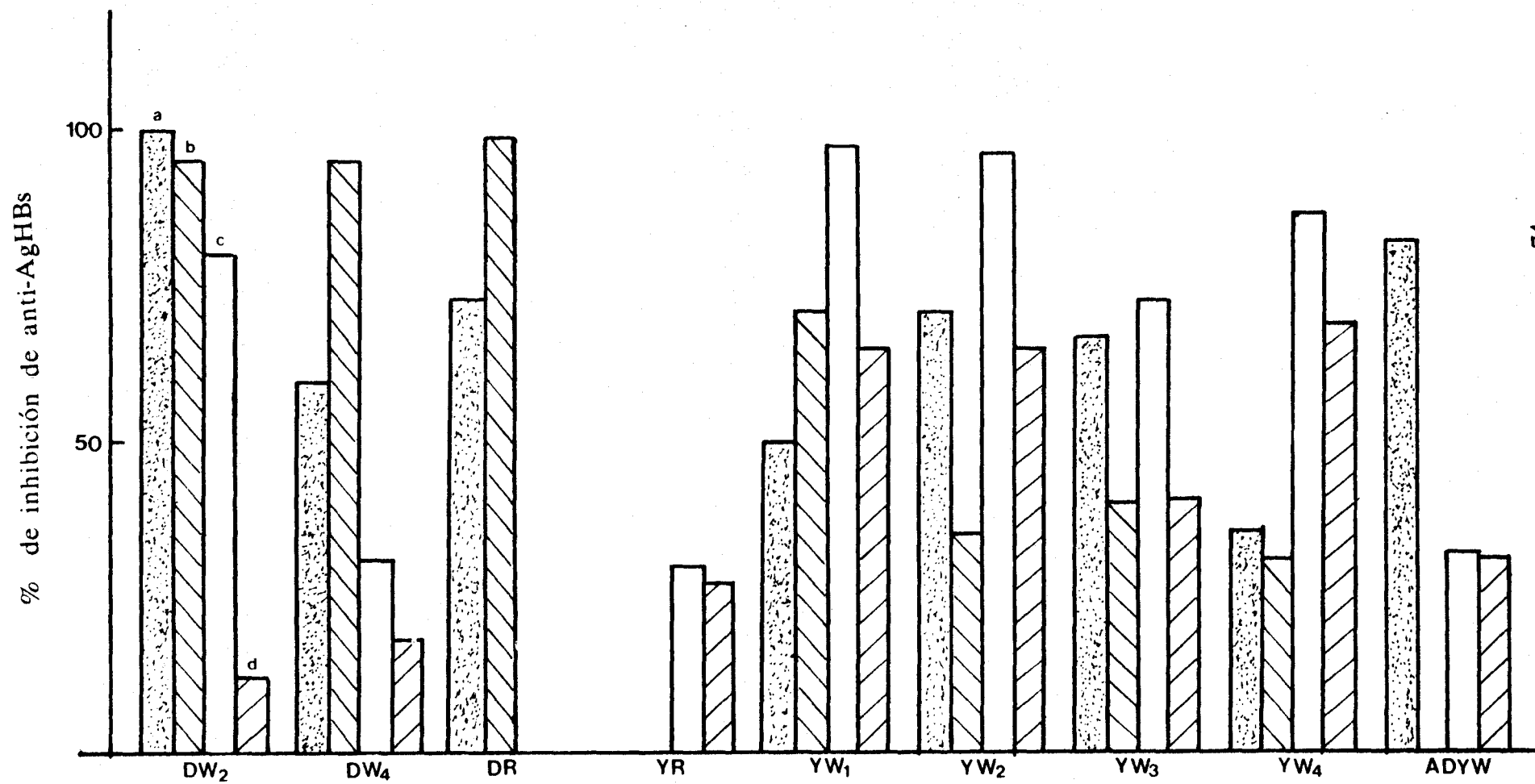
en los primeros lavados. Los anticuerpos retenidos debían identificar principalmente a los epítomos del grupo **a** al que ambos subtipos pertenecen, mientras que los eluidos con el solvente sólo identificaban a uno de los subtipos, **d** o **y**.

Caracterización de los anticuerpos policlonales específicos de subtipo (APES) mediante la clasificación de antígenos de superficie del Instituto Nacional de la Alergia y Enfermedades Infecciosas (INAEI), EE.UU.

El primer experimento realizado para asignar la especificidad de subtipo a los APES consistió en ensayos de inhibición antigénica utilizando nueve antígenos clasificados por el INAEI con distinto subtipo. Entre los antígenos clasificados se encuentran tres (adw_2 , adw_4 , adr) reconocidos únicamente por antisuero contra el subtipo **d**, cinco reconocidos exclusivamente por antisueros del subtipo **y** (ayw_1 , ayw_2 , ayw_3 , ayw_4 , ayr), y uno ($adyw$) al que reconocen antisueros de ambos subtipos. Aunque distintos autores han presentado otras clasificaciones del antígeno de superficie, todas ellas consideran básicamente los tres determinantes incluidos en la del INAEI, es decir un determinante de grupo **a**, un determinante de subtipo (**d****y**) y un segundo determinante de subtipo (**w****r**) del que aún no se sabe suficiente para clasificarlo fielmente. De acuerdo con el panel del INAEI se encontró que las fracciones recogidas de APES contra los subtipos **d** y **y** contenían fundamentalmente

anticuerpos que identificaban sitios **d** o sitios **y**, así como también anticuerpos que podrían identificar los sitios **w** que estos antígenos del estudio parecían no compartir. La figura 6 muestra los ensayos realizados con los APES y los antígenos del panel del INAEI; el reconocimiento del antígeno por el anticuerpo se observa en los porcentajes de inhibición. Una mayor identificación se refleja en un porcentaje de inhibición más alto. En esta figura se observa una inhibición total de los anticuerpos policlonales anti-AgHBs\adw tras incubarse con el subtipo AgHBs\adw₂, mientras que los anticuerpos anti-AgHBs\ayw no pueden identificarse totalmente con un subtipo de la clasificación. Los APES anti-d y anti-y no deberían contener anticuerpos que pudiesen reconocer antígenos de otros subtipos distintos, sin embargo, muestran dicha afinidad. Esta impureza, o falta de especificidad se debe al distinto carácter **w** de los antígenos de partida. El epítipo **w** del subtipo **d** tiene carácter **w**₂, mientras que en el caso del subtipo **y** es más parecido al **w**₄. A pesar de esta última observación se puede considerar que los APES purificados eran en su mayoría anticuerpos que reconocían epítipos específicos de subtipo y no determinantes de grupo. (Nota: debido a la distinta titulación de las fracciones de anticuerpos ensayadas, los porcentajes de inhibición de distintas fracciones con un mismo antígeno no son totalmente comparables entre sí, y sólo pueden compararse los porcentajes de la misma fracción con respecto a distintos antígenos)

Figura 6. Inhibición en radioinmunoensayos de anticuerpos anti-AgHBs debida a la presencia de AgHBs de distintos subtipos clasificados por el INAEI. Las cuatro soluciones de anticuerpos ensayadas contenian: a) anticuerpos policlonales anti-AgHBs\adw (columna con puntos), b) anticuerpos policlonales especificos del subtipo adw purificados por columna de afinidad (columna rayada hacia la izquierda), c) anticuerpos policlonales anti-AgHBs\ayw (columna en blanco) y d) anticuerpos policlonales especificos del subtipo ayw (columna rayada hacia la derecha). El % de inhibición se determinó tal y como se describió en la sección de métodos.



Clasificación de AgHBs del INAEI

Caracterización de los sitios específicos de subtipo

Identificación de sitios específicos de subtipos utilizando policlonales y monoclonales.

En estudios previos se ha encontrado que ciertas modificaciones químicas del antígeno de superficie pueden disminuir e incluso inhibir completamente la unión de anticuerpos monoclonales específicos de los subtipos **d** y **y** (23). Sin embargo, la antigenicidad de los sitios de unión de los anticuerpos monoclonales no se ha estimado en relación a la especificidad del subtipo. En los estudios descritos a continuación, el sitio monoclonal específico de subtipo se ha estudiado con relación a la antigenicidad de subtipo mediante el uso de anticuerpos policlonales específicos de subtipo (APES).

Los APES contra el antígeno de superficie **adw** pueden unirse al antígeno nativo, pero, no pueden unirse al antígeno que ha sido sometido a una metilación reductora. La metilación reductora del antígeno **adw** afecta a la lisina 122 (64), y no varía la conformación de la proteína como se puede observar en el espectro de DC del antígeno modificado (figura 7). En la tabla 2 se muestran los ensayos de inhibición de los APES **d** con el antígeno modificado y el nativo. Como se observa la inhibición disminuye más de un 90% indicando una destrucción de los sitios específicos del subtipo **d**. Ya que esta modificación química del antígeno **adw** era responsable de la destrucción del sitio reconocido por el anticuerpo monoclonal de subtipo H95,

Figura 7. Espectros de dicroísmo circular de AgHBs químicamente modificado. La metilación reductora de AgHBs_{adw} modificó la lisina 122 (b) y la carbodiimidación de AgHBs_{ayw} modificó los grupos carboxílicos de residuos Asp y Glu (c). El espectro de AgHBs no modificado se representa en (a). Estos espectros representan la elipticidad media por residuo (EMR).

Longitud de onda nm

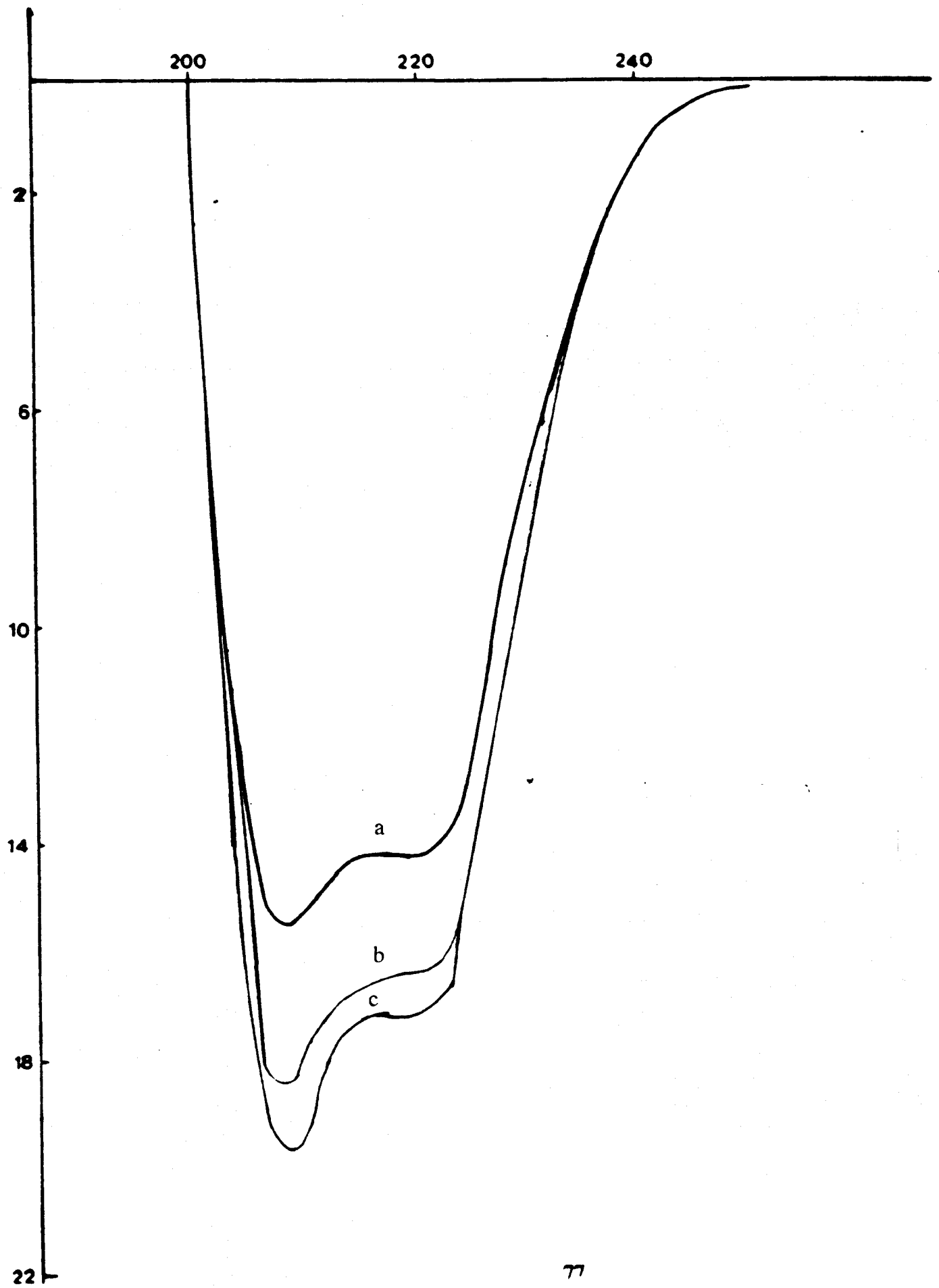


Tabla II.- Radioinmunoensayo (RIE) de anticuerpos anti-AgHBs específicos de subtipo (APES) en presencia de AgHBs químicamente modificado. El % de inhibición indica la disminución en unidades RIE debido a la competición entre el antígeno ensayado y el de la fase sólida del ensayo AUSAB.

Subtipo anti-AgHBs	AgHBs Nativo	AgHBs ng/ml	% Inh.	AgHBs* Modific.	AgHBs ng/ml	% Inh.
APES Y	ayw	5000	100	ayw/c	5000	100
		50	55		50	59
	adw	50000	0	-	-	-
		500	0	-	-	-
APES D	ayw	5000	0	ayw/mr	5000	0
		50	0		50	0
	adw	2500	100	adw/mr	2500	58
		25	92		25	9

*/c=carbodiimidación

/mr=metilación reductora

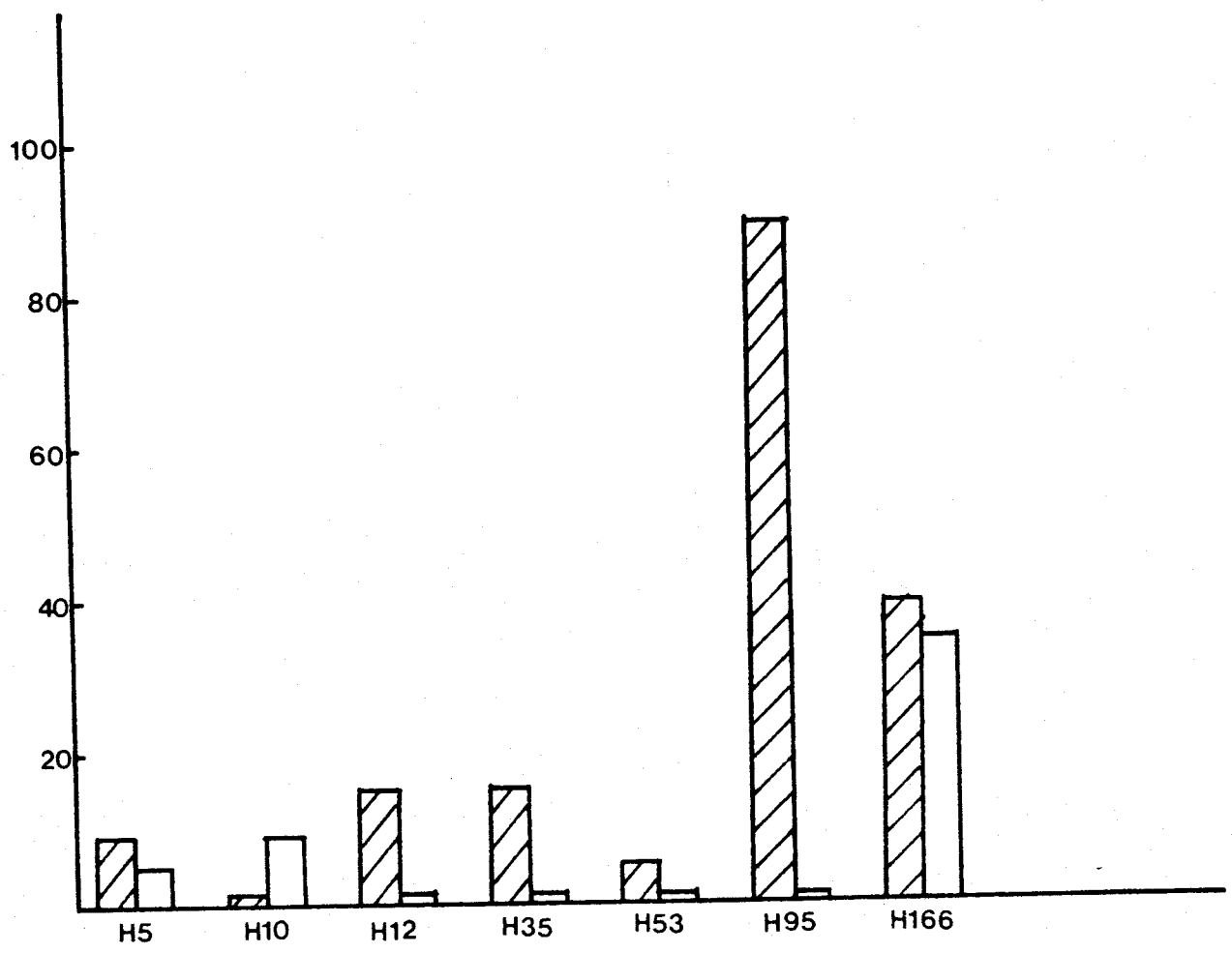
este resultado podría sugerir que los anticuerpos policlonales y monoclonales específicos del subtipo adw podrían compartir los mismos determinantes (tabla 2). Al mismo tiempo los APES contra ayw se analizaron por su unión al antígeno ayw modificado mediante carbodiimida. La carbodiimidación del antígeno ayw modifica los grupos carboxílicos libres de los residuos de aspártico y glutámico. La modificación de los grupos ácidos no cambia la conformación de la proteína (figura 7), pero si destruye el sitio de unión del anticuerpo monoclonal específico de subtipo H10 (64). A pesar de ello esta modificación química no afectó la unión de los APES contra ayw (tabla 2). Por lo tanto, la especificidad de subtipo y podría no incluir muchos de los sitios reconocidos por los anticuerpos con afinidad parecida a los del anticuerpo monoclonal específico de subtipo H10. Aunque también es importante tener en cuenta la posibilidad de que H10 una un epítipo específico del subtipo ayw, sino sólo específico para el ayw utilizado en estos estudios. Consecuentemente, el residuo modificado por la carbodiimida no tiene que pertenecer a un epítipo común al subgrupo. Más aún, el anticuerpo monoclonal 2D11 que sólo reconoce AgHBs\ayw no experimenta cambio en su afinidad por el antígeno modificado con carbodiimida (datos no incluidos en la tabla 2). Así pues, la especificidad de subtipo d parece afectar principalmente a los sitios reconocidos por anticuerpos que tienen una afinidad muy parecida a la del monoclonal H95, mientras que los sitios y responsables de la especificidad del subtipo y son aún desconocidos.

Localización de los sitios específicos de subtipo en relación a los sitios reconocidos por ocho anticuerpos monoclonales que reconocen al antígeno de superficie.

Una más completa caracterización de los APES incluye estudios de competición antigénica de los anticuerpos monoclonales contra el antígeno de superficie. Como resultado de estos ensayos, se encontró que los APES del subtipo **d** podían competir con el monoclonal H95 y con el H166 (anti grupo **a**) aunque en menor grado. Así se muestra en la figura 8, donde un 90% del anticuerpo monoclonal H95 no pudo unirse al antígeno debido a la competición de los APES **d**, y casi un 40% del H166 fue igualmente inhibido por estos mismos anticuerpos. El resto fue inhibido de tal forma. Sin embargo, los APES **y** compitieron distintamente contra aquellos anticuerpos monoclonales específicos de subtipo H10 y 2D11. Mientras el H10 fue solamente inhibido en un 9%, 2D11 no pudo unirse al antígeno de la fase sólida del ensayo. La inhibición observada contra el monoclonal de grupo H166 (figura 8) fue semejante a la de éste con los APES **d**. Ninguno de los otros monoclonales compitió contra los APES **y**. A pesar de la baja competencia presentada por H10 frente a los APES del subtipo **ayw**, se puede sugerir que los sitios identificados por H10 pueden ser específicos de subtipo, pero, no tan antigénicos como otros epítomos reconocidos por los APES **y**, como podría ser el sitio que une el 2D11. Por lo tanto, el antígeno de superficie **y** debe contener más de un sitio específico de su subtipo. La

Figura 8. Inhibición de anticuerpos monoclonales anti-AgHBs en radioinmunoensayos AUSAB (conteniendo AgHBs en la fase sólida) en presencia de anticuerpos policlonales específicos de subtipo (APES). El % de inhibición está determinado por la disminución de I^{125} procedente de los anticuerpos monoclonales anti-AgHBs. La inhibición con APES anti-AgHBs\adw está representada en columnas rayadas, y la inhibición con APES anti-AgHBs\ayw está representada por columnas en blanco. Los anticuerpos monoclonales H5, H12, H35 y H166 reconocen epitopos del grupo **a**, mientras que H10 y 2D11 sólo reconocen epitopos de AgHBs\ayw, y H95 sólo se une al AgHBs\adw.

% de anticuerpo monoclonal (I^{125}) anti-AgHBs inhibido



Anticuerpos Monoclonales

competición presentada por H166 se puede explicar considerando la diferencia del determinante de subtipo **w** entre los antígenos del estudio, esta diferencia se podría reflejar en un solapamiento de los determinantes de grupo **a** y los del subtipo **w**. En cada subtipo el solapamiento de los sitios determinantes de **a** y **w** podría afectar distintamente la unión de los anticuerpos que reconocen estos sitios. Los APES purificados a través de la columna de adw contendrían aquellos anticuerpos que reconocen el sitio w_4 y por lo tanto si hay solapamiento con el sitio del determinante de grupo **a** que reconoce H166, la competencia entre H166 y los APES conteniendo los anti w_4 podría ser posible.

Determinación del número de sitios específicos de subtipo:
Competición de anticuerpos monoclonales con los anticuerpos policlonales específicos de subtipo (APES).

Los determinantes específicos de subtipo podrían estar localizados en una o más regiones en cada subtipo, ocupando uno o más sitios antigénicos. Intentamos localizar los sitios específicos de subtipo y, para ello, los APES se utilizaron en estudios de competición contra los anticuerpos monoclonales específicos de subtipo. La interpretación de los resultados de estos estudios se hizo en base a las siguientes hipótesis:

1. Si los APES compiten totalmente con el anticuerpo monoclonal, y el anticuerpo monoclonal compite totalmente con los APES,

ENTONCES: Sólo hay un sitio específico de subtipo.

2. Si los APES compiten totalmente al monoclonal de subtipo, pero el monoclonal no puede competir los APES o sólo lo hace parcialmente,

ENTONCES: Hay más de un sitio específico de subtipo. El sitio reconocido por el monoclonal está incluido, pero el anticuerpo monoclonal no puede desplazar a los APES que reconocen esta misma región.

3. Si los APES compiten parcialmente al monoclonal y el monoclonal puede también competir parcialmente a los APES,

ENTONCES: Hay más de un sitio específico de subtipo, y los APES incluyen algunos anticuerpos que se unen parcialmente al sitio reconocido por el monoclonal.

Al mismo tiempo, el monoclonal podría inhibir la unión de algunos APES cuyo sitio se encuentran próximos al sitio del monoclonal, pero no inhibiría aquellos APES que reconocen regiones más distantes. En este caso se puede considerar que el monoclonal podría no ser totalmente específico de un subtipo, sino de una población del subtipo con un determinante exclusivo que sólo es compartido por uno de los antígenos del estudio.

En la tabla 3 se pueden comprobar los resultados de este estudio de competición. El exceso de APES compitió totalmente H95, monoclonal específico del subtipo **d**, y a su vez el exceso de H95 pudo competir a los APES específicos del subtipo **d**. Por lo tanto, estos resultados parecen sugerir que en el antígeno adw sólo hay un sitio específico de subtipo, como expone la primera hipótesis. En el caso del subtipo y los APES

Tabla III.- Competición entre anticuerpos policlonales específicos de subtipo (APES) y anticuerpos monoclonales específicos de subtipo anti-AgHBs. La competición se refleja en el % de inhibición en inmunoensayos AUSAB debida al anticuerpo competidor. La presencia del anticuerpo competidor está expresada como cociente de dilución de APES o concentración $g \times 10^{-6}$ /ml de anticuerpo monoclonal.

APES d vs H95	H95 vs APES d	APES y vs H10	H10 vs APES y
APES diln /Inh. %	H95 g x 10^{-6} /ml /Inh. %	APES diln /Inh. %	H10 g x 10^{-6} /ml /Inh. %
1:1 / 94	50.0 / 86	1:1 / 34	100000 / 7
1:10 / 91	25.0 / 79	1:10 / 5	10000 / 10
1:20 / 88	12.5 / 74	1:20 / 0	1000 / 11
1:40 / 82	6.2 / 78	1:400/ 0	200 / 0
1:200 / 32	3.1 / 74	1:200/ 0	40 / 0
1:400 / 29	1.5 / 72	1:400/ 3	8 / 0
1:800 / 36	0.2 / 50	1:800/ 9	1 / 0
1:1600/ 11			

sólo pudieron competir un 34% de H10, y el exceso de H10 no pudo competir más de un 10% de los APES. Este último comportamiento se acerca al de la hipótesis tercera y sugiere que hay distintos sitios determinantes de la especificidad y, y H10 puede reconocer uno de los sitios afectados pero no muy importante.

Estudios de los lípidos del antígeno de superficie de la hepatitis

B.

Aunque la composición lipídica del antígeno de superficie es conocida, no se conoce la interacción de los lípidos con las proteínas y, por lo tanto, no se sabe cómo los lípidos afectan su conformación. Por ello pareció interesante llevar a cabo estudios de solubilización del antígeno con el fin de analizar la asociación de lípidos y proteínas en el antígeno de superficie. La separación de las distintas especies resultantes de la solubilización se logró mediante el uso de gradientes de densidad en ultracentrífugas. La antigenicidad se estudió con anticuerpos monoclonales que reconocían al antígeno de superficie, y la conformación proteica se determinó con espectroscopía de dicroísmo circular.

Conformación de las proteínas en partículas antigénicas tratadas con detergente.

Tras el tratamiento con detergente, las proteínas de la superficie vírica pueden insertarse en las micelas formadas por las moléculas de detergente, adoptando la conformación que es más favorable según su estructura primaria. Este tratamiento puede inducir la formación de una estructura secundaria más ordenada o no, según el tamaño y carga de las micelas formadas por el agente solubilizador.

En la figura 9 están recogidos los espectros obtenidos tras la solubilización del antígeno adw con distintos agentes solubilizadores (SDS, octil glucósido, triton X-100, deoxicolato y colato). El porcentaje de alfa hélice se incrementó tras el tratamiento. En presencia de colato el incremento fue de un 45%, un 33% en el caso de utilizar SDS, 26% si el agente solubilizador era triton X-100, un 23% si se utilizaba deoxicolato y sólo un 17% en presencia de octil glucósido. Por lo tanto, se puede ver un gran efecto del agente solubilizador en el resultado de la solubilización, hasta el punto que no es fácil relacionar el cambio configuracional con el proceso de solubilización, sino más bien con la naturaleza del agente empleado para ello. No obstante, puede concluirse que la configuración más favorable para la proteína antigénica debe ser en alfa hélice. Además, es posible que el contenido total en alfa hélice pueda incluso estar subestimado en el solvente acuoso empleado para realizar las medidas espectroscópicas, como se ha comprobado en el caso de otras proteínas de membrana tal como la bacteriorodopsina (87).

Antigenicidad del antígeno de superficie tras el tratamiento con detergentes.

La mayoría de los anticuerpos no reconocen la proteína antigénica cuando se ha modificado ligeramente la estructura primaria o secundaria de su epítipo. Sin embargo, si sólo algunos sitios antigénicos en la proteína están afectados por esta modificación, el antisuero policlonal no reflejará un gran cambio

Figura 9. Espectros de dicroísmo circular de AgHBs\adw tratado con distintos detergentes. Los espectros representan la elipticidad media por residuo de AgHBs tras los siguientes tratamientos: a) colato sódico, b) triton X-100, c) sulfato dodecil sódico, d) octil glucosido, e) deoxicolato sódico y f) AgHBs sin tratar.

Longitud de onda nm

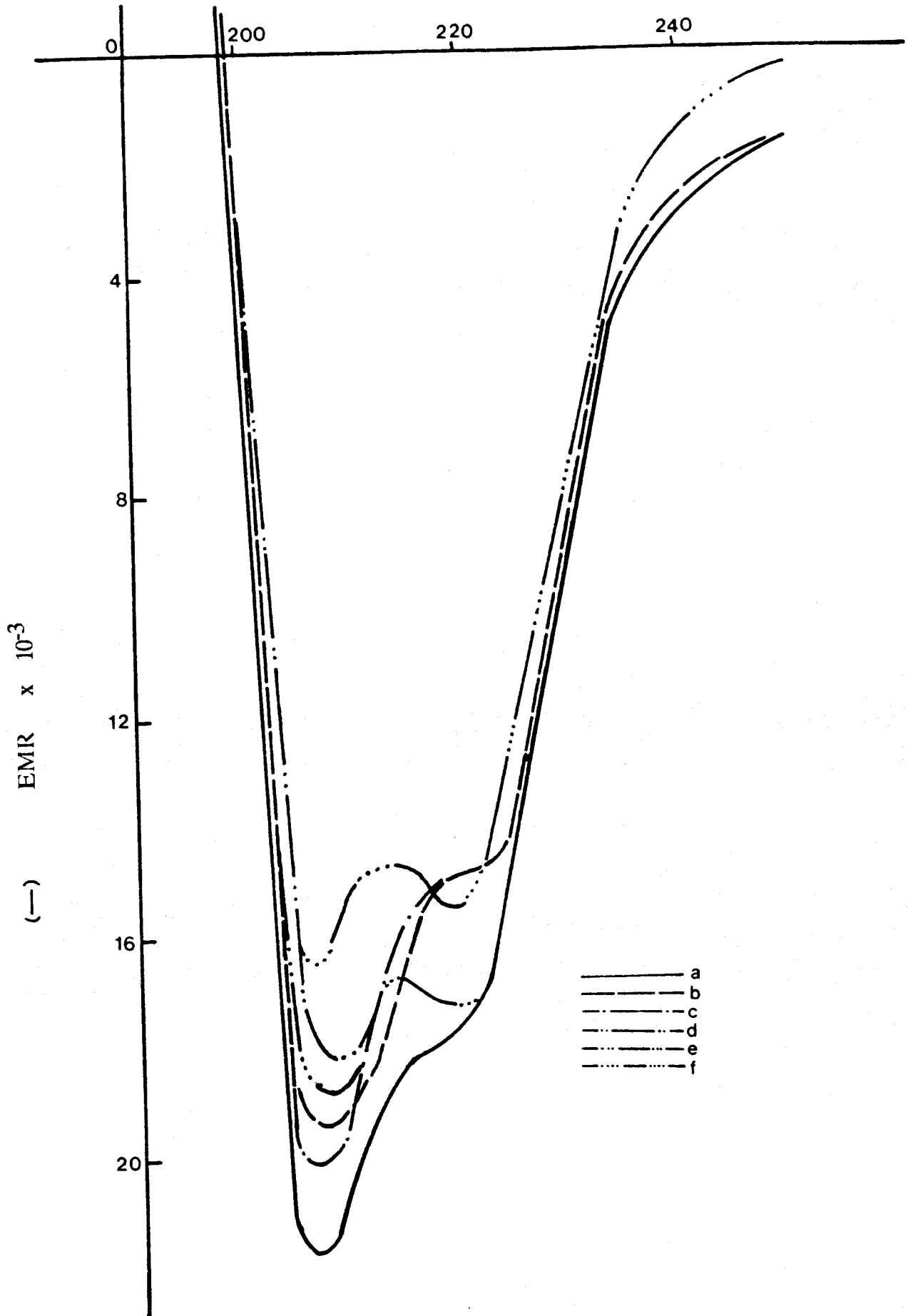


Tabla IV.-Radioinmunoensayos de anticuerpos monoclonales anti-AgHBs en presencia de AgHBs/adw tratado con distintos detergentes. En esta tabla se encuentran los % de inhibición del anticuerpo ensayado a distintas concentraciones de AgHBs inhibidor presente en solución y que compite con el AgHBs de la fase sólida del ensayo AUSAB.

Tratamiento del AgHBs	AgHBs ng/ml	P ¹	ANTICUERPO MONOCLONAL					
			H5	H12	H35	H53	H95	H166
Control sin tratar	500	100	32	4	91	62	57	25
	50		13	0	80	--	11	10
	5		10	0	45	--	3	2
Octil glucósido	500	24	24	4	69	5	44	12
	50		13	0	14	-	5	0
	5		8	4	6	-	0	1
Sulfato dodecil sódico	500	94	7	0	72	67	33	12
	50		0	0	0	--	4	0
	5		0	0	0	--	0	0
Triton X-100	500	88	13	0	84	23	43	37
	50		11	0	21	--	0	24
	5		6	0	8	--	0	8
Colato sódico	500	76	0	0	86	61	74	0
	50		0	0	21	--	0	0
	5		0	0	5	--	0	0
Deoxi colato sódico	500	84	28	22	95	50	80	8
	50		0	17	86	--	17	0
	5		0	0	12	--	19	0

¹ P= Unidades de radioinmunoensayo AUSRIA para determinar la antigenicidad de muestras que contienen AgHBs..

en su capacidad de unión a la muestra. Por esta razón, el efecto que el tratamiento con detergentes pudiera tener en el antígeno de superficie se investigó utilizando anticuerpos monoclonales que podían detectar con precisión los sitios que estaban más afectados tras la solubilización, y su relación con el cambio conformacional experimentado. En la tabla 4 se puede ver como todas las muestras exhibieron una menor antigenicidad tras el tratamiento con detergentes, como se comprobó con anticuerpos policlonales que median la antigenicidad total. La menos afectada fue la muestra tratada con deoxicolato, y la más afectada la tratada con octil glucósido. En esta tabla también se muestran los resultados obtenidos cuando la antigenicidad se midió con anticuerpos monoclonales en ensayos de inhibición. Entre los anticuerpos monoclonales se incluyen tres que identifican a antígenos del grupo **a**, H5, H35 y H166; también, uno específico del subtipo **d**, H95, y dos, H12 y H53, de especificidad aún no determinada. Para interpretar estos resultados se puede considerar que cuando la antigenicidad de estos sitios reconocidos por los monoclonales es igual o menor que la antigenicidad total de la muestra, estos sitios podrían estar asociados con la interacción de lípidos y proteínas, o podrían estar más afectados por el cambio conformacional como consecuencia de la solubilización de la proteína antigénica por detergentes. El antígeno tratado con octil glucósido estaba fundamentalmente afectado en su unión al anticuerpo monoclonal H53, como en el caso del antígeno tratado con triton X-100. El antígeno tratado con colato no sufrió

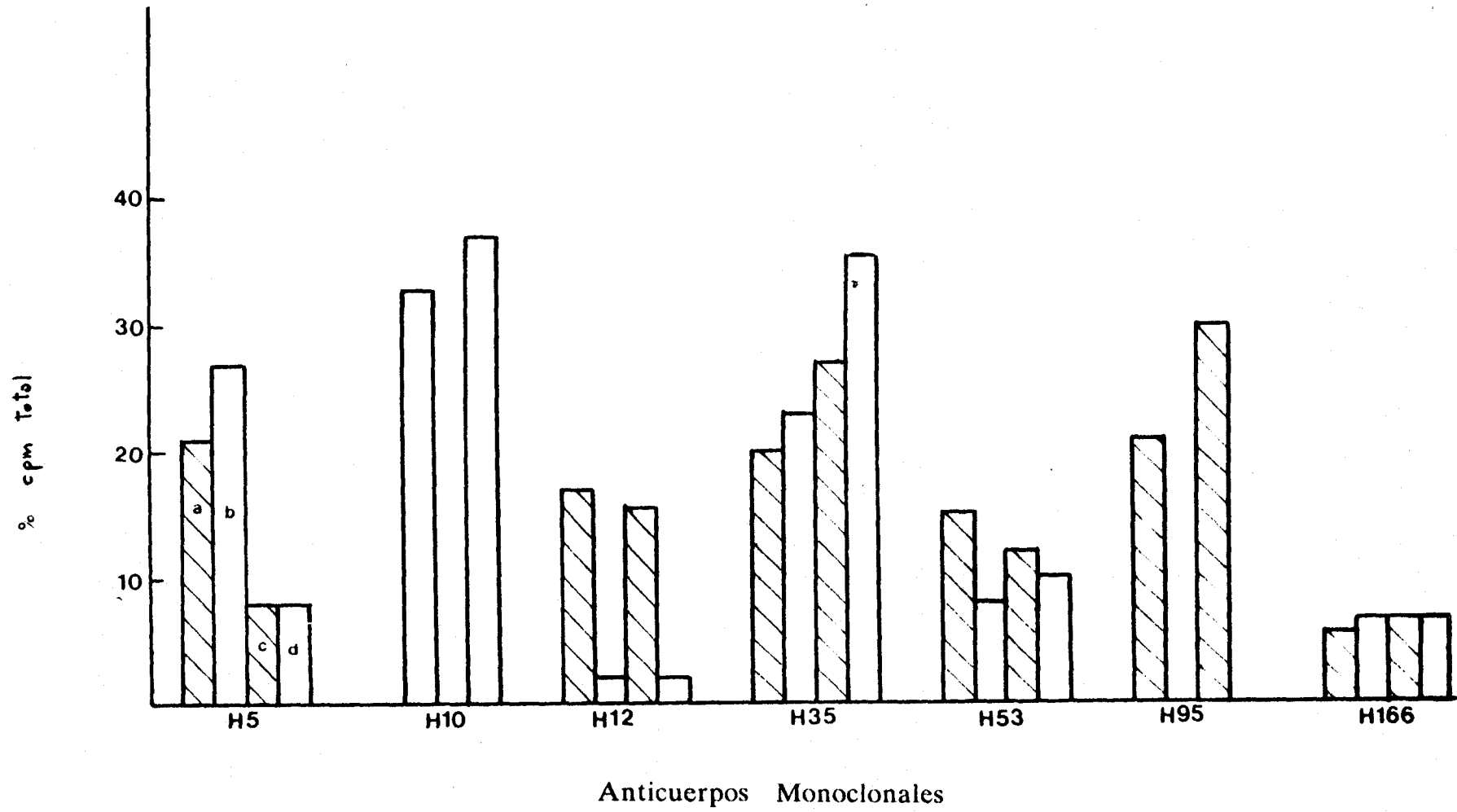
alteración en su sitio de unión para el anticuerpo monoclonal H53, pero sí en los de los anticuerpos monoclonales H5 y H166. En el caso del octil glucósido el sitio del H5 no se afectó tanto como el caso del antígeno tratado con triton X-100 o SDS, sin embargo, es posible que éste sea el sitio que se afecte más por los tratamientos con detergentes, ya sean estos iónicos, SDS, o no iónicos, octil glucósido y triton X-100. Al mismo tiempo la antigenicidad de algunos sitios de unión de anticuerpos monoclonales no resultó tan afectada como la antigenicidad total medida por policlonales, indicando quizás que estos sitios tienen poca relación con la interacción de lípidos y proteínas. Uno de estos sitios monoclonales que no mostró alteración tras el tratamiento con detergentes fue el sitio de unión del H95, quizás porque este sitio parece depender de la estructura primaria y por ello sólo estaría afectado con una modificación en la secuencia de aminoácidos (64).

Por lo tanto, la solubilización con detergente afecta la conformación y la antigenicidad del antígeno de superficie. Probablemente, la substitución de lípidos por moléculas de detergente da lugar a una nueva partícula en la que la proteína antigénica tiene una estructura secundaria más ordenada. El sitio de unión del H5 puede considerarse relacionado con la distribución de lípidos ya que es el más afectado por el tratamiento con detergentes. Los sitios de unión H53 y H166 podrían estar asociados con el proceso de solubilización, pero su asociación depende más del agente solubilizador que del proceso en si.

Estudio comparativo de la solubilización de AgHBs de los subtipos ayw y adw utilizando anticuerpos monoclonales

Para estudiar si la interacción de lípidos y proteínas en el antígeno de superficie podría depender del subtipo del antígeno, el antígeno del subtipo ayw fue solubilizado a la vez con el subtipo adw, utilizando un detergente no iónico, octil glucósido. Los cambios en ambos antígenos fueron detectados con anticuerpos monoclonales. Como se puede ver en la figura 10, la delipidación del antígeno disminuyó algunas de las diferencias observadas entre los antígenos nativos, no desnaturalizados con el detergente. La unión de H5 que era más alta en el ayw que en el adw, fue la misma en ambos después del tratamiento con octil glucósido, y la unión de H53 que era mucho menor en el caso del ayw llegó a ser la misma en ambos tras este tratamiento. Sin embargo, la unión de los anticuerpos monoclonales H12 y H166 no varió, y la de H35 aumentó un 25% sobre la del adw después de la solubilización. Como se ha observado antes en el caso del antígeno adw, la antigenicidad del ayw estuvo también afectada en la unión del H5 y H53. Así pues, es posible concluir que la solubilización no afecta a los sitios específicos de subtipo, sino que parece afectar a los determinantes del grupo a y quizás pueda disminuir las diferencias existentes entre ellos.

Figura 10. Radioinmunoensayo de AgHBs\adw y ayw solubilizados con octil glucosido. Las muestras antigénicas se incubaron con la fase sólida del radioinmunoensayo AUSRIA que contiene anticuerpos anti-AgHBs, y el antígeno unido se incubó con distintos anticuerpos monoclonales anti-AgHBs que estaban marcados con I^{125} . El % de unión de cada anticuerpo monoclonal se expresa en relación al número total de cpm unido a dicha muestra. Las columnas identifican las siguientes muestras: a) AgHBs\adw sin tratar, b) AgHBs\ayw sin tratar, c) AgHBs\adw tratado con octil glucosido y d) AgHBs\ayw tratado con octil glucosido.



Purificación utilizando gradientes de densidad en cloruro de cesio , de las partículas antigénicas tratadas con detergente.

Los ensayos realizados hasta en las muestras tratadas con detergentes incluían los lípidos y los agentes solubilizantes empleados en su eliminación de las partículas víricas. Sin embargo, nos pareció importante separar los lípidos de las moléculas de detergente para así conseguir una solución más pura de partículas antigénicas. Esto fue posible mediante la utilización de gradientes de cloruro de cesio que podían separar las distintas especies antigénicas de acuerdo a su distinta densidad. Los detergentes utilizados en estos experimentos fueron el octil glucósido y el triton X-100.

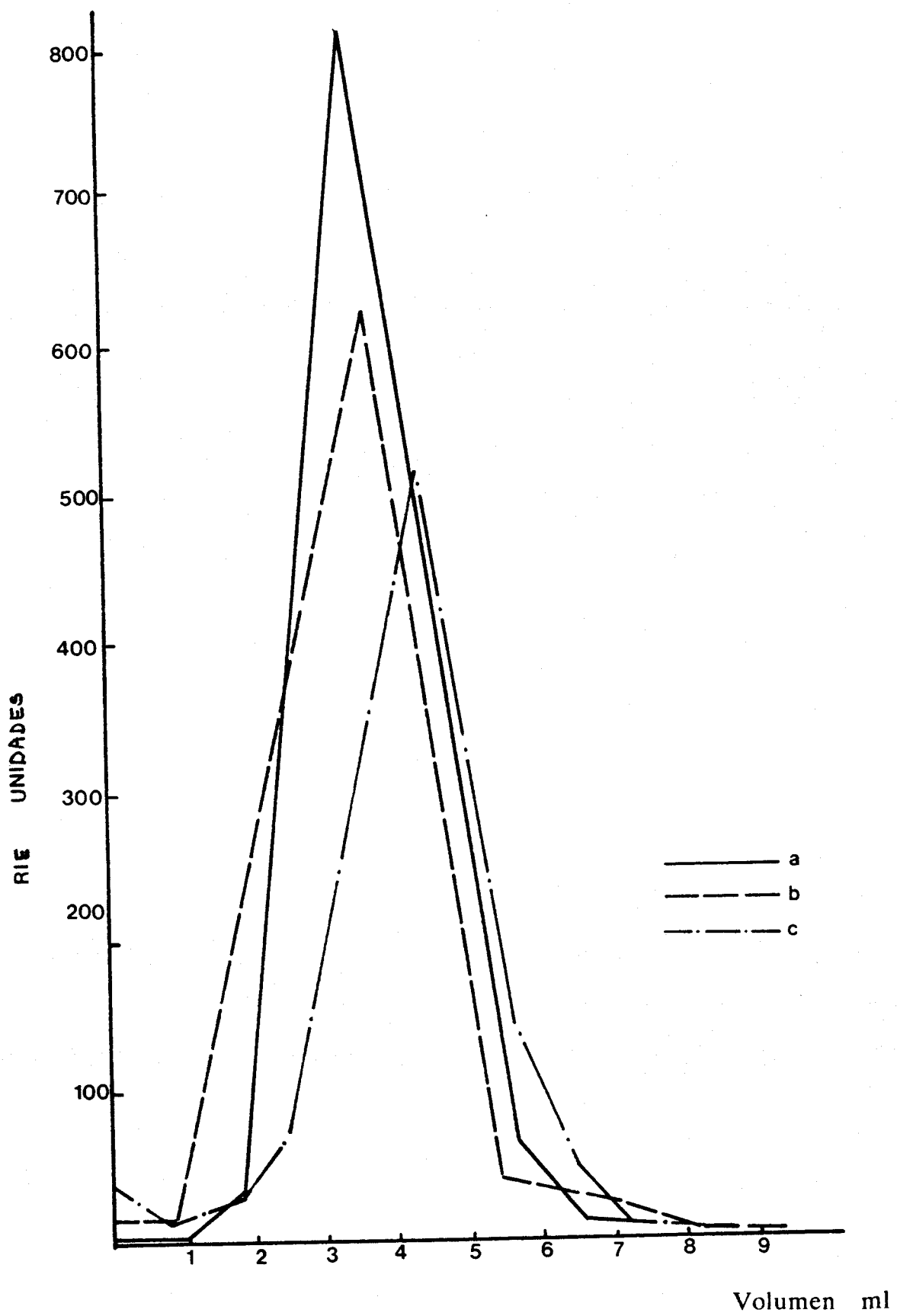
Densidad de los antígenos solubilizados.

Las fracciones aisladas de los gradientes de densidad fueron analizadas para ver su antigenicidad como muestra la figura 11, y las fracciones más antigénicas se colectaron para llevar a cabo los posteriores análisis. La fracción antigénica tratada con triton X-100 fue la más densa (1,27 mg/ml), seguida de la tratada con octil glucósido (1,25 mg/ml) y finalmente la fracción de antígeno nativo (1,21 mg/ml).

Conformación de las proteínas del antígeno de superficie en la micelas antigénicas.

Para estudiar la conformación de las muestras aisladas de los gradientes, se utilizó espectroscopía de dicroísmo circular. La determinación de la concentración de la proteína antigénica en

Figura 11. Distribución del AgHBs\adw tratado con detergentes en las fracciones recogidas de gradientes lineales de densidad en cloruro de cesio (1,10 a 1,45 g/ml). La concentración antigénica está expresada en las unidades del radioinmunoensayo AUSRIA. El volumen del gradiente fue de 10ml, y el de la muestra 0,5-0,7ml, recogiendo un total de aproximadamente 10,7ml en fracciones de 0.7ml. Las muestras experimentales están identificadas como a) AgHBs nativo sin tratar, b) AgHBs tratado con octil glucosido y c) AgHBs tratado con triton X-100.

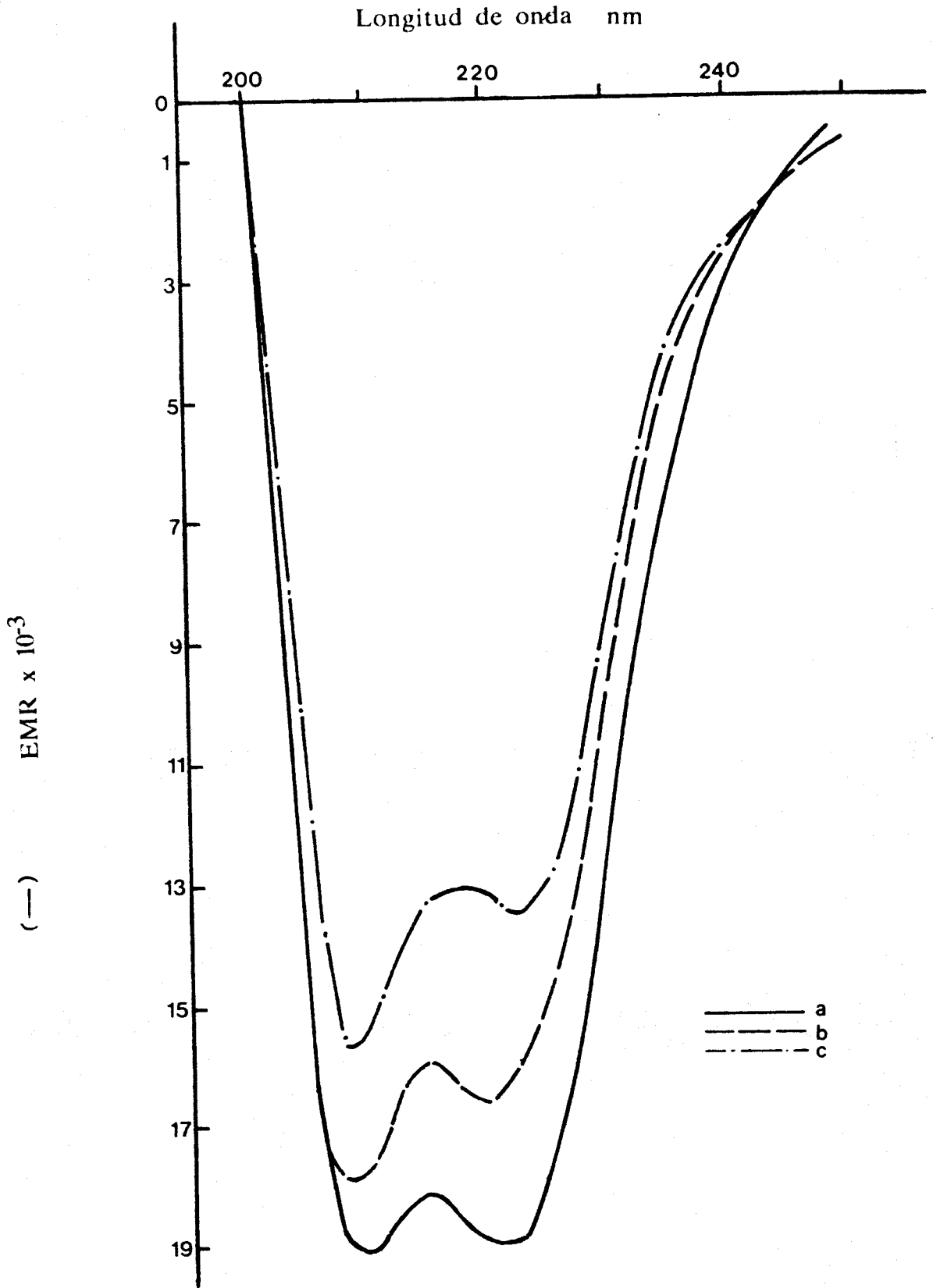


las distintas fracciones se llevo a cabo midiendo la absorción de la muestra a 280nm y la pureza de esta se comprobó por su espectro de 350 a 240 nm. El contenido en alfa hélice de los espectros de dicroísmo circular se calculó por su helipticidad a 208nm (89,90). En los espectros de DC que se muestran en la figura 12 se puede observar que el antígeno tratado con triton X-100 tiene el mayor contenido en alfa hélice (53%), seguido del antígeno tratado con octil glucósido (49%), y finalmente el antígeno nativo (40%). Por lo tanto, el contenido en alfa hélice de las fracciones aisladas del gradiente de densidad no experimenta un considerable cambio con respecto al material de partida, y se puede concluir que la eliminación de lípidos de estas soluciones micelares no da lugar a cambios apreciables en la conformación de la proteína antigénica.

Análisis de las fracciones antigénicas aisladas del gradiente de densidad utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales.

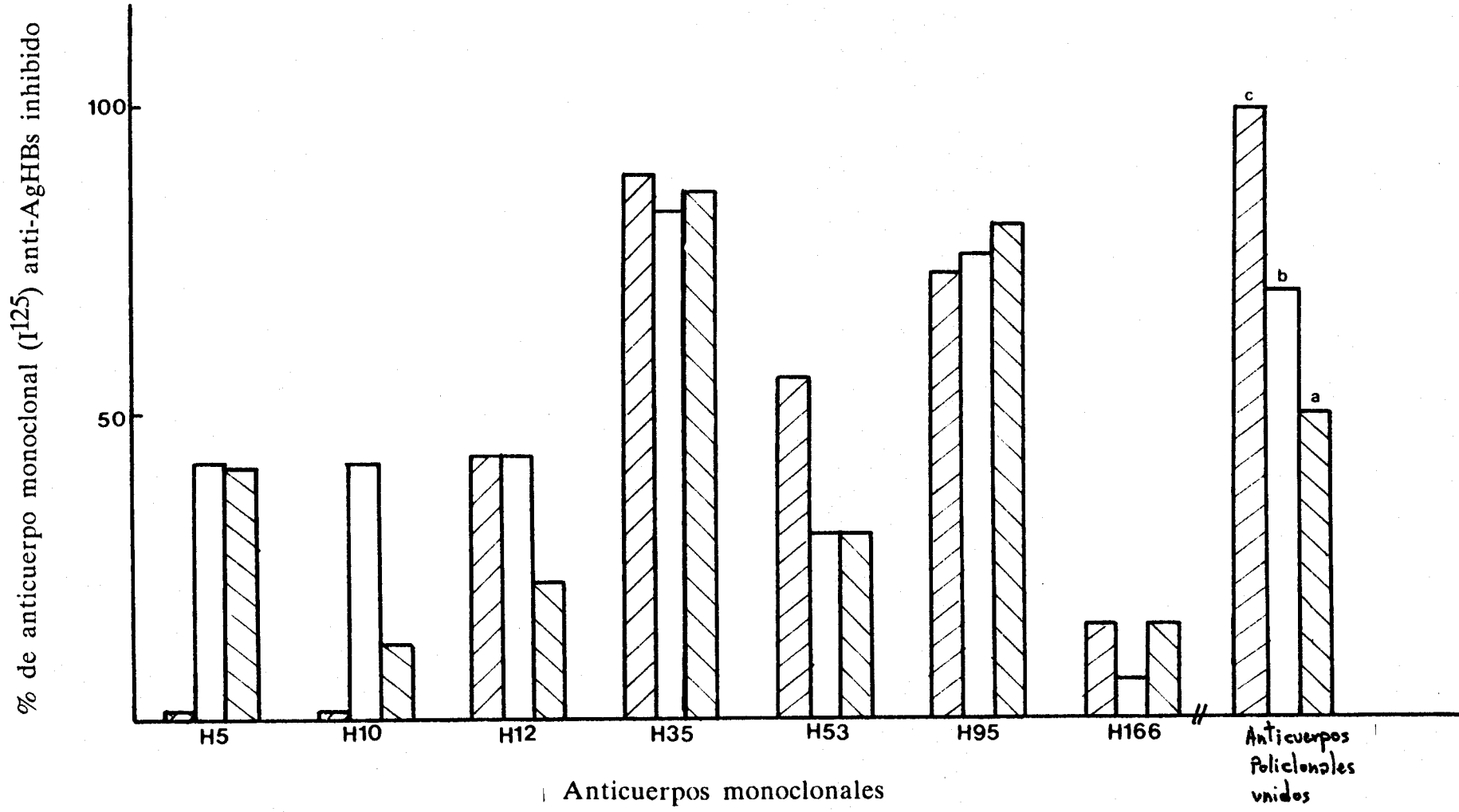
Las fracciones antigénicas colectadas del gradiente de densidad del cloruro de cesio fueron analizadas en estudios de competición con anticuerpos contra el antígeno de superficie. Los anticuerpos utilizados inhibían la unión del antígeno a otros anticuerpos que estaban cubriendo la superficie de la fase sólida del ensayo. Esta inhibición dependía de la capacidad de unión del antígeno y el anticuerpo y se prefirió a la inhibición de anticuerpo con antígeno debido a la baja antigenicidad detectada en algunas fracciones.

Figura 12. Espectros de dicroísmo circular de AgHBs\adw contenido en fracciones recogidas del gradiente lineal de densidad indicado en la figura 11. Las fracciones estudiadas corresponden a los picos de antigenicidad de cada muestra: a) AgHBs tratado con triton X-100, b) AgHBs tratado con octil glucosido y c) AgHBs sin tratar. Los espectros representan la elipticidad media por residuo (EMR).



En la figura 13 se pueden comparar las antigenicidades de las muestras del gradiente con respecto a los anticuerpos monoclonales disponibles. La muestra de antígeno, que fue tratada con octil glucósido y aislada del gradiente sólo retuvo un 43% de su antigenicidad inicial. La muestra tratada con triton X-100 mostró una disminución similar a la del antígeno tratado con octil glucósido. Esta antigenicidad fue incluso menor que la determinada en el material de partida que se sometió al gradiente. Como se puede ver en la figura 13 la capacidad de unión de los anticuerpos monoclonales a estas muestras fue de distinta magnitud, aunque en general mostraron un perfil parecido. La diferencia más destacada fue la presentada por el anticuerpo monoclonal H5 que aumentó su unión al antígeno de siete a diez veces, en las muestras tratadas con triton X-100 y octil glucósido respectivamente. También H12 aumentó su capacidad de unión al antígeno una vez tratado con detergente, pero sólo de dos a tres veces sobre la observada con el antígeno nativo. Los anticuerpos monoclonales H35 y H95 no experimentaron ningún cambio en su unión al antígeno tratado con detergente. Sin embargo, H53 tuvo una gran disminución en su unión al antígeno tratado con octil glucósido (cinco veces menor que la unión al nativo), y sólo una moderada disminución en su unión al tratado con triton X-100 (dos veces la control). Finalmente, el H166 no pudo unirse al antígeno tratado con octil glucósido, pero, pudo aumentar su unión al tratado con triton X-100. El hecho de que el monoclonal H5 aumentase su capacidad de unión a las muestras

Figura 13. Radioinmunoensayo de las fracciones de AgHBs cuyo espectro se muestra en la figura 12. El ensayo se llevó a cabo en presencia de anticuerpos monoclonales anti-AgHBs que podían competir con los anticuerpos policlonales unidos a la fase sólida del ensayo (AUSRIA). El % de inhibición refleja la disminución de AgHBs unido a la fase sólida del ensayo y que resultó en menor contenido en cpm de la fase sólida tras una segunda incubación con los anticuerpos policlonales anti-AgHBs marcados con I^{125} . En esta misma figura se muestra la antigenicidad relativa de las tres muestras ensayadas en ausencia de anticuerpos monoclonales. Las columnas representan las muestras tratadas con a) triton X-100 y b) octil glucosato, y c) representa al antígeno nativo.



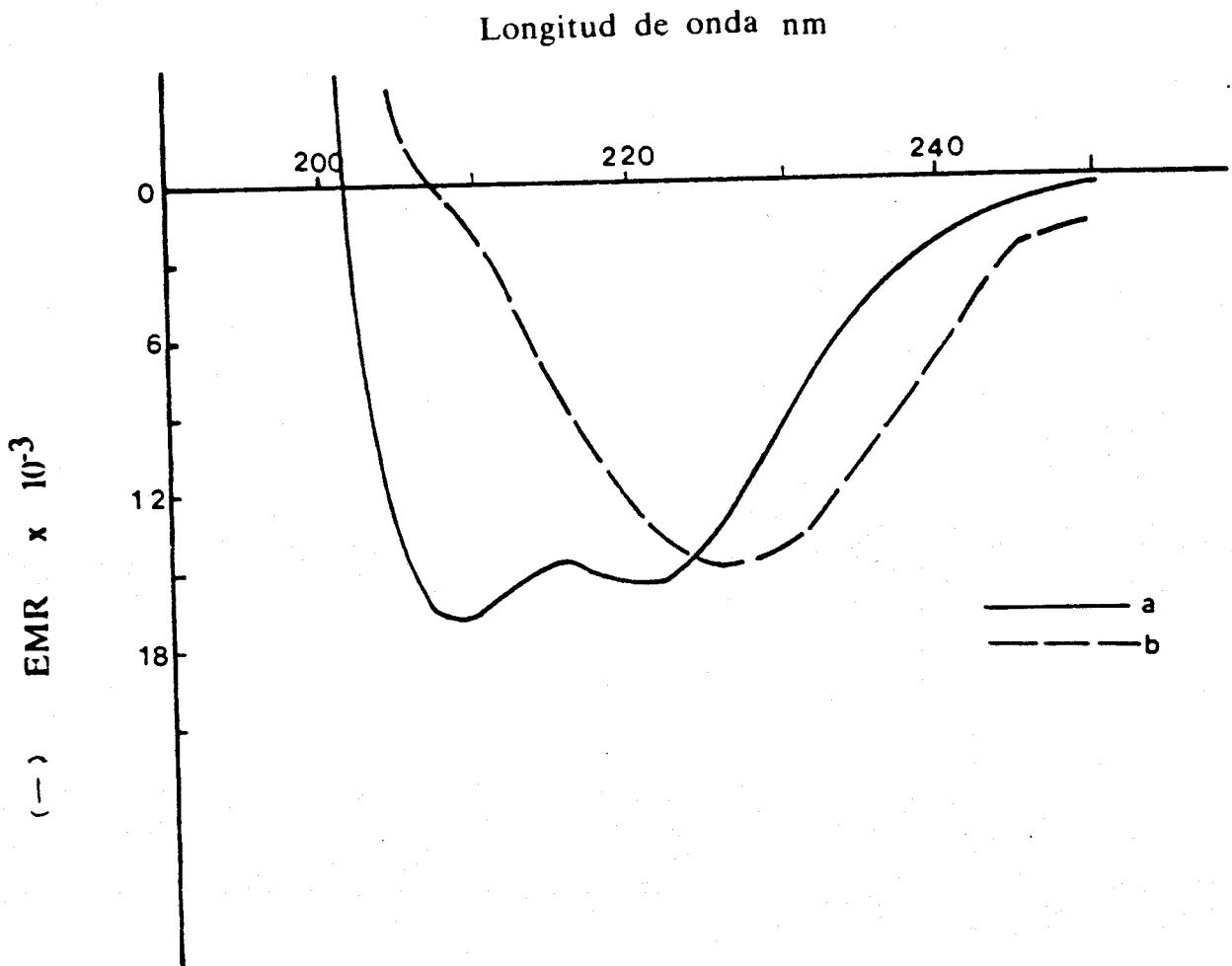
tratadas indica una vez más, la posible relación de este sitio con las posibles áreas de interacción de lípidos y proteínas. Al mismo tiempo la disminución de unión al sitio reconocido por H53 también indica esta asociación del epítipo con los lípidos de la cubierta vírica. Por lo tanto, los sitios reconocidos por H5 y H53 deben localizarse en áreas afectadas por los lípidos del antígeno de superficie o, al menos, estarían más asociados con los lípidos que los sitios identificados por H35 o H95 caso. El comportamiento poco claro del H166 podría sugerir una localización altamente sensible a la carga y al tamaño de las micelas de detergente. Por último queda advertir que del anticuerpo monoclonal H12 al no haber sido apropiadamente determinado en el material de partida, no puede servir para aportar información precisa sobre la localización de los lípidos.

**Estudio de las partículas antigénicas tratadas con detergentes y altas temperaturas en presencia de agentes reductores .
Purificación en gradientes de densidad de cloruro de cesio .**

Ya que la solubilización en presencia de detergentes no fue suficiente para liberar los monómeros de proteína de las subunidades antigénicas, se intentó solubilizar el antígeno en presencia de agente reductor, y más tarde se purificó en gradientes de densidad. Las muestras sometidas a temperaturas de ebullición en presencia de detergentes con o sin agentes reductores, tenían una solubilidad muy baja y tendían a agregarse. Tras la separación de distintas especies en el gradiente de cloruro de cesio, todas estas muestras parecían ser

más densas que la control, que no estaba tratada. La muestra no reducida y tratada con octil glucósido tenía una densidad aproximada de 1,25 mg/ml, y el resto de las muestras tenían una densidad cercana a 1,27 mg/ml. Los espectros de DC comprendidos entre 250 y 185 nm no mostraron ninguna estructura ordenada en estas fracciones. Solamente la muestra no reducida y tratada con octil glucósido mostró un espectro de absorción correspondiente a la existencia de estructura secundaria. Como se puede ver en la figura 14 su máximo se hallaba a 226nm, y no correspondía al de ninguna estructura secundaria conocida. Quizás refleje una contribución igual de distintas conformaciones. Los únicos factores que podrían haber contribuido al cambio conformacional experimentado por estas muestras son, la alta temperatura de ebullición y la presencia de agentes reductores. Sin embargo, ni la reducción de los puentes disulfuro, ni las altas temperaturas de ebullición han afectado los espectros de DC obtenidos en previos experimentos. Por lo tanto, se puede sugerir que sólo la combinación de ambos factores puede causar el cambio en la estructura secundaria observado durante la solubilización del antígeno con detergente. Cuando el antígeno se reduce y solubiliza puede liberar las proteínas monoméricas que por su gran insolubilidad son inestables y precipitan incluso antes de retirar los lípidos en el gradiente. Sin embargo, es más difícil de explicar el cambio conformacional experimentado en la muestra que se calentó en presencia de detergente y más tarde se pudo aislar en el gradiente de densidad. Una posible explicación es que la

Figura 14. Espectros de dicroísmo circular de AgHBs contenido en fracciones recogidas de gradientes lineales de densidad en cloruro de cesio. La muestra aplicada al gradiente había sido sometida a ebullición en presencia de 2% de octil glucosido. Los espectros representan la elipticidad media por residuo (EMR) de a) AgHBs tratado y b) AgHBs sin tratar.



muestra formó micelas de proteína-proteína después de la retirada de los lípidos y del detergente. Esta última fracción que presumiblemente contenía micelas de proteína-proteína podría haber tenido también micelas de proteína-detergente pero en menor número que las muestras no sometidas al calor.

Estudio de la estructura del antígeno de superficie de la hepatitis B

Distribución de la proteína en el antígeno de superficie.

El modelo del antígeno de superficie propuesto por Tiollais et al (35) predice varias características en la distribución de la proteína antigénica en la lipoproteína que no se ha sometido a pruebas experimentales. Básicamente el modelo propuesto por Tiollais describe el antígeno como un dímero formado por dos unidades de proteína, una glicosilada y otra sin glicosilar. Ambas estarían unidas por un puente disulfuro y su peso molecular aparente sería de 55.000 daltons. El extremo carboxilado se presenta en el interior de la capa lipídica y el amino estaría fuera de dicha capa, en un monómero expuesto al exterior de la partícula y en el otro estaría dentro. Las regiones de las cadenas polipeptídicas en la matriz son idénticas, ya que la única diferencia en la distribución de las proteínas es la orientación con respecto al exterior de la partícula.

Los experimentos descritos a continuación tratarán de aportar datos con el fin de clarificar : el número de unidades proteicas unidas entre sí y el tipo de unión en la partícula vírica, la extensión de la glicosilación de estas unidades y los fragmentos expuestos al exterior, y por lo tanto supuestamente responsables de la inmunogenicidad de la partícula.

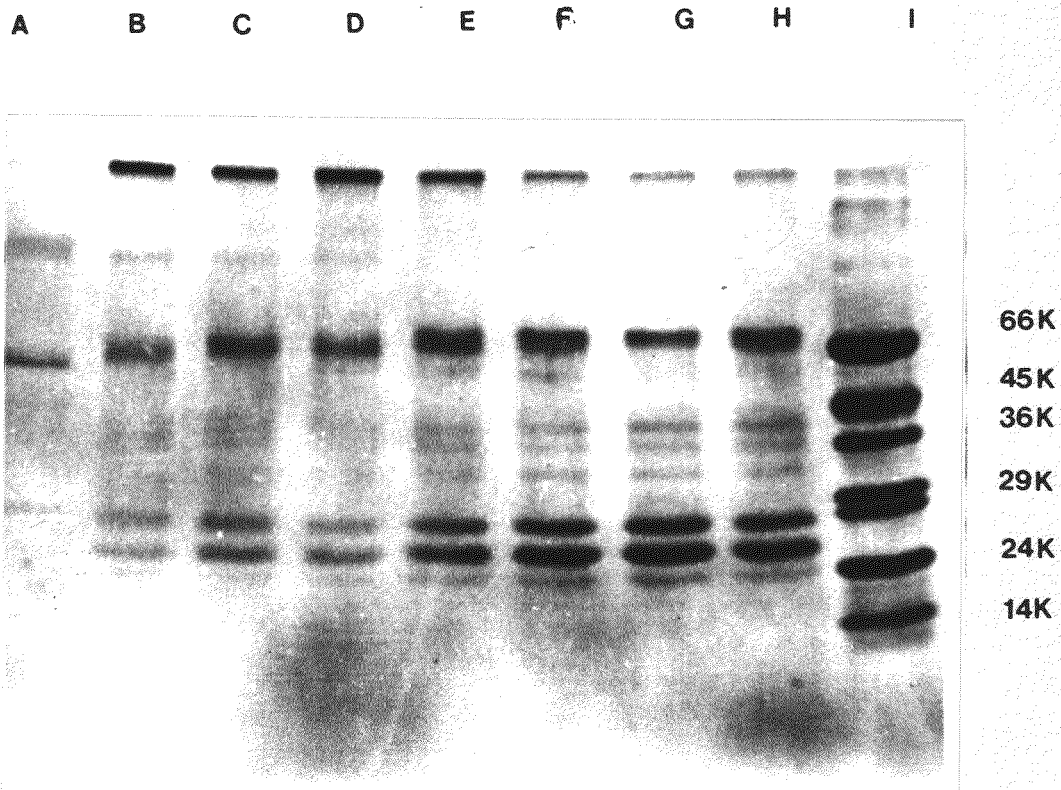
Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y agente reductor.

Con el fin de investigar el papel de los puentes disulfuros en la estabilidad de los monómeros proteicos en la subunidades del antígeno de superficie, las partículas antigénicas se sometieron a electroforesis tras un tratamiento reductor que consistió en un incremento gradual en la concentración de 2-mercaptoetanol. La concentración experimental del agente reductor varió entre un 0,08% a un 5,00%. Como se puede ver en la figura 15 la concentración de las bandas monoméricas es directamente proporcional a la cantidad utilizada del agente reductor. Es también aparente que la proporción de la forma glicosilada y no glicosilada no es 1:1, sino más bien 1:2. Más aún, en presencia de SDS y ausencia de agente reductor no es posible visualizar ninguna especie de peso molecular 55.000, que correspondiera al dímero propuesto por Tiollais et al.(35).

Ultracentrifugación analítica.

El antígeno del subtipo adw fue solubilizado durante 16 horas a temperatura ambiente utilizando 2% de SDS y bajo condiciones reductoras (0.1% 2-mercaptoetanol) o no reductoras. En la figura 16 se representan los resultados obtenidos mediante ultracentrifugación analítica de las muestras mencionadas. Se puede ver que mientras el antígeno sin reducir presenta un recorrido aproximado al correspondiente a su peso molecular nativo, el antígeno reducido y tratado con detergente parece tener unidades de menor peso molecular que no aparecen

Figura 15. Electroforesis del AgHBs\ayw en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. El antígeno fue tratado con concentraciones crecientes de 2-mercaptoetanol en el buffer de preparación de la muestra. Las concentraciones utilizadas fueron: A) 0%, B) 0,08%, C) 0,16%, D) 0,33%, E) 0,67%, F) 1,20, G) 2,50 y H) 5,0%. Las bandas en I) corresponden a los marcadores del peso molecular.



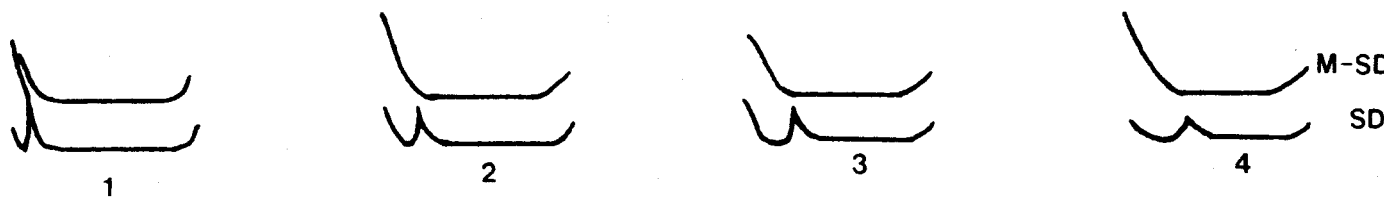


Figura 16. Ultracentrifugación analítica del AgHBs tratado con 2% SDS bajo condiciones reductoras (0.1% 2-mercaptoetanol) o no reductoras (perfil inferior). En esta figura se refleja el recorrido de la muestra observado con el sistema óptico de Schlieren de contraste de fases en intervalos de 5 minutos.

incluso cuando la muestra sin reducir ha recorrido más de un tercio de la celdilla. Estos resultados están de acuerdo con las bandas aparecidas en la figura 15, y apoyan la no existencia de subunidades con un peso molecular de 55.000 daltons como subunidades proteicas únicas en el antígeno de superficie.

Susceptibilidad del antígeno de superficie a la digestión proteica.

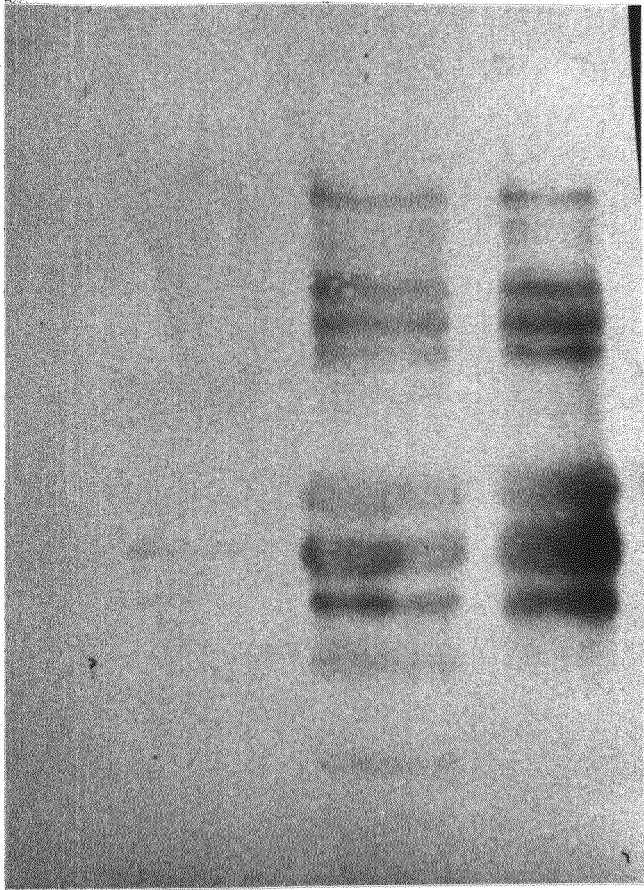
El modelo propuesto lleva a pensar que ciertas regiones de la glicoproteína GP-30 y la proteína P-25 presentan distintas susceptibilidades a las proteasas. En concreto, se podría pensar que la GP-30 sería susceptible en la región comprendida entre los residuos 169-98 y 1-6, y que P-25 lo sería, y sólo en los aminoácidos comprendidos entre el 28 al 79. Además, según este modelo dimérico las aminopeptidasas serían las únicas enzimas que podrían digerir los extremos proteicos, ya que el extremo carboxílico se encuentra enterrado en este modelo.

Digestión con endopeptidasas: Tripsina, quimitripsina, y proteasa V-8.

La digestión con tripsina fue posible bajo condiciones reductoras suaves, y parece ser que sólo afectó al residuo 122 (62), como se comprobó en electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. La digestión tripsinica resultó en dos bandas correspondientes al extremo amino de 122 aminoácidos, y otra correspondiente al resto de los aminoácidos comprendidos entre 122 y 226, como se ha comprobado

Figura 17. Inmunolectroforesis de AgHBs sometido a proteolisis con tripsina. La electroforesis se llevó a cabo en gel de poliacrilamida y el inmunoensayo se realizó en filtro de nitrocelulosa al que se habían transferido las distintas bandas electroforéticas. Las bandas observadas corresponden a: A) AgHBs\adw tripsinizado, B) AgHBs\adw nativo, C,E) AgHBs\ayw tripsinizado, D,F) AgHBs\ayw nativo. De A) a D) el papel se incubó con anticuerpos de conejo, policlonales anti-AgHBs\ayw, mientras que E) y F) se incubaron con anticuerpos policlonales específicos del subtipo adw. La visualización de las bandas se debe a la reacción mediada por un enzima peroxidasa conjugada a un segundo anticuerpo que reaccionó con los anticuerpos de conejo. (P-25= proteína de 226 aminoácidos, GP-30=forma glicosilada de P-25, TP-25-1= extremo amino de P-25 tripsinizada, TP-25-2= extremo carboxílico de P-25 tripsinizada, TGP-30-1= extremo amino de GP-30 tripsinizada, TGP-2= extremo carboxílico de GP-30 tripsinizada)

A B C D



— GP-30
— P-25 —
— [TP-25-1
— [TGP-30-1
— [TGP-30-2
— TP-25-2

E F

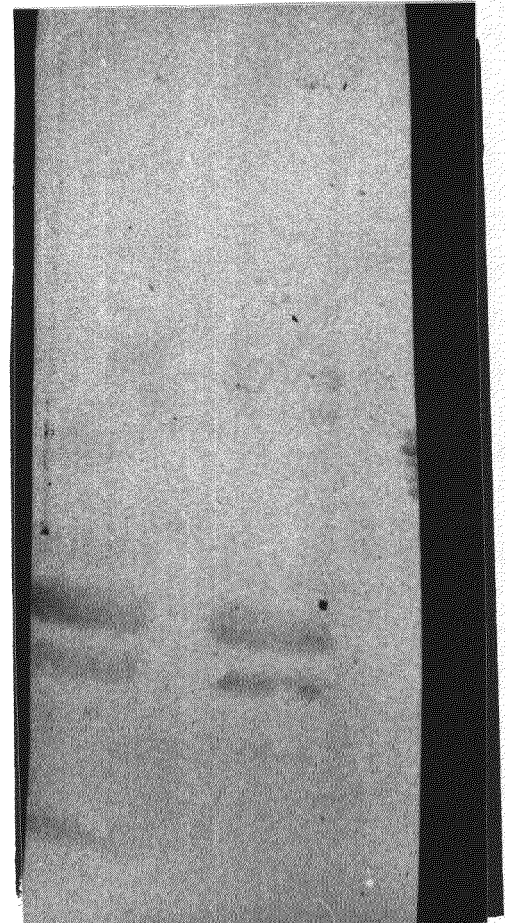
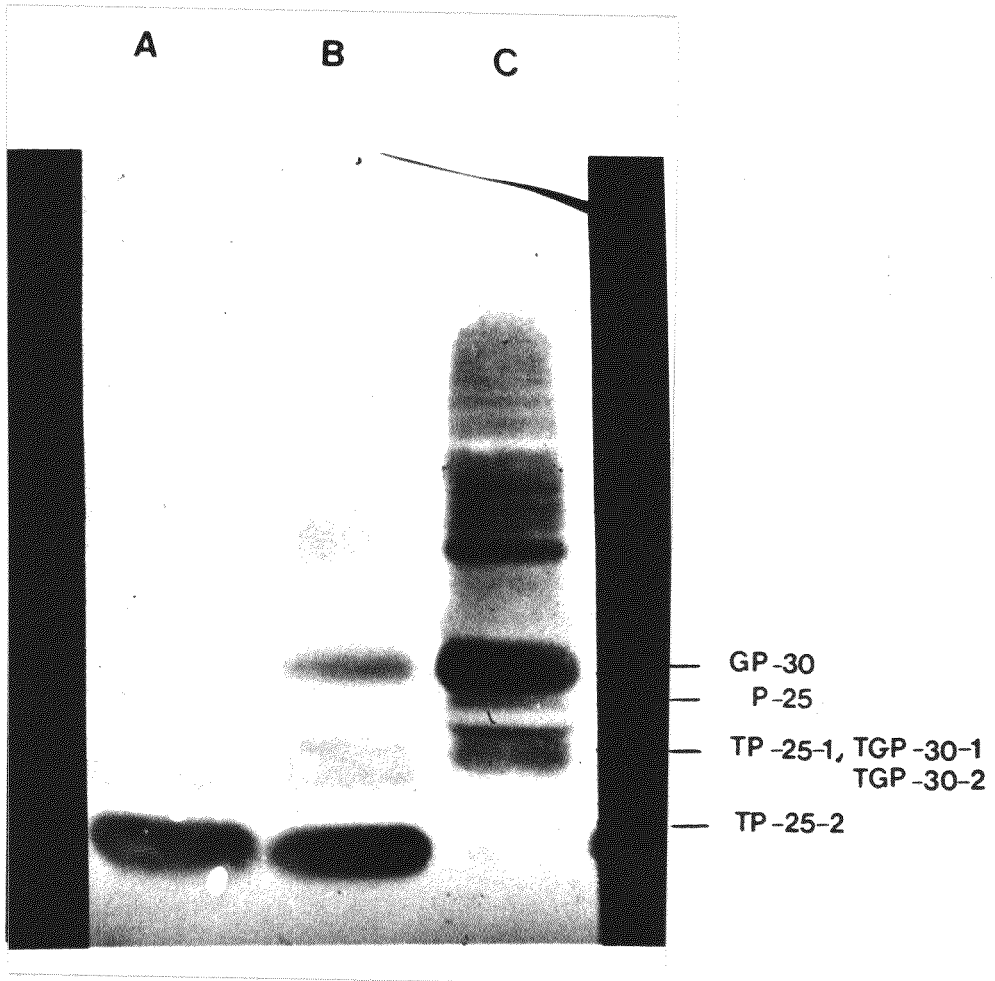


Figura 18. Inmunolectroforesis de AgHBs\ayw sometido a proteolisis con quimotripsina (A) y tripsina (B). La técnica empleada en este inmunoensayo fue similar a la descrita en la figura 17. Las bandas se corresponden con los fragmentos de la figura anterior. En este experimento los anticuerpos policlonales anti-AgHBs empleados fueron específicos para el AgHBs\ayw (APES anti-y). En C) se encuentra el ensayo del AgHBs\ayw nativo.



anteriormente (43). No es posible visualizar por separado todas las bandas correspondientes a las dos formas de la proteína, ya que el extremo terminal de la GP-30 tiene un peso similar al del extremo amino de ambas proteínas y como resultado la banda superior es considerablemente más obvia al incluir casi un 75% de la proteína digerida. La transferencia de estas bandas a un papel de nitrocelulosa fue posible mediante la técnica Western de inmunotransferencia, a continuación el filtro que contenía las bandas se incubó con los anticuerpos policlonales específico de subtipo (APES). Aunque los APES anti γ y pudieron teñir ambas bandas, la de menor peso molecular pudo unir más anticuerpos y parecía más abundante (figura 17 y 18). Al mismo tiempo los APES anti δ no pudieron teñir las bandas de forma similar a los APES anti γ , aunque si pudieron reconocer el material sin digerir, P-25 y GP-30 (figura 19). La digestión con quimotripsina fue también posible bajo condiciones reductoras suaves y en electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS se pudieron visualizar dos bandas de tamaño similar al de la digestión con tripsina (figura 19). Por lo tanto, el enzima debió reaccionar con la región cercana al aminoácido 122, quizás en el residuo de tirosina 134. El filtro de nitrocelulosa que contenía las bandas resultantes de la digestión con quimotripsina se tiñó de forma similar a la obtenida con las bandas de digestión con tripsina (figura 19). La digestión con la proteasa V-8 no logró cortar el antígeno, o si lo hizo, no resultó en una digestión visible en la

Figura 19. Inmunolectroforesis de AgHBs\adw sometido a digestión con tripsina. La técnica empleada fue la descrita en la figura 17 y los fragmentos resultantes se denominan como en esta figura. El inmunoensayo se llevó a cabo con anticuerpos de cobaya, policlonales y específicos para el AgHBs\adw. La AgHBs tripsinizado se encuentra en A), mientras que B) contiene el AgHBs\adw nativo y C) el AgHBs\ayw nativo.



TP-25-2 —

— GP-30
 — P-25
 — TGP-30-1 TGP-30-2
 TP-25-1

electroforesis. No obstante se esperaba que este último enzima pudiera cortar los residuos de aspártico en 99 y 144.

Digestión con exopeptidasas.

La carboxipeptidasa Y pudo digerir aproximadamente un 25% del extremo carboxílico del antígeno bajo condiciones reductoras, y más de un 35% cuando la digestión se realizó en presencia de detergente y agente reductor. Aunque la visualización precisa de las distintas especies digeridas no fue posible, sin embargo, en electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS la difusión de las bandas primarias , P-25 y GP-30, puede interpretarse como consecuencia de la digestión secuencial del extremo carboxílico (figura 20). Otra prueba de la digestión carboxílica se obtuvo observando el espectro de dicroísmo circular, en el que se ha perdido más de un 60% de la alfa hélice (figura 21). Al mismo tiempo la carboxipeptidasa A no pudo alcanzar los aminoácidos de la secuencia que carboxipeptidasa Y digirió, y sólo pudo liberar los seis primeros residuos. La leucino aminopeptidasa utilizada no pudo procesar el amino terminal, incluso después de que la proteína se tratase con SDS o octil glucósido, que había demostrado ser eficiente en el caso de la digestión del amino terminal de la mioglobina.

Conclusiones

Basandose en estos estudios se puede concluir que el modelo propuesto por Tiollais (35) es totalmente erróneo. Un modelo

Figura 20. Electroforesis de AgHBs\adw sometido a digestión con carboxipeptidasa Y. En los distintos pocillos se aplicaron las muestras resultantes de la digestión parcial del antígeno a intervalos progresivos de tiempo, así A) 0 horas, B) 1 hora, D) 3 horas, F) 24 horas y H) más de 120 horas. Las líneas próximas a las mencionadas se digirieron por el mismo tiempo ya mencionado y en presencia de octil glucósido.

A B C D E F G H I

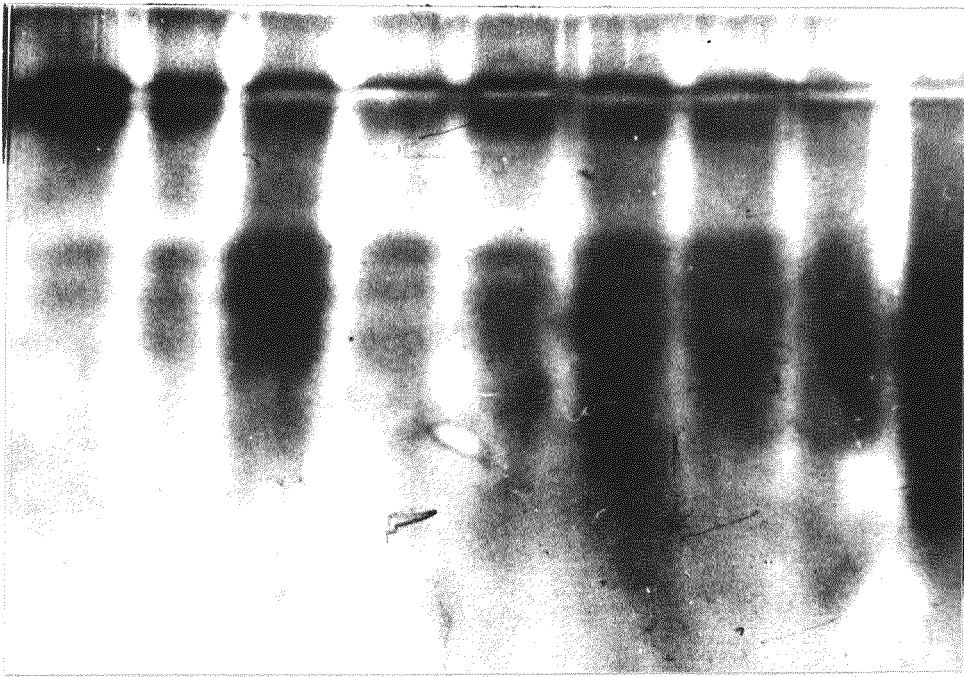
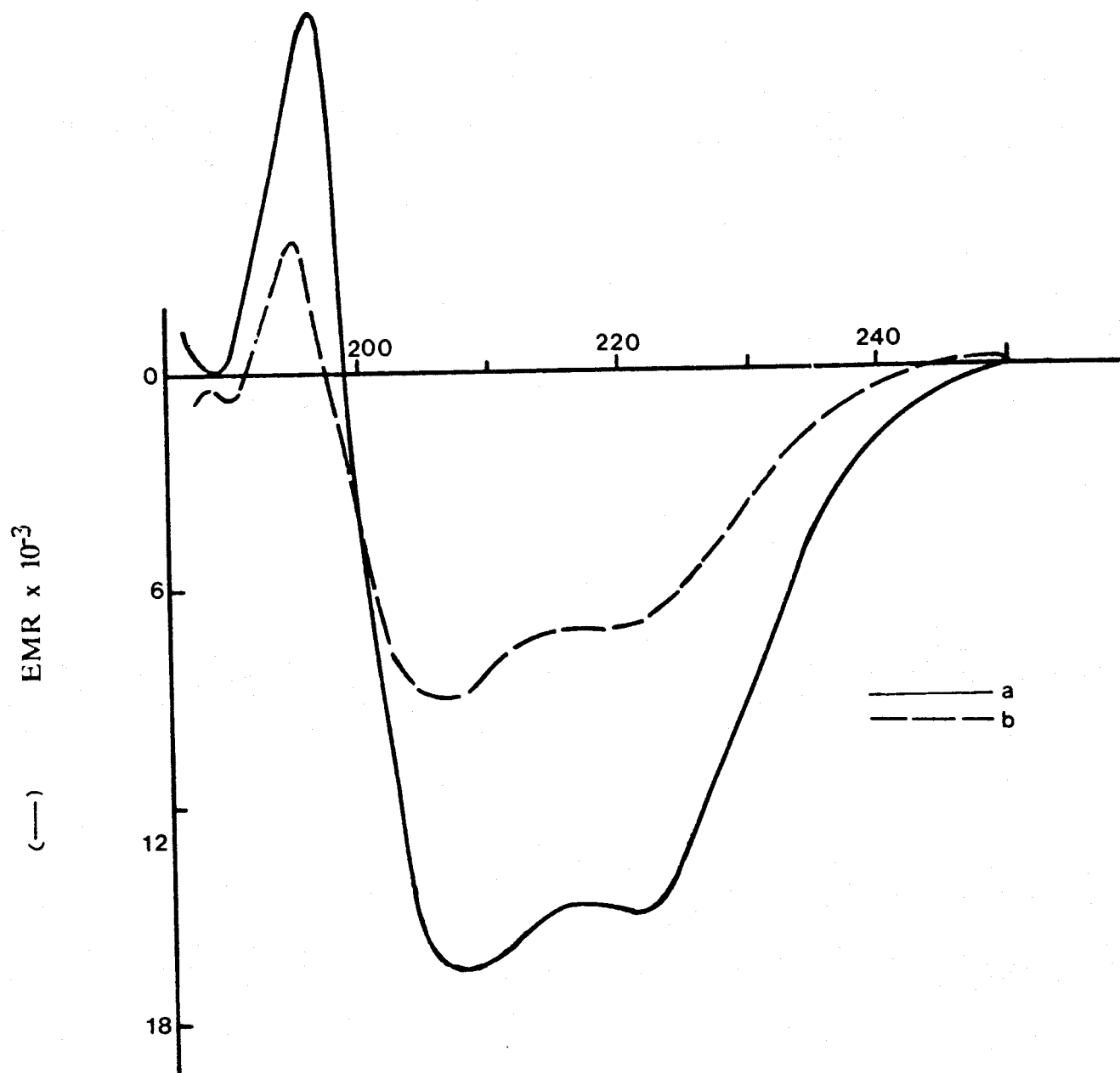


Figura 21. Espectro de dicroísmo circular de AgHBs_{adw} digerido con carboxipeptidasa Y, bajo condiciones reductoras y en presencia de octil glucósido (2%). El espectro representa la elipticidad media por residuo (EMR) de a) AgHBs_{adw} nativo y b) AgHBs_{adw} digerido parcialmente.

Longitud de onda nm



más apropiado debe incluir las siguientes características:

1.- Esencialmente el la misma disposición para P-25 y su forma glicosilada GP-30.

2.- La región central hidrofílica expuesta en ambas ambas proteínas (P-25 y GP-30).

3.- El carboxi terminal expuesto en ambas proteínas.

Por lo tanto, estas consideraciones deben tenerse en cuenta para perfeccionar el modelo propuesto hasta ahora. Un nuevo modelo propuesto se incluye en la sección de discusión.

DISCUSSION

Heterogeneidad del antígeno de superficie en plasma humano

En las preparaciones del antígeno de superficie se ha encontrado que las partículas víricas parecen ser heterogeneas cuando se observan utilizando métodos de dispersión de rayos X y microscopía electrónica (30). De ahí que no fuese sorprendente la separación de partículas antigénicas en su paso por una columna de HPLC con matriz de intercambio iónico. En este caso la separación está presumiblemente basada en la carga total de las partículas antigénicas. Esta carga se debe fundamentalmente a los residuos glicosílicos de las glicoproteínas y a los grupos polares en los lípidos de la capa lipídica. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que algunos grupos cargados pueden estar enmascarados debido a la disposición de las glicoproteínas en la superficie, y por lo tanto no contribuyen a su carga. De ahí que la separación de las partículas antigénicas pueda estudiarse como un posible cambio estructural.

Teniendo en cuenta que las partículas antigénicas no sólo están compuestas de proteínas, sino también de componentes lipídicos y glicosilicos, es necesario estudiar el efecto de cada uno de ellos en un cambio estructural. Con este fin, se utilizó la espectroscopía de dicroísmo circular en otros estudios, para detectar cambios en la conformación de proteínas debidos a la reorganización de las cadenas polipeptídicas tras un cambio en los lípidos que las rodean (90,91). También, algunos autores han comprobado que el cambio en residuos glicosilados no afecta a la conformación de la proteína tal y como se observa en los

espectros de dicroísmo circular obtenidos en la región baja del rango ultravioleta (92). El estudio de la estructura de la proteína antigénica en las distintas fracciones obtenidas tras HPLC revelaron una diferencia conformacional que fue demostrada al obtener distintos espectros utilizando la técnica de dicroísmo circular. Las partículas eluidas en las primeras fracciones mostraron un porcentaje más elevado de alfa hélice que aquellas eluidas más tarde y que podrían tener más carga. Aunque la elipticidad media por residuo a 208 nm solo difirió en un 20% entre la primera y la última fracción, esta diferencia podría ser responsable de su distinto comportamiento cromatográfico. A su vez este cambio conformacional podría ser una consecuencia de la disposición del monómero de proteína en una partícula de forma espontánea, o bien debido a la introducción de secuencias polipeptídicas que no siempre están presente en el monómero.

Cuando las fracciones cromatográficas fueron caracterizadas por anticuerpos monoclonales contra el antígeno de superficie, se encontró que H5 y H166 (específicos de grupo), así como el H53 tenían una afinidad mayor por las primeras fracciones recogidas, correspondientes a aquellas partículas que se retuvieron menos en la columna de intercambio iónico. Por lo tanto, teniendo en cuenta el cambio en el espectro de DC y esta última observación, podría sugerirse que la unión de estos anticuerpos monoclonales depende de la conformación del antígeno, tal y como se ha sugerido anteriormente (64). Más aun, esta dependencia conformacional podría estar relacionada

con la carga de la partícula antigénica y por tanto con la presencia de residuos glicosílicos o lipídicos. El área antigénica unida a H5, H53 y H166 podría estar gradualmente menos expuesta y esto se acompañaría de una exposición más extensa de los residuos con carga. Ya que dos de estos anticuerpos monoclonales reconocen determinantes de grupo, estas mismas diferencias entre las fracciones del antígeno adw podría existir en otros antígenos de subtipos distintos.

Cuando se lleva a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS se puede observar que el material de partida contiene especies que no se encuentran en las últimas fracciones colectadas en HPLC. Las bandas presentes en las primeras fracciones eluidas eran antigénicas, como se demuestra en la figura 5 donde se ven las bandas unidas a los anticuerpos que unen antígeno de superficie. Quizás estas bandas de alto peso molecular corresponden a las proteínas de superficie que contienen los péptidos codificados en la región precedente al gen S (pre-S) y que no se encuentran en todas las proteínas de superficie, pero que se han identificado previamente en bandas electroforéticas antigénicas de alto peso molecular (93,94). Por lo tanto los péptidos pre-S pudieran ser responsables de microheterogeneidad entre las partículas antigénicas al contenerlos en distinta magnitud. En el presente estudio la antigenicidad de las partículas víricas solo se midió con anticuerpos que reconocían la región codificada por el gen S y los péptidos pre-S no se detectaron. Al mismo tiempo esta diferencia en contenido pre-S pudiera no afectar drásticamente

la conformación de la proteína antigénica ya que su secuencia primaria no sugiere una estructura secundaria ordenada, pero podría afectar ligeramente el espectro de dicroísmo circular al afectar indirectamente la disposición del resto de la proteína en la capa lipídica. La región pre-S puede estar distintamente glicosilada y contribuir a la carga total de la partícula (95).

Caracterización de los sitios específicos de subtipo

Los anticuerpos policlonales específicos de subtipo (APES) purificados por afinidad fueron imprescindibles en este estudio de la especificidad de subtipo al tener una afinidad restringida. Sin embargo, las partículas del antígeno de superficie no contienen sólo sitios específicos de grupo y de subtipo, sino también otros determinantes no comunes a todos los antígenos definidos en un mismo subtipo. Esta multiplicidad de determinantes puede afectar la demarcación de los epítomos propios de subtipo, haciendo imposible su localización exacta en los distintos antígenos de superficie. Afortunadamente los APES pueden distinguir antígenos de distinto subtipo. En este estudio, los antígenos disponibles eran del subtipo **d** e **y**, con un carácter **w** distinto en cada uno de ellos. Los APES purificados en columnas de afinidad conteniendo estos antígenos mostraron clara afinidad por los antígenos de su mismo subtipo presentes en la clasificación del INAEI, a la vez que no se unieron con la misma afinidad a aquellos antígenos del subtipo

contrario. De ahí que los APES purificados se pudieran utilizar en este estudio de determinantes antigénicos de subtipo.

Además de los APES, fue posible disponer de dos anticuerpos monoclonales específicos de los sitios **d** e **y**, y que pudieron utilizarse para estudiar la heterogeneidad de los sitios específicos de subtipo reconocidos por los APES. Los resultados de este estudio se basan fundamentalmente en los ensayos de competición con los anticuerpos monoclonales mostrados en la tabla 3 y los ensayos de inhibición con antígeno modificado mostrados en la tabla 2. Estos ensayos parecen indicar que los APES anti-d incluyen fundamentalmente anticuerpos de afinidad similar al H95, es decir que la especificidad del subtipo **d** pudiera estar principalmente asociada con el residuo de lisina 122, que se puede modificar mediante la metilación reductora con formaldehído y hace perder la afinidad del antígeno **d** por el H95. Sin embargo, este no es el caso de los APES anti-y. Estos anticuerpos parecen no reconocer un sólo sitio como es el epítipo que une el H10. Podría ser que este anticuerpo H10 no fuera específico del subtipo **y**, sino del antígeno ayw, utilizado en este estudio. Su aportación a la especificidad subtípica sería, por lo tanto, nula y no competiría en gran escala con los APES, aunque pudiera competir de alguna manera con aquellos anticuerpos no reconocidos por el antígeno del otro subtipo, **d**, utilizado para purificar los APES por afinidad. La especificidad subtípica del antígeno ayw empleado en este estudio podría residir al menos en la secuencia presente en el extremo carboxílico del antígeno tripsinizado, como se muestra

en la figura 18. En esta figura se puede observar una preferencia de los APES por la banda que incluye el extremo carboxílico procedente de la ruptura de la proteína P-25 en el residuo 122 (TP-25-2). Al mismo tiempo la glicosilación de esta banda hace que no sea reconocida por los APES anti-y, como se puede apreciar en la misma figura 18, al no detectarse ninguna banda superior a la TP-25-2. A pesar de esta última evidencia que muestra de forma clara la localización preferente de la especificidad subtípica y, es necesario considerar que el anticuerpo monoclonal 2D11 tiene una especificidad subtípica y y se une sólo al extremo amino que resulta de la digestión con tripsina (comunicación personal de P.Hu). Quizás la especificidad y también está asociada con determinantes conformacionales, pero en este caso el cambio conformacional con respecto al subtipo d estaría reducido a una distinta orientación de los residuos contenidos en la región hidrofílica próxima al residuo 122 y no en otras regiones responsables de su estructura secundaria. Ya que se ha comprobado que los espectros de dicroísmo circular que muestran la conformación de ambas proteínas subtípicas son idénticos.

Solubilización de las proteínas del antígeno de superficie

La solubilización de las proteínas víricas con detergentes puede dar lugar a un cambio conformacional, tal como se observa en su espectro de DC (Figura 9). Probablemente las moléculas de detergentes formaron micelas con las proteínas tras solubilizar los lípidos. Esta solubilización pudo estar altamente

influida por la carga del detergente empleado, así en este estudio se observaron distintas características micelares cuando se utilizaron detergentes iónicos y no iónicos. La conformación de la proteína no sólo se alteró por la solubilización de los lípidos de la envuelta, sino también por las distintas conformaciones favorecidas por distintos agentes solubilizadores. Así, SDS , al igual que triton X-100 y octil glucósido se ha comprobado que favorecen estructuras secundarias ordenadas en proteínas y péptidos (95).

Como consecuencia de los cambios conformacionales observados también se puede esperar un cambio en la antigenicidad de la proteína. Tras la solubilización, todos los epítomos relacionados con los lípidos, tanto secuenciales como conformacionales, tendrán un cambio en su afinidad por los anticuerpos. Esta última característica del proceso solubilizador hace su estudio antigénico más complejo.

Una vez más, el uso de anticuerpos monoclonales ayudó a la identificación de los determinantes afectados. Los anticuerpos monoclonales empleados en estos estudios, al reconocer determinantes de grupo, sirvieron además para detectar diferencias entre la asociación de las distintas proteínas subtípicas con los lípidos.

Ya que las regiones hidrofóbicas están tan conservadas en los distintos subtipos de AgHBs, no se podría esperar una gran diferencia en el comportamiento de los determinantes de grupo con respecto a la solubilización. Así pues, el mismo anticuerpo monoclonal debería estar afectado en todos los subtipos.

Posiblemente, los determinantes más asociados con los lípidos son los que unen los anticuerpos monoclonales H5 y H53. Aunque H53 no está aun definido en cuanto a la extensión de su especificidad, ha mostrado cierta especificidad en filtros de nitrocelulosa a los que se transfirieron polipéptidos antigénicos después de una electroforesis. Se ha podido comprobar que en reacciones inmunoreactivas utilizando peroxidasa y un substrato que libera color, las bandas teñidas corresponden a especies de alto peso molecular, quizás dímeros, o trímeros de P-25 y GP-30 (observación personal). Los sitios reconocidos por H5 y H53 deben estar determinados por la conformación dictada por los lípidos, y la substitución de lípidos por detergentes debe favorecer una disposición de la proteína menos dependiente de la secuencia primaria aboliendo así las posibles diferencias entre subtipos. Quizás, por esto último, la proteína pudiera perder algunos de sus determinantes conformacionales, y H5 y H53 reconocen dos de ellos.

Para ver las posibles diferencias conformacionales entre las partículas nativas y las micelas, ambas se separaron mediante un gradiente de densidad mediante ultracentrifugación. El espectro de DC mostró un pequeño cambio conformacional en las micelas aisladas, el contenido en alfa hélice aumentó y, por lo tanto, la disposición de los aminoácidos en los polipéptidos era más ordenada, como era de esperar. La antigenicidad de las micelas, medida por su afinidad a los anticuerpos monoclonales, fue menor que la medida en el material de partida, que contenía las partículas víricas y las moléculas de detergente. El

determinante identificado por el anticuerpo monoclonal H53 desapareció principalmente con el tratamiento de octil glucósido, y en menor grado por el tratamiento con triton X-100. Sorprendentemente, el sitio reconocido por H5 mostró un gran incremento en su capacidad de unión al anticuerpo, aunque cuando se comparó su antigenicidad con la partícula no tratada y con la de la partícula tratada con detergentes, no se observó una gran diferencia. Considerando que no sólo los sitios reconocidos por H53 y H5 se afectaron distintamente, sino que también los sitios que unen H12 y H166 se presentaban con una afinidad contraria, es posible pensar que las polipéptidos puedan disponerse de forma reversible en las micelas de octil glucósido. Es decir, algunos determinantes variarían sus afinidades a la vez que otros al estar todos en una misma región pero en distinta orientación. Ya que algunos determinantes estuvieron alterados por los cambios mencionados anteriormente, se puede sugerir que podrían estar localizados en regiones del polipéptido que son esenciales para la integridad de las partículas víricas (96). Especialmente H35 podría reconocer un determinante de grupo, estable y altamente inmunogénico.

Estructura de la proteína en AgHBs

Entre las fuerzas que pudieran mantener unidas a las proteínas del AgHBs, se encuentran las asociadas con los los puentes disulfuro. Se sabe que existen al menos seis de estos enlaces, y la ruptura de uno de ellos ocasiona la pérdida total de la antigenicidad de la partícula vírica (72). Ya que la

formación de puentes disulfuro no está favorecida en áreas regiones hidrofóbicas (97), se podría sugerir que los puentes existentes están principalmente estabilizando estructuras externas a la capa lipídica.

Para estudiar la disposición de la proteína antigénica en la matriz lipídica es importante saber qué áreas están expuestas y cuáles están inaccesibles desde el exterior de la partícula. El empleo de enzimas proteolíticas capaces de digerir tanto las secuencias terminales como las internas puede ayudar a descubrir dichas zonas y determinar las áreas enterradas en la matriz. De esta forma se ha llegado a conocer que el extremo carboxílico es exterior, aunque el residuo de cisteína que se encuentra cinco aminoácidos separados del carboxilo terminal, debe estar enlazado con otro residuo de cisteína (intra o intermolecular), de tal forma que la digestión por carboxipeptidasas no puede proseguir a no ser que se aplique un tratamiento reductor. En este caso, la digestión desde este extremo puede alcanzar fácilmente el residuo 180 (46 aminoácidos más adelante). Al ser posible una proteólisis más completa tras un tratamiento con octil glucósido, es de suponer que la proteína contiene regiones internas en la matriz a partir del residuo 180. Probablemente, este fragmento polipeptídico puede ser de unos 20 aminoácidos a juzgar por el incremento en proteólisis. Al mismo tiempo el extremo amino no se pudo digerir, lo que indica que pudiera encontrarse en la matriz, aunque se puede considerar la posibilidad de que dicho extremo esté localizado próximo a un área cuya disposición haga

inaccesible el aminoácido terminal. Esta última observación podría estar apoyada por la existencia de secuencias polipéptidicas que existen como prolongación de la proteína antigénica en su extremo amino. El tratamiento con endopeptidasas reveló una disposición similar de la proteína y de su forma glicosilada, ya que ambas parecieron ser igualmente susceptibles a estas enzimas y en los mismos residuos. Esta última observación está claramente en conflicto con el modelo propuesto por Tiollais et al. (35), sugiriendo por lo tanto que la proteína sólo adopta una disposición en la envuelta vírica y que depende de su secuencia, y puede determinar el grado de glicosilación. Se puede admitir por tanto que la proteína no tiene que formar dímeros, y la distinta asociación entre monómeros proteicos pudiera dar lugar a microheterogeneidad física y antigénica observada por distintos grupos.

CONCLUSIONES

Estudios inmunológicos y estructurales se llevaron a cabo con la finalidad de definir las estructuras secundarias y terciarias del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (AgHBs). La heterogeneidad del antígeno del subtipo adw se estudió en partículas separadas en una columna de intercambio iónico mediante HPLC. Al no existir diferencias notables entre estas partículas se puede concluir que sólo existe una microheterogeneidad en la estructura proteica del subtipo adw estudiado. La microheterogeneidad observada en la estructura del AgHBs\adw no se correspondió con un cambio en su antigenicidad medida por anticuerpos policlonales. Aunque si se detectó distinta afinidad utilizando anticuerpos monoclonales. Los sitios reconocidos por los monoclonales H5, H53 y H166 variaron en función de la retención en la columna, y al ser estos mismos monoclonales los afectados en estudios de solubilización antigénica, es posible sugerir que la diferencia en tiempos de retención pueda estar relacionada con la exteriorización de lípidos polares en la superficie de AgHBs. Especialmente los determinantes reconocidos por H5 y H53 pudieran estar incluidos a las regiones de contacto entre proteínas y lípidos, regiones que fueron parcialmente destruidas tras solubilización. Mientras el determinante que une H53 pudiera ser independiente de la estructura secundaria del monómero proteico, el sitio que une H5 parece aumentar su capacidad de unión cuando aumenta la alfa helipticidad . La especificidad subtípica de AgHBs\adw resultó ser muy resistente a los cambios conformacionales, y debe residir principalmente en la región cercana al residuo de lisina 122. Esta última

conclusión está basada en la competición recíproca entre los anticuerpos policlonales específicos de subtipo (APES) y el anticuerpo monoclonal específico del subtipo adw (H95). El sitio reconocido por H95 no se afectó tras la solubilización con detergentes y tampoco parecía estar relacionado con la microheterogeneidad de las partículas antigénicas separadas mediante HPLC. Aunque las estructuras secundarias de AgHBs\ayw y adw no parecían diferir apreciablemente, parece ser que sus especificidades de subtipo no se encuentran en áreas homólogas de la estructura primaria. La especificidad de subtipo del AgHBs\ayw no ha podido ser definida como en el caso del adw, y la localización y naturaleza de sus determinantes sigue aun desconocida. Los determinantes de grupo disponibles para estos estudios muestran igual afinidad para ambos subtipos, pero el monoclonal H12 (aun no definido) muestra mayor capacidad de unión por el subtipo adw. Quizás el determinante reconocido por H12 se encuentra cercano al H95, y esta región pudiera estar más expuesta en el subtipo adw que en el ayw. Esta última conclusión está también apoyada por el hecho de que los sitios de unión de H95 y H12 son igualmente estables a los cambios conformacionales informados en estos experimentos.

Modelo estructural del AgHBs

Basandose en la información aportada en estos experimentos sobre la estructura antigénica y en otros datos conocidos

recientemente, es posible proponer un nuevo modelo que pueda representar la disposición del monómero de proteína en las subunidades morfológicas de las partículas víricas. Este modelo estaría basado en estudios físico- químicos que incluyen dispersión de rayos X de ángulo reducido (30), análisis de la secuencia primaria de la proteína, espectros de dicroísmo circular, estudios de susceptibilidad a distintas proteasas de especificidad conocida, solubilización de la proteína antigénica, reducción de puentes disulfuro, antigenicidad e inmunogenicidad. Aunque la información disponible es incompleta la estructura vírica sólo podría resolverse completamente mediante la imagen obtenida por rayos X, y esta técnica es aun inasequible para estos estudios.

El nuevo modelo de la estructura del AgHBs que se propone tras los experimentos descritos anteriormente incluye las siguientes características:

- Número de subunidades morfológicas: 12
- Número de monómeros en una subunidad: 8.
- Relación de P-25 a GP-30 : 5\3.
- Región comprendida dentro de la matriz lipídica: 60-100, 160-180.
- Secuencia más expuesta al exterior: 107-159.
- Secuencia dentro de la subunidad : 1-59, 180-226.
- Estructura secundaria predominante: alfa hélice.
- Localización del extremo carboxílico: dentro de la subunidad cercano a la región más expuesta.

-Localización del extremo amino: dentro de la subunidad cercano a la capa lipídica.

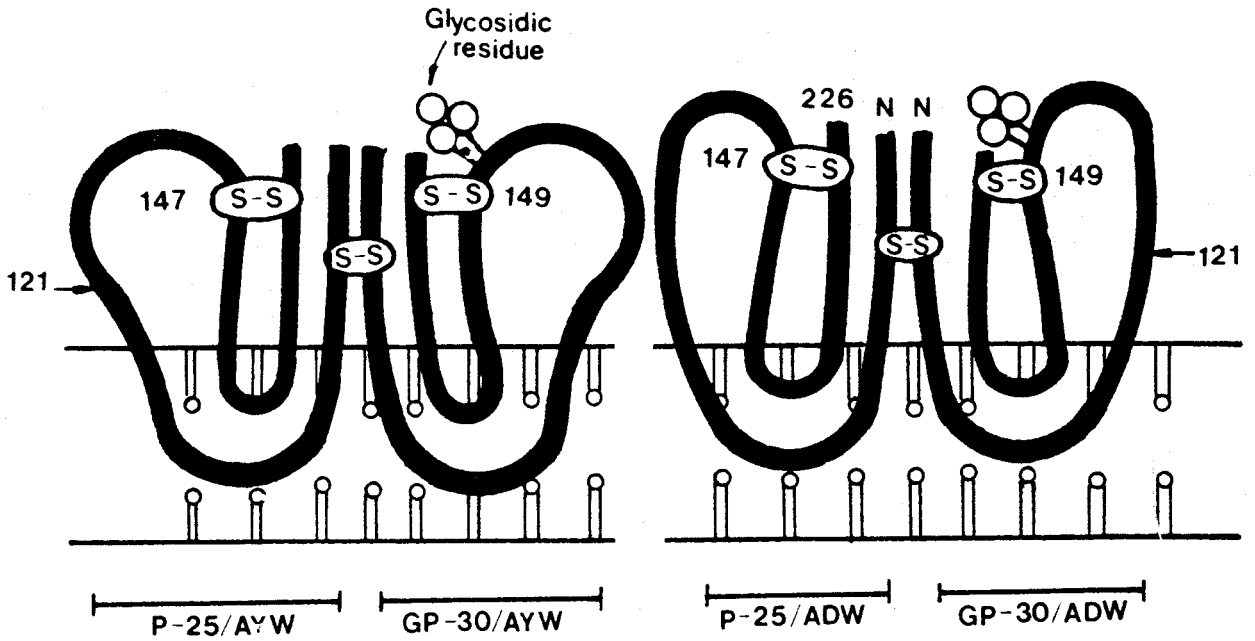
-Diferencias notables entre subtipos: disposición de la secuencia cercana al residuo 122.

-Localización de la secuencia pre-S: prolongación del amino terminal desde el interior de la subunidad hacia el exterior.

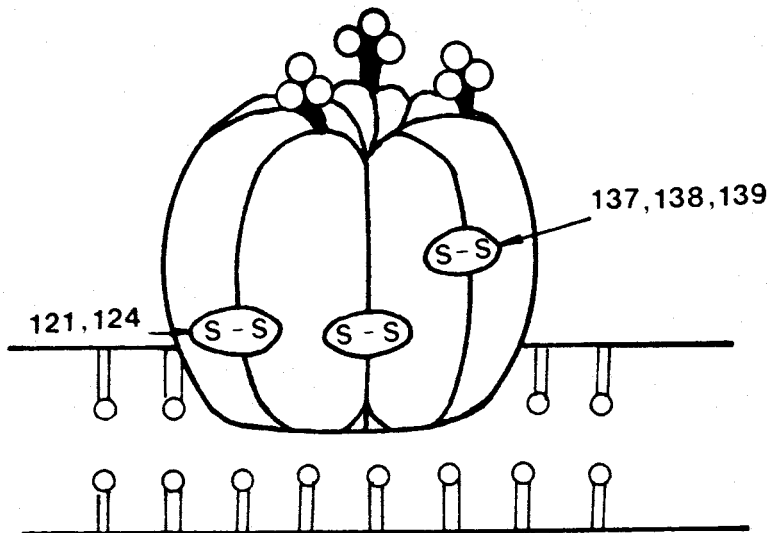
-Número y localización de los puentes disulfuro: seis enlaces disulfuros se pueden establecer entre los monómeros de proteína en las áreas expuestas de la subunidad (107-159) y entre los últimos seis aminoácidos (226-220).

En la figura 22 se intenta representar el modelo propuesto basado en las características anteriores.

Figura 22. Modelo propuesto para describir la posible distribución de la proteína antigénica en partículas de AgHBs. En este modelo se supone que las partículas contienen 12 subunidades proteicas enterradas en una matriz lipídica. Cada subunidad podría agrupar 8 monómeros de proteína producto del gen S y su región precedente, que estarían unidas por puentes disulfuro. En la sección a) se muestra la distribución según el subtipo. La única diferencia entre los subtipos que se trata de reflejar en esta sección sería la mayor exposición de los residuos próximos a la lisina 122 del AgHBs\adw en comparación a la arginina 122 presente en el ayw. Además cabe señalar la existencia de puentes disulfuro intramoleculares, y la exteriorización de ambos extremos proteicos, amino y carboxílico. La formación de la subunidad se muestra en la sección b) donde se trata de situar los posibles monómeros en una estructura compacta que se mantiene unida por puentes disulfuro intermoleculares, y cuyo grado de glicosilación estaría limitado por la dificultad estérica alrededor a la Asn 146.



(a)



(b)

BIBLIOGRAFIA

•

•

1. Schimid,R. Keynote address : Viral hepatitis : Some historical perspective, en Viral hepatitis and liver disease (G.N. Vyas,J.L. Dienstag, and J.H. Hoofnagle ed.), Grune and Stratton, Inc.,Florida,pp. 1-7 (1984).
2. Blumberg,BS., Alter,H.J. y Visnich, J.A., A "new" antigen in leukemia sera. JAMA 191: 541-546 (1965).
3. World Health Organization.Prevention of liver cancer. WHO Technical reports series, 691 (1983).
4. Hilleman,MR., Buynack,E.B., McAleer,W.J., McLean,A.A., Provost,P.J. y Tytell,A.A., en Viral hepatitis (Szmunes,W., Alter,H.J. y Maynard, J.E., eds.), The Franklin Institute Press, Philadelphia, pp. 385-397 (1982).
5. Swenson, P.D., Escobar,M., Carithers,R.L. y Sobieski, T.J., Failure of preexisting antibody against hepatitis B surface antigen to prevent subsequent hepatitis B infection. J. Clin. Microbiol. 18, 305-309 (1983).
6. Hirschman,S.Z., Replication of hepatitis B virus in cell culture systems, in Advances in hepatitis research (F.V. Chisari, ed.), Masson Publishing USA, Inc., New York, pp. 54-61 (1984).
7. Aspinall,S., Alexander,J., y Bos, P., Comparative expression of HBV ags in several cell model systems, J.gen.Virol., 67, 2315-2328 (1986).
8. Nozaki,C., Miyanochara, A., Fujiyama, A., Hamada, F., Ohtomo,N. y Matsubara,K., Two mammalian cell systems for the propagation of the HBV genome in the extrachromosomal and chromosomally integrated states: production of the surface and e antigens, Gene 38, 39-44 (1985).
9. Colbere-Garapin, F., Horoud,F., Kourilsky,P. y Garapin,A. Comparative expression of the HBsAg gene in biochemically

transformed human, simian and murine cells, *J.gen.Virol.*, 66, 1741-1752 (1985).

10. Stratowa, C., Doehmer, J., Wang, Y. y Hofschneider, P.H., Recombinant retroviral DNA yielding high expression of the HBsAg, *EMBO J.*, 12, 1573-1758 (1982).
11. Pasek, M., Goto, T., Gilbert, W., Zink, B., Schaller, H., Mackay, P., Leadbetter, G. y Murray, K., HBV genes and their expression in *E.coli*, *Nature* 282, 575-579 (1979).
12. Patzer, E., Simonsen, C., Nakamura, G.R., Herberg, R.D., Gregory, T.J. y Levinson, A.D., Characterization of recombinant-derived hepatitis B surface antigen secreted by a continuous cell line, en *Viral hepatitis and liver disease* (ed. Vyas, G.N.) 477-485 (Grune and Stratton, N.Y., N.Y., 1984).
13. Patzer, E., Nakamura, G.R., Hershberg, R.D., Gregory, T.J., Crowley, C., Levinson, A.D. y Eichberg, J.W., Cell culture derived recombinant HBsAg is highly immunogenic and protects chimpanzees from infection with HBV, *Biotechnology*, 7, 630-636 (1986).
14. Deinhardt, F. y Jilg, W., Vaccines against hepatitis, *Ann.Inst.Pasteur/virol.*, 137E, 79-95 (1986).
15. Lerner, R.A., Green, N., Alexander, H., Liu, F.T., Sutcliffe, J.G. y Shinnick, T.M., Chemically synthesized peptides predicted from the nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome elicited antibodies reacted with the native envelope protein of Dane particles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 7:3403-3407 (1981).
- ✓ 16. Dreesman, G.R., Sanchez, Y., Ionescu-Matiu, I., Sparrow, J.T., Sparrow, H.R., Peterson, D.L., Hollinger, F.B. y Melnick, J.L. Antibody to hepatitis B surface antigen after a single inoculation of uncoupled synthetic HBsAg peptides, *Nature* 195:158-160 (1982).
17. Prince, A.M., Ikram, H. y Hopp, T.P., Hepatitis B virus vaccine: Identification of HBsAg_{l/a} and HBsAg_{l/d} but not HBsAg_{l/y} subtype antigenic determinants on a synthetic

immunogenic peptide, Proc.Natl.Acad.Sci USA 79:579-582 (1982).

18. Bhatnagar, P.K., Papas, E., Blum, H.E., Milich, D.R., Nitecki, D., Karels, M.J. y Vyas, G.N., Immune response to synthetic peptide analogues of hepatitis B surface antigen specific for the "Y" determinant, Proc.Natl.Acad.Sci USA 79: 4400-4404 (1982).
19. Neurath, A.R., Kent, S.B.H. y Strick, N., Specificity of antibodies elicited by a synthetic peptide having a sequence in common with a fragment of a virus protein, the hepatitis B surface antigen, Proc.Natl.Acad.Sci. 79:7871-7875 (1982).
20. Gerin, J.L., Alexander, H., Shih, J.W-K., Purcell, R.H., Dapolito, G., Engle, R., Green, N., Sutcliffe, J.G., Shinnick, T.M. y Lerner, R.A., Chemically synthesized peptides of hepatitis B surface antigen duplicate the d/y specificities and induce subtype specific antibodies in chimpanzees, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 80:2365-2369 (1983).
21. Neurath, A.R., Kent, S.B.H. y Strick, N., Antibody response to two synthetic peptides corresponding to residues 45-68 and 69-79 of the major protein of hepatitis B surface antigen, Virus Research, 1:321-331 (1984).
22. Hopp, T.P., Immunogenicity of a synthetic HBsAg peptide: Enhancement by conjugation to a fatty acid carrier, Mol.Immunol. 21:13-16 (1984).
- ✓ 23. Peterson, D.L., Paul, D.A., Lam, J., Tribby, I.I.E., y Achord, D.T. Antigenic structure of Hepatitis B surface antigen: Identification of the "d" subtype determinant by chemical modification and use of monoclonal antibodies, J.Immunol. 132: 920-927 (1985).
24. Mason, W.S., Seal, G. y Summers, J., Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus, J.Virol. 36:829-836 (1980).
25. Brechot, C., Pourcel, C., Louise, A., Rain, B. y Tiollais, P., Presence of integrated hepatitis B virus DNA

sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma, *Nature* 286:533-535 (1980).

26. Dejean, A., Vitvitski, L., Brechot, C., Trepo, C., Tiollais, P. y Charnay, P., Presence and state of WHV DNA in liver and serum of woodchucks: Further analogies with human hepatitis B virus, *Virology* 121:195-199 (1982).
27. Wain-Hobson, S., Molecular virology of the hepadna viruses, in *Advances in hepatitis research* (F.V. Chisari, ed.), Masson Publishing USA, Inc., New York, pp. 49-53 (1984).
28. Hirschman, S-Z, Schwartz, J., Vernance, S., Schaffner, F. y Ganz, C., An electron microscopic study of the structural polymorphism of HBsAg, *J. Infect. Dis.* 128, 605-617 (1973).
29. Cabral, G.A., Gyorkey, F., Gyorkey, P., Melnick, J.L. y Dreesman, G.R., Immunohistochemical and electron microscopic detection of HBs and c antigens, *Exptl. Mol. Path.*, 29, 156-169 (1978).
- ✓ 30. Aggerbeck, L.P. y Peterson, D.L., Electron microscopic and solution x-ray scattering observations on the structure of hepatitis B surface antigen, *Virol.* 141:155-161 (1985).
31. Feitelson, M., Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg), en *Molecular components of HBV*, (ed. Kluwer Academic Publsh.) 8-34 (1985).
32. Courouce, A.M., Holland, P.V., Muller, J.Y. y Soulier, J.P., HBs antigen subtypes, in *Bibliotheca Haematologica*, Vol. 42, S. Karger, Basel (1976).
33. Feitelson, M.A., Marion, P.S. y Robinson, W.S., Core particles of HBV and GSHV. Relationship between hepatitis B core and ground squirrel hepatitis core antigen-associated polypeptides by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and tryptic peptide mapping, *J. Virol.*, 43, 687-696 (1982).
34. Ou J-H., Laub, O. y Rutter, W.J., Hepatitis B virus gene function: The precore region targets the core antigen to

- cellular membranes and causes the secretion of the e antigen, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 83,1578-1582 (1986).
- 35.Tiollais,P. y Wain-Hobson,S, Molecular genetics of the hepatitis B virus , in *Advances in hepatitis research* (F.V. Chisari, ed.), Masson Publishing USA, Inc., New York, pp. 9-20 (1984).
 - 36.Budkowska,A., Petit,M.-A, Capel,F. y Pillot,J., Liver hepatitis B e antigen: Molecular heterogeneity and relation to hepatitis B virus core antigen ,*Ann .Inst. Pasteur;virol.*, 137E, 127-142 (1986).
 - 37.Ganem,D., HBV replication and primary hepatocellular carcinoma: recent advances and new horizons, en *Recent Advances in Hepatology* (ed. Thomas,H.C. y Jones,E.A.), 2, 55-72 (1986).
 - 38.Zeimer,M., Garcia,P., Shaul, Y., y Rotter, W.J.: Sequence of hepatitis B virus DNA incorporated into the genome of a human hepatoma cell line, *J.Virol.*, 53, 885-892 (1985).
 - 39.Brechot,C., Pourcel,C., Hadchove,M., Dejean,A., Louise,A., Scotto,J. y Tiollais,P. , State of HBV DNA in liver diseases, *Hepatology*, 21, 275-345 (1982).
 - 40.Koshy,R., Koch, S., Von Loringhoven,A.F., Kahmann,R., Murray,K. y Hofschneider,P.H., Integraction of HBV DNA. Evidence for integration in the single-stranded gap, *Cell*,34, 215-223 (1983).
 - 41.Miller, R.H. y Robinson, W.S.: Common evolutionary origen of hepatitis B virus and retroviruses, *Proc.Natl.Acad. Sci. USA*, 83, 2531-2535 (1986).
 - 42.Tiollais,P., Charnay, P., y Vyas, G.N., Biology of Hepatitis B virus, *Science* 213: 406-411 (1981).
 - √ 43.Peterson,D.L., Isolation and characterization of the major protein and glycoprotein of hepatitis B surface antigen, *J.Biol.Chem.* 256:6975-6983 (1981).
 - 44.Valenzuela,P., Gray,P., Quiroga,M., Zaldivar,J., Goodman, H.M., y Rutter, W.J., Nucleotide sequence of the gene

- coding for the major protein of Hepatitis B virus surface antigen, *Nature* 280:815-819 (1979).
45. Persing, D.H., Varmus, H.E. y Ganem, D., Inhibition of secretion of HBsAg by a related presurface polypeptide, *Science* 234, 1388-1391 (1986).
46. McLachlan, A., Milich, D.R., Raney, A.K., Riggs, M.G., Hughes, J.L., Sorge, J. y Chisari, F.W., Expression of HBsAg and c antigens: influences of pre-S and precore sequences, *J. Virol.*, 59, 683-692 (1987).
47. Stibbe, W. y Gerlich, W.H., Variable protein composition of Hepatitis B surface antigen from different donors *Virology*, 123:436-442 (1982).
- ✓ 48. Gavilanes, F., Gonzalez-Ros, J.M. y Peterson, D.L., Structure of hepatitis B surface antigen: Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins, *J. Biol. Chem.* 257:7770-7777 (1982).
49. Goudeau, A., Barin, F., Coursaget, P., Sizaret, P.Y., Andre, M. y Maupas, P., en *Viral Hepatitis*, ed Vyas, G.N. et al.) 707-708 (1978).
50. Florman, H.M. y Wasserman, P.M.: O-linked oligosaccharide of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity, *Cell* 41:313-324 (1986).
51. DeLarco, J. y Todaro, G.J.: Membrane receptor for murine leukemia viruses: characterization using the purified viral envelope glycoprotein, gp70, *Cell* 8:365-371 (1986).
52. Elder, J.H., McGee, J.S. y Alexander, S.: Carbohydrate side chains of Rauscher leukemia virus envelope glycoproteins are not required to elicit a neutralizing antibody response, *J. Virol.*, 57:340-342 (1986).
53. Neurath, A.R., Prince, A.M. y Lippin, A.: Affinity chromatography of HBsAg on concanavalin A linked to Sepharose, *J. gen. Virol.*, 19:391-395 (1973).

54. Shiraishi, H., Kohama, T., Shirachi, R. y Ishida, N.:
Carbohydrate composition of HBsAg *J.gen.Virol.*, 36:207-210
(1977).
55. Millman, T., Loeb, L.A., Bayer, M.E. y Blumberg, B.S.:
Australian antigen (A hepatitis associated antigen).
Purification and physical properties, *J.Exp.Med.*, 131:1190-1199
(1970).
56. Sukeno, N., Shirachi, R., Shirachi, H. and Ishida, N.:
Conformational studies of Australia antigen by optical
rotatory dispersion and circular dichroism, *J.Virol.*,
10:157-158 (1972).
57. Vyas, G.N., Rao, K.R. y Ibrahim, A.B.: *Science*,
178:1300-1301 (1972).
58. Dreesman, G.R., Hollinger, F.B., McCombs, R.M. y
Melnick, J.L., *J.Gen.Virol.*, 19:129-134 (1974).
59. Imai, M., Gotoh, A., Nishioka, K., Kurashina, S.,
Miyakawa, Y. y Mayumi, M.: Antigenicity of reduced and
alkylated Australian antigen, *J.Immunol.*, 112: 416-419
(1974).
60. Hollinger, F.B., Troisi, C., Heiberg, D., Sanchez, Y.,
Dreesman, G.R. y Melnick, J.L.: Response to a hepatitis B
polypeptide vaccine in micelle form in a young adult
population, *J.Med.Virol.*, 19:229-240 (1986).
61. Mishiro, S., Imai, M., Takahashi, K., Machida, A.,
Gotanda, T., Miyakawa, Y. y Mayumi, M., A 49.000-dalton
polypeptide bearing all antigenic determinants and full
immunogenicity of 22-nm hepatitis B surface antigen
particles, *J.Immunol.* 124:1589-1593 (1980).
62. Blum, H.E., Bhatnagar, P.K., Figus, A. y Vyas, G.N.,
Immunochemistry of hepatitis B surface antigen and
molecular pathogenesis of chronic liver disease, in
Advances in hepatitis research (F.V.Chisari, ed.), Masson
Publishing USA, Inc., New York, 200-207 (1984)
63. Soulier, J.P. y Courouce-Pauty, A.M.: New determinants of
HBsAg (Au or HB antigen), *Vox Sang.*, 25:212-234 (1973).

64. Paul, D.A., Use of monoclonal antibodies and synthetic peptides to define the antigenic determinants of Hepatitis B surface antigen (HBsAg), Dissertation thesis Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia (1985).
65. Chairez, R., Steiner, S., Melnick, J.L. y Dreesman, G.R.: Glycoproteins associated with HBsAg, *Intervirology*, 1:224-228 (1973).
66. Chairez, R., Hollinger, F.B., Brunschwig, J.P. y Dreesman, G.R.: Comparative biophysical studies of hepatitis B antigen subtypes adw and ayw, *J. Virol.*, 15:182-190 (1975).
67. Gold, J.W.M., Shih, J.W.-K., Purcell, R.H. y Gerin, J.L.: Characterization of antibodies to the structural polypeptides of HBsAg. Evidence for subtype-specific determinants, *J. Immunol.*, 117:1404-1406 (1976).
68. Dreesman, G.R., Hollinger, F.B. y Melnick, J.L.: Biophysical and biochemical properties of purified preparations of Hepatitis B surface antigen (HBsAg), *Am. J. Med. Sci.*, 270:123-129 (1975).
69. Gerin, J.L.: Isolation and physical characteristics of HBsAg, en *Hepatitis and Blood transfusion*, ed por Vyas, G.N., Perkins, H.A. y Schmid, R., Grune and Stratton, N.Y., N.Y., pp205-219 (1972).
70. Shih, J.W.-K. y Gerin, J.L.: Immunochemistry of HBsAg preparations and characterization of antibodies to the constituent polypeptides, *J. Immunol.*, 115:634-639 (1975).
71. Shih, J.W.-K. y Gerin, J.L.: Proteins of hepatitis B surface antigen, *J. Virol.*, 21:347-357 (1977).
- ✓ 72. Peterson, D.L., Gavilanes, F., Paul, D.A. y Achord, D.T., Hepatitis B surface antigen: Protein structure and the development of alternative hepatitis B virus vaccines, in *Advances in hepatitis research* (F.V. Chisari, ed.), Masson Publishing USA, Inc., New York, pp. 30-39 (1984).

73. Luzzati, V., Tardieu, A., y Aggerbeck, L.P., Structure of serum low density lipoprotein (LDL). I.A solution x-ray scattering study of hyperlipidemic monkey LDL. *J.Mol.Biol.* 131, 435-473 (1979).
74. Segrest, J.P. y Feldmann, R.J., Membrane proteins: Amino acid sequence and membrane penetration. *J.Biol.Chem.* 87:853-858 (1974).
75. Burrell, C.J., Leadbetter, G., Mackay, P., y Marmion, B.P., Tryptic Cleavage of Antibody Binding Sites from Hepatitis B Surface Antigen Particles. *J. gen. Virol.*, 33:41-50 (1976).
76. Wands, J.R., Ben-Porath, E.P. y Wong, M.A., Use of monoclonal antibodies in the study of viral hepatitis, in *Advances in hepatitis research* (F.V Chisari, ed.), Masson Publishing USA, Inc., New York, pp. 110-122 (1984).
77. Budkowska, A., Riottot, M.M, Dubreuil, P., Lazizi, Y., Brechot, C., Sobczak, E., Petit, M.A. y Pillot, J.: Monoclonal antibody recognizing Pre-S2 epitope of hepatitis B virus: characterization of Pre-S2 epitope and anti-Pre-S2 antibodies, *J.Med.Virol.*, 20:111-125 (1986).
78. Hoofnagle, J.H., Gerety, R.J., Smallwood, L.A. y Barker, L.F., Subtyping of hepatitis B surface antigen and antibody by radioimmunoassay, *Gastroenterology* 72:290-296 (1977).
79. Zuckermann, A.J., Alternative hepatitis B vaccines: Polypeptide micelle vaccines, in *Advances in hepatitis research* (F.V.Chisari, ed.), Masson Publishing USA, Inc., New York, pp.230-237 (1984).
80. Waters, J., Pignatelli, M., Galpin, S., Ishihara, K. y Thomas, H.C.: Virus neutralizing antibodies to hepatitis B virus: the nature of and immunogenic epitope on the S gene peptide, *J.gen.Virol.*, 67:2467-2473 (1986).
81. Chen, Y-H., Yang, J.T, y Chau, K.H., Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism, *Biochem.* 13:3350-3359 (1974).

82. Courouce-Pauty, A.M. y Holland, P.V., Summary of workshop A-2: HBsAg and its subtypes, en *Viral Hepatitis* (G.N.Vyas, S.N.Cohen and R.Schmid, eds.), Franklin Institute Press, Philadelphia, pp. 649-654 (1978).
83. Farrell, P.H., High resolution two dimensional electrophoresis of proteins, *J.Biol.Chem.* 250:4007-4021 (1975).
84. Burnette, W.N., Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from SDS Polycarylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibodies and radioiodinated protein A. *Anal.Biochem.* 112: 195-203 (1981).
85. Jenthoft, N. y Dearborn, D.G., Labeling of proteins by reductive methylation using sodium cyanoborohydride, *J.Biol.Chem.* 254:4359-4365 (1979).
86. Atassi, M.Z. y Singhal, R.P., Immunochemistry of sperm whale myoglobin, XI. Modification of two glutamic acid residues and their role in the antigenic reactivity, *Immunochem.* 9:1057-1066 (1972).
87. Jap, B.K., Maestre, M.F., Hayward, S.B., y Glaesen, R.M., Peptide chain secondary structure of bacteriorhodopsin. *Biophys.J.* 43: 81-89 (1983).
88. Chang, C.T., Wu, C-S., C. y Yang, J.T.: Circular dichroic analysis of protein conformation: inclusion of the beta turns, *Anal.Biochemistry* 91: 13-31 (1978).
89. Greenfield, N. y Fasman, C.D., Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation, *Biochemistry*, 8, 4108-4120. (1969).
90. Wallace, B.A., Kohl, N., y Teeter, M.M., Crambin in phospholipid vesicles: Circular dichroism analysis of crystal structure relevance, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 81: 1406-1410, 1984.
91. Dunker, A., Fodor, S.P.A., y Williams, R.W., Lipid-dependent structural changes of an amorphous membrane protein, *Biophys.J.* 37: 201-202 (1981).

92. Rossi, J.D., y Wallace, B.A., Binding of fibronectin to phospholipid vesicles, *J.Biol.Chem.* 258: 3327-3331 (1982).
93. Machida, A., Kishimoto, S., Ohnuma, H., Baba, K., Ito, Y., Miyamoto, H., Funatsu, G., Oda, K., Usuda, S., Togami, S., Nakamura, T., Miyakawa, Y., y Mayumi, M., A polypeptide containing 55 amino acid residues coded by the Pre-S region of hepatitis B virus deoxyribonucleic acid bears the receptor for polymerized human as well as chimpanzee albumins, *Gastroenterology*, 86: 910-918 (1984).
94. Neurath, Kent, S.B.H., Strick, N., Taylor, P., y Stevens, C.E., Hepatitis B virus contains pre-S gene-encoded domains, *Nature* 315: 154-156 (1985).
95. Kasambalides, E.J., Gilja, B.K. y Gerber, M.A.: Effects of glycosylation inhibitors on the expression of polyalbumin receptors in HBsAg produced in vitro, *J.Virol.*, 53, 166-173 (1985).
96. Benjamin, D.C., Berzofsky, J.A., East, I.J., Furd, F.R.N., Mannum, C., Leach, S.J., Margoliash, E., Michael, J.G., Miller, A., Prayer, E.M., Reichlin, M., Sercarz, E.E., Smith-Gill, S.J., Todd, P.E. y Wilson, A.C., The antigenic structures of proteins: A reappraisal, *Ann.Rev.Immunol.* 2:67-101 (1984).
97. Raap, J., Kerling, K.E.T., Vreeman, H.J., y Visser, S., Peptide Substrates for Chymosin (Rennin): Conformational studies of k-casein and some k-casein-related oligopeptides by circular dichroism and secondary structure prediction. *Arch.Biochem.Biophys.*, 221: 117-124 (1983).