



# Péptidos derivados del GB virus C como potenciales inhibidores del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

Ramona Galatola

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FISICOQUÍMICA

# **Péptidos derivados del GB virus C como potenciales inhibidores del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1**



Ramona Galatola.

Barcelona, 2014



UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FISICOQUÍMICA

Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Instituto de Química Avanzada de Cataluña  
Departamento de Química Biomédica

Programa de doctorado “Investigación, desarrollo y control de medicamentos”

**Péptidos derivados del GB virus C como potenciales inhibidores del  
virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1**

Memoria presentada por Ramona Galatola para optar al grado de doctor por la  
Universidad de Barcelona

Directoras

Dra. Isabel Haro Villar  
Investigadora Científica  
Dept. Química Biomédica  
IQAC-CSIC

Dra. María José Gómara Elena  
Científica Titular  
Dept. Química Biomédica  
IQAC-CSIC

Doctoranda: Ramona Galatola

Tutora:

Dra. M<sup>a</sup> Luisa García Lopez  
Profesora Asociada  
Dept. de Fisicoquímica  
Universidad de Barcelona

Ramona Galatola. Barcelona 2014



**“Dos caminos se bifurcaban en un bosque y yo,  
Yo tomé el menos transitado,  
Y eso hizo toda la diferencia”**

Robert Frost



**Al mio nonnino y a la tieta Maria Dolors  
por apoyarme, guiarme y estar allí...  
ofreciéndome siempre vuestra gran sabiduría.**





29-07-2008: Estimada Dra. Isabel Haro... Me gustaría mucho trabajar en el campo de la investigación, aprender y aplicar nuevas técnicas de laboratorio, y profundizar mis estudios en bioquímica....Así, con este mail, empezó mi aventura en el mundo de los péptidos...que parece terminar, por el momento, con la entrega de esta tesis. En este momento, son muchas las personas a las que tengo que agradecer que me hayan acompañado durante este camino.

En primer lugar, quisiera agradecer a mis directoras, la Dra. Isabel Haro y la Dra. María José Gómara, haberme dado esta oportunidad, creyendo en mi y apoyándome siempre en estos años...¡¡¡gracias por ser mucho más que mis directoras!!!

Gracias a mi tutora de tesis, María Luisa García, por su amabilidad y por darme siempre su ayuda cuando la he necesitado.

Mi más sincero agradecimiento a todo el dept. de fisicoquímica de la facultad de farmacia de la UB por su buena acogida y su disposición a ayudarme...¡¡¡gracias por hacerme sentir una más del grupo!!!

Quisiera dar un especial agradecimiento a la Dra. Montse Pujol, por haberme acompañado paso a paso en mi breve experiencia en las monocapas y por sus preciosos y valiosos consejos, tanto científicos como en el terreno personal.

Agradecer a la Dra. Kalina Hristova, de la Universidad John Hopkins, por darme la posibilidad de trabajar con ella y su grupo.

Gracias al Dr. J. Perez-Gil, de la Universidad Complutense de Madrid, y su magnífico grupo por acogerme durante mi breve estancia. En especial quisiera agradecer al Dr. Antonio Cruz su gran ayuda. ¡¡¡Porque gracias a ti, todo tiene forma de monocapas!!!

Gracias al servei de malalties infeccioses del'Hospital Clinic, al servicio de cultivos celulares y al laboratorio de espectrometría de masas del IQAC-CSIC de Barcelona por su colaboración. A todo el dept. de personal y administración del CSIC por ayudarme a gestionar todos mis problemas de papeleo.

En fin...Se encontraron una vez una Madrileña, una Napolitana, una Cubana, una Catalana y Raymond en el lab. 221 del CSIC de Barcelona... Ah mis amores cuanto os tengo que agradecer y... voy a intentarlo:

Gracias a la Dra. Leticia Fernandez-Arauzo, por haberme introducido en el mundo de la micromolaridad, por ser mi wordreference, por ser mi amiga, por estar siempre. Gracias Aimee por haber sido muchas veces mi cabeza para pensar, mi mano para escribir, mi boca para hablar.... Doy las gracias a este doctorado por haberme hecho encontrar otra hermana. Gracias Anna Paus, por los consejos, por las palabras en los momentos más duros, gracias por ser como eres... aparte de ser más baja que yo... una óptima compañera y gran amiga. RaymonDDD...aunque ya no trabajes con nosotros, nunca olvidaré el gran compañero que

has sido. Gracias por aguantarme, por abrirme el nitrógeno, por hacerme reír con tus 'raymonadas'.

Muchas gracias a todos los que pasaron por el lab. 221, y con los cuales pude compartir una parte de mi camino: Marta Pitet y todas las Martas que siguieron, Elena, Morteza, Jessi, Emili, Marco y todo el resto...

Gracias a todo CSIC, sobre todo con los que he compartido algo más que esta tesis como M. Luisa, Maria Martinez, Elvira, Eunice y Francesca.

Agradezco mucho también a M<sup>a</sup> José Bleda, gran estadista y profesora. A Eva Prats...¡¡¡te debo muchos PANETTONI!!

Gracias a la Dra. Mari Sanchez, sobre todo por no haberme denunciado por stalking durante mis estancias, cuando continuamente la atosigaba usando todos los medios de comunicación disponibles... incluida la paloma mensajera. A la Dra. Alba Ortiz por ayudarme a entender mis infinitas dudas, por su disponibilidad y por su amistad.

Por último, quisiera agradecer a toda mi familia. A mis padres y a Ciro y Valentina, por haber respetado siempre mis decisiones, por creer siempre en mí, sobre todo en los momentos que yo no lo hacía. A Pucci y Alex por estar siempre allí... siempre he podido, y puedo, contar con vosotros...¡¡¡gracias!!! A Divina por interesarse siempre por mí, ¡¡¡tus consejos nunca los olvidaré!!! A todos mis amigos italianos y en especial: Alessandra, Fabiana, Pina, Simona, Anita, Ida, Francesca, Vale Bari, Vale S., Massimino, Antonio, Giando...perché ci siete sempre, la distancia NON separa i veri amici...Vi adoro!!! A Karolina, Victor, Elisa, Nati, Pablo, Gonzalo, Miguel, Alexandra, Abda, Ciccio... por compartir los momentos fuera del lab. y ayudarme a desconectar.

A Alexis, por aguantarme cuando yo tampoco lo haría, por estar siempre, por ser mi cómplice, mi químico, mi psicólogo... como dice la poesía uruguaya ¡¡¡tú y yo en la calle codo a codo somos mucho más que dos!!!

Finalmente agradezco a todas aquellas personas que no he nombrado pero que han estado también a mi lado. GRACIAS A TODOS.

---

## Abreviaturas, acrónimos y símbolos

---

$\Theta$	elipticidad molar
$\lambda$	longitud de onda
$\epsilon$	coeficiente de extinción molar
A	absorbancia
Acm	acetamidometil
ACN	acetonitrilo
ANTS	ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6 trisulfónico
Arg	arginina
Boc	butiloxycarbonyl
BOP	benzotriazol-1-il-N-oxi-tris (dimetilamino) fosfonio
Bzl	benzoil
CD	dicroísmo circular
DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
DIEA	N,N-diisopropiletilamina
DIPCDI	N,N'-diisopropilcarbodiimida
DMF	N,N'-dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DO	densidad óptica
DNA	ácido desoxirribonucleico
DPPG	dipalmitoilfosfatidilglicerol
DPX	bromuro de p-xileno-bis-piridinio
EDT	1,2-etanoditiol
ES-MS	espectrometría de masas electrospray
Fmoc	9-fluorenilmetiloxycarbonil
FRET	transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
GBV-C	GB virus C
HATU	2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato
HEPES	ácido N-(2-hidroxietil)-piperacina-N'-(2-etanosulfónico)

---

---

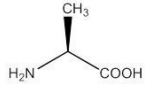
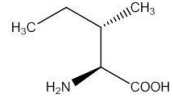
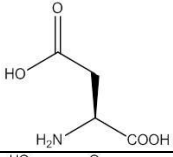
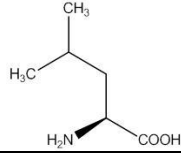
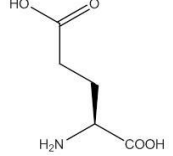
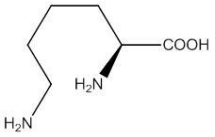
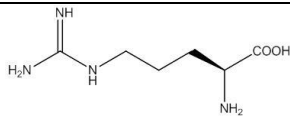
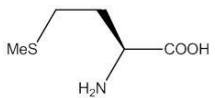
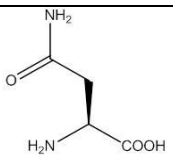
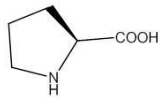
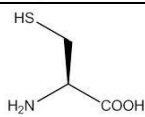
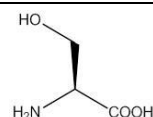
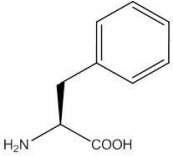
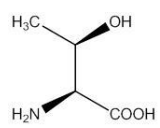
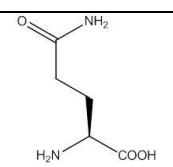
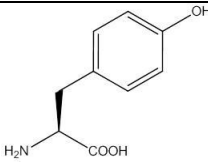
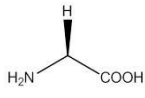
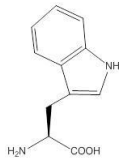
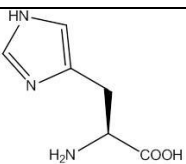
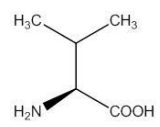
HIV-1	virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
HOBT	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HR1	heptad-repeat 1
HR2	heptad-repeat 2
IC50	concentración inhibitoria 50
ITC	calorimetría de titulación isotérmica
IFN	interferón
IL	interleuquina
INNTI	inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa
INTI	inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa
LUV	liposomas unilamelares grandes
MeOH	metanol
M	metionina
MLV	liposomas multilamelares
NATA	N-acetil-triptófanoamida
NBD	ácido 6-(7-nitrobenzofurazan-4-y-lamino)esanoico
PAL	ácido 5(aminometil-3'-5'-dimetoxifenoxi) valérico
PBS	tampón fosfato salino
PC	fosfatidilcolina
PEG	polietilenglicol
PF-HIV-1	péptido de fusión de la glicoproteína gp41 del virus del HIV-1
PG	fosfatidilglicerol
Pmc	2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonio
POPG	palmitoiloleoilglicerofosfoglicerol
PS	fosfatidilserina
PyBOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(pirrolidin) fosfonio
RNA	ácido ribonucleico
Rho	rodamina

---

---

SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SM	síntesis múltiple
SPPS	síntesis de péptidos en fase sólida
SPR	resonancia de plasmón superficial
SUV	liposomas unilamelares pequeños
TBTU	tetrafluoroborato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il)-dimetilamino-metilen]- N-metilmetanaminio
tBu	terbutil
TFA	ácido trifluoroacético
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
THF	tetrahidrofurano
TIS	triisopropilsilano
TM	transmembrana
TNBS	ácido trinitrobencenosulfónico
TRIS	tris(hidroximetil)-aminometano
Trp	triptófano
Trt	trifenilmetil
UPLC	cromatografía líquida de ultrapresión

---

Aminoácido	Estructura	Aminoácido	Estructura
Alanina, Ala, A		Isoleucina, Ile, I	
Ác. Aspártico, Asp, D		Leucina, Leu, L	
Ác. Glutámico, Glu, E		Lisina, Lys, K	
Arginina, Arg, R		Metionina, Met, M	
Asparagina, Asn, N		Prolina, Pro, P	
Cisteína, Cys, C		Serina, Ser, S	
Fenilalanina, Phe, F		Treonina, Thr, T	
Glutamina, Gln, Q		Tirosina, Tyr, Y	
Glicina, Gly, G		Triptófano, Trp, W	
Histidina, His, H		Valina, Val, V	

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1 El GBV-C</b>	<b>4</b>
1.1 Clasificación y organización del genoma	4
1.2 Prevalencia y transmisión	6
<b>2 Virus del HIV</b>	<b>8</b>
2.1 Composición y estructura de los viriones maduros de HIV-1 y su ciclo de vida	9
2.2 Reconocimiento y fusión celular del HIV-1	11
<b>3 Interacción de GBV-C con HIV-1</b>	<b>13</b>
3.1 Estudios clínicos	13
3.2 Interacción del GBV-C con los receptores de entrada del HIV-1	14
3.3 Interacción del GBV-C con la respuesta inmunitaria	14
3.4 Inhibición de la replicación del HIV-1 por el GBV-C	16
<b>4 Terapias actuales contra el HIV-1</b>	<b>17</b>
<b>5 Péptidos inhibidores del HIV-1</b>	<b>18</b>
<b>6 Interacción virus-célula</b>	<b>24</b>
6.1 Péptido de fusión	25
<b>7 Modelos de membrana</b>	<b>26</b>
7.1 Capas lipídicas monomoleculares	28
7.2 Liposomas	33
<b>OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>41</b>
<b>1 Reactivos y disolventes</b>	<b>43</b>
<b>2 Instrumentación general</b>	<b>44</b>
<b>3 Síntesis de péptidos en fase sólida</b>	<b>45</b>
3.1 Soporte sólido	47
3.2 Reactivos de acoplamiento	51



3.3 Desprotección del grupo Fmoc	54
3.4 Test de identificación de aminas libres	56
3.5 Desanclaje y desprotección de la peptidil-resina	58
3.6 Adición de sondas fluorescentes	59
3.7 Síntesis de lipopéptidos	60
3.8 Ciclación	60
3.9 Síntesis semiautomática de péptidos	61
3.10 Caracterización de péptidos	63
3.11 Desalación y purificación de los péptidos	64
<b>4 Ensayos biofísicos</b>	<b>65</b>
4.1 Modelos de membrana: Liposomas	65
4.2 Modelos de membrana: Capas lipídicas monomoleculares	71
4.3 Dicroísmo circular	75
4.4 Resonancia en plasmón superficial (SPR)	79
<b>5 Ensayos Celulares</b>	<b>82</b>
5.1 Hemólisis	82
5.2 Ensayo de fusión celular	84
5.3 Ensayos de susceptibilidad del HIV-1 a los péptidos	86
5.4 Ensayo de citotoxicidad MTT	87
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>89</b>
<b>1 PÉPTIDOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE LA GLICOPROTEÍNA E2 DEL GBV-C COMO POSIBLES INHIBIDORES DEL HIV-1</b>	<b>91</b>
1.1 Estudio de interacción entre los péptidos P59, P97 y P105 de la proteína de envoltura E2 del GBV-C y el PF-HIV-1 mediante las isotermas de unión	94
1.2 Estudio de interacción del péptido P59 de la proteína de envoltura E2 del GBV-C con PF-HIV-1 mediante el ensayo de las isotermas de unión	99
<b>2 DISEÑO Y SÍNTESIS DE DERIVADOS PEPTÍDICOS DE LA REGIÓN E1(22-39) DEL VIRUS GBV-C: ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS AMINOÁCIDOS EN SU ESTRUCTURA PRIMARIA Y DE LA CARGA NETA EN SU CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DEL PF-HIV-1</b>	<b>103</b>
2.1 Síntesis múltiple de péptidos derivados del péptido E1P8 del virus GBV-C	104
2.2 Síntesis, purificación y caracterización del péptido PF-HIV-1	106

2.3 Estudios de interacción de los análogos de E1P8 con el PF-HIV-1 por Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)	108
2.4 Estudio de interacción de los análogos de E1P8 con PF-HIV-1 por el ensayo de liberación de contenidos vesiculares	115
2.5 Estudio de interacción de los péptidos derivados E1P8, E1P8-7, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21 del GBV-C con el PF-HIV-1 mediante el ensayo de hemólisis	119
2.6 Cinética de adsorción de las secuencias peptídicas E1P8, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21 del GBV-C	120
2.7 Cinética de penetración a área constante del péptido PF-HIV-1 y de las secuencias peptídicas E1P8, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21 del GBV-C	124
2.8 Estudios de miscibilidad de los péptidos E1P8, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21 del GBV-C y del PF-HIV-1 empleando monocapas de extensión	127
2.9 Estudio de interacción de los péptidos derivados E1P8, E1P8-7, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21 del GBV-C con el PF-HIV-1 mediante el método de centrifugación	149
2.10 Estudio de interacción de los péptidos derivados E1P8, E1P8-7, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21 del GBV-C con el PF-HIV-1 mediante difracción circular (CD)	153
2.11 Ensayo de fusión celular con péptidos potenciales inhibidores del PF-HIV-1 derivados de la proteína E1 del GBV-C	158
2.12 Ensayo de susceptibilidad del HIV-1 a los péptidos potencialmente inhibidores del PF-HIV-1 derivados de la proteína E1 del GBV-C	161

### **3 DISEÑO Y SÍNTESIS DE DERIVADOS PEPTÍDICOS DE LA REGIÓN E1(22-39) DEL VIRUS GBV-C: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-HIV-1 DE NUEVAS PRESENTACIÓN PEPTÍDICA: LIPOPÉPTIDOS Y PÉPTIDO CÍCLICO**

3.1 Síntesis de derivados del péptido E1P8 del virus GBV-C	164
3.2 Síntesis del péptido de fusión del <i>Measles Virus</i> y de la secuencia peptídica VIR-576	166
3.3 Estudio biofísico preliminar de los derivados del péptido E1P8 del virus GBV-C mediante el ensayo del <i>leakage</i>	170
3.4 Estudio celular de los derivados del péptido E1P8 del virus GBV-C mediante el ensayo de fusión celular	173
3.5 Estudio <i>in vitro</i> de la inhibición del virus del HIV-1 inducida por los derivados del péptido E1P8 del virus GBV-C	175
3.6 Estudio de interacción del péptido E1P8 cyc con el PF-HIV-1 mediante el ensayo del <i>leakage</i>	176
3.7 Estudio de interacción del E1P8 cyc con el PF-HIV-1 mediante el ensayo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET)	178

3.8 Estudios de miscibilidad mediante monocapas de extensión del péptido E1P8 cyc del GBV-C y del PF-HIV-1	183
3.9 Estudio de interacción del E1P8 cyc con el PF-HIV-1 mediante el ensayo de hemólisis	193
3.10 Estudio conformacional de interacción del péptido E1P8 cyc y el PF-HIV-1 mediante dicróismo circular (CD)	195
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>201</b>
<b><i>ANEXOS</i></b>	<b>205</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>213</b>
<b>TRABAJOS RELACIONADOS</b>	<b>237</b>

# **INTRODUCCIÓN**



El GB virus C (GBV-C) es un virus formado por una única cadena de RNA que pertenece a la familia *Flaviviridae* [1, 2]. Está relacionado con el virus de la hepatitis C ya que tiene una organización genómica y una homología en la secuencia muy próxima a este virus hepatotrópico [3].

Debido a que este virus y el virus del inmunodeficiencia humana (HIV) comparten las vías de transmisión, el virus GBV-C está presente, en elevada proporción, en personas infectadas con el virus del HIV.

En los últimos años, se han publicado numerosos trabajos en los que se han asociado la co-infección del GBV-C y el HIV con una menor progresión de dicha enfermedad así como con una mayor supervivencia de los pacientes una vez que el Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) se ha desarrollado [4-6].

El mecanismo por el cual el virus GBV-C ejerce un “efecto protector” en los pacientes con HIV todavía no ha sido establecido. Se ha visto que la infección por el virus GBV-C puede alterar *in vivo* la homeostasis de las células T a través de diversos mecanismos, que incluyen la modulación de las quimiocinas, la liberación de las citoquinas y la expresión de los correceptores (CCR5 y CXCR4), así como la disminución de la activación de células T, lo cual puede contribuir a mejorar los resultados clínicos de los pacientes infectados con HIV [7]. Los estudios *in vitro*, además, confirman estas observaciones clínicas y demuestran un efecto inhibitorio del GBV-C en la replicación del virus del HIV [8].

Por todo ello se plantea como un estudio de interés la interacción entre los virus GBV-C y HIV ya que podría dar lugar al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento del SIDA.

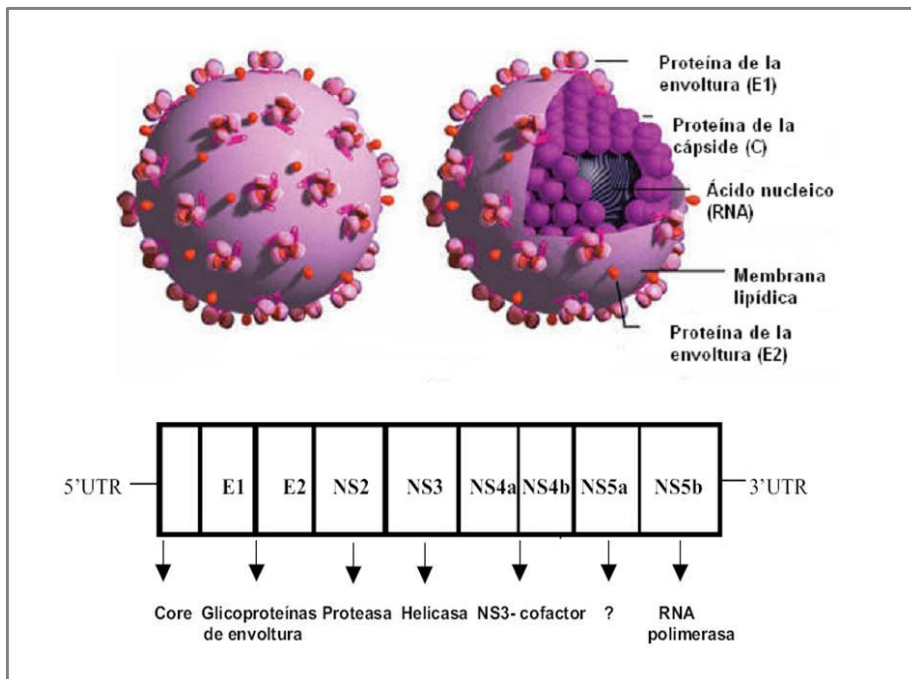
## 1 El GBV-C

En 1967 un cirujano de Chicago con iniciales GB contrajo una hepatitis aguda de origen desconocida. Más de 3 décadas después, en abril de 1995, el grupo farmacéutico estadounidense *Abbott Laboratories* informó de un nuevo virus humano encontrado en el suero de un paciente con hepatitis no-(A-E). Lo llamaron GB virus C (GBV-C) en base a las similitudes en la secuencia de nucleótidos con dos virus, llamados GB virus A y B (GBV-A y GBV-B) [1, 9] que fueron descubiertos en primates que desarrollaron la hepatitis después la inoculación del suero del cirujano estadounidense GB [10].

Al mismo tiempo, los investigadores de la empresa farmacéutica estadounidense *Genelabs Technologies* descubrieron un virus en el plasma de un paciente con hepatitis crónica que llamaron virus de la hepatitis G (HGV) [2, 9]. El análisis del genoma de las secuencias de GBV-C y HGV reveló un 96% de homología, indicando que eran dos aislados del mismo virus [1, 2, 9]. Posteriormente, se investigaron diversas poblaciones de individuos con riesgo de sufrir enfermedades hepáticas, y no se identificó ninguna relación entre el virus GBV-C y la hepatitis [11], es decir el virus GBV-C no causaba hepatitis y por ellos se ha desestimado el término de hepatitis G.

### 1.1 Clasificación y organización del genoma

El virus GBV-C se clasifica como un miembro de la familia *Flaviviridae* en base a su secuencia de nucleótidos y su organización genómica [3], aunque no se atribuye a ningún de los tres géneros de la familia. Recientemente, se propuso que el virus GBV-C, junto con el virus GBV-A, formara un cuarto género dentro de la familia *Flaviviridae* llamado '*Pegivirus*' [12].



**Figura 1:** Modelo de la estructura del virus GBV-C. Poliproteína del virus GBV-C que contiene la región no codificada (5'UTR y 3'UTR; UTR=untranslated region) y la región que codifica para las proteínas: E1, E2, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a y N5b. Fuente: PRN Notebook ([www.pm.org](http://www.pm.org)).

La organización del genoma del GB virus C es similar a la del virus de la hepatitis C (HCV) [3]. Presenta una cadena positiva de RNA (9,4 kb) [1-3] con una región no traducida (NTR) en el extremo 5', seguida por una zona que codifica por una poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos. A continuación se encuentra la región NTR 3' que está implicada en la replicación del RNA. La poliproteína presenta dos proteínas estructurales (E1, E2) y cuatro no estructurales (non-structural, NS) (Figura 1). Entre estas últimas, una helicasa RNA dependiente (NS3), una proteasa (NS4) y una polimerasa RNA dependiente (NS5) [3].



En el virus GBV-C, a diferencia del HVC, todavía no se ha identificado una proteína que codifique para la nucleocápside. Sin embargo, la caracterización microscópica y biofísica de la partículas del virus en plasma sugiere la existencia de dicha estructura [13].

El principal sitio de replicación del virus GBV-C no está completamente caracterizado. Aunque a diferencia de HVC, el GBV-C parece ser linfotrópico, ya que se ha visto que se replica *in vitro* en linfocitos T y B obtenidos de individuos infectados por GBV-C [14].

Los primeros estudios encontraron RNA del GBV-C en muestras de hígado humano, lugar de replicación de los virus de hepatitis. Sin embargo, en estudios posteriores se encontró una cantidad de RNA del virus GBV-C mayor en la sangre en comparación con la hallada en el hígado, lo que sugirió que este último no podía ser el lugar de la replicación [3]. Además, se encontraron cadenas de RNA del GBV-C en la médula ósea y en el bazo sugiriendo un sitio hematopoyético por la replicación del virus. Aunque no se ha encontrado RNA del virus en linfocitos de sangre periférica, se ha demostrado su replicación *in vitro* en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) [3]. Estos resultados sugieren la posibilidad de que las células progenitoras de los linfocitos representen la vía principal de replicación del GBV-C.

## **1.2 Prevalencia y transmisión**

La infección activa por el virus GBV-C puede identificarse mediante la detección de RNA en el suero, mientras que la detección de anticuerpos contra la glicoproteína de envoltura E2 GBV-C es indicativa de la infección pasada [11, 15].

A diferencia de HVC, para el virus GBV-C no es común la detección simultánea de RNA viral y anticuerpos de la proteína E2 u otras proteínas virales [4, 16, 17]. En un estudio de una cohorte de pacientes infectados por HIV, sólo el 1,8% de los casos con viremia del GBV-C presentaban también anticuerpos anti-E2, mientras que el 75% de los pacientes que tenían anticuerpos anti-E2, no presentaban RNA del virus GBV-C [4]. En general, se

detectaron mas anticuerpos anti-glicoproteína de envoltura E2 en personas sin viremia activa en comparación con aquellas que sí la presentaban [17].

La infección por GBV-C es frecuente y se distribuye en todo el mundo. Al igual que el HCV, el GBV-C puede permanecer durante muchos años sin ninguna evidencia de síntomas clínicos o enfermedad, tanto en pacientes inmunodeprimidos como en la población sana [3, 11]. Estudios epidemiológicos [3, 12] han demostrado que en los países desarrollados, el 1-5% de los donantes de sangre presentaban infección por el virus GBV-C en el momento de la donación, mientras que en los países en vías de desarrollo más del 20% de los donantes de sangre estaban infectados. La *Food and Drug Administration* (FDA), agencia del gobierno de los Estados Unidos responsable de la regulación de alimentos, medicamentos y cosméticos, no obliga a la detección del virus GBV-C en la sangre de los donantes, ya que la presencia de este virus no está asociada con ninguna enfermedad hepática. En base a la prevalencia del virus GBV-C y al número de transfusiones de sangre, aproximadamente 1000 personas podrían recibir diariamente sangre con GBV-C en los EE.UU. [18].

Al igual que otros virus linfotrópicos, el virus GBV-C se transmite por vía sexual, vertical y por una exposición a sangre contaminada [19]. En consecuencia, es muy frecuente la coinfección con el GBV-C en pacientes con otras infecciones de transmisión sexual o parenteral. Por ejemplo, la prevalencia de GBV-C es aproximadamente del 20% en personas con infección crónica por el HCV y del 20- 40% en individuos que son HIV-positivos [3].

A pesar de la prevalencia de la infección del GBV-C en la población general y su efecto beneficioso en los individuos infectados por el HIV, actualmente no están disponibles pruebas de diagnóstico comerciales para detectar la viremia del GBV-C o la presencia de anticuerpos contra las proteínas estructurales del virus.

## 2 Virus del HIV

El virus del HIV, es el agente infeccioso causante del SIDA. El virus provoca, al atacar a los linfocitos CD4, la destrucción del sistema inmunitario del paciente afectado, dejándolo expuesto a la agresión de numerosas infecciones oportunistas que pueden conllevar la muerte prematura del paciente.

Se cree que el SIDA se originó en África, donde monos y simios albergan un virus similar al HIV llamado SIV (virus de inmunodeficiencia en simios), y llegó inicialmente a los seres humanos a través de chimpancés salvajes que viven en África central. Aunque sigue siendo una incógnita el cómo pudo la enfermedad cruzar la barrera de las especies, la teoría más extendida es que se contrajo a partir de personas que cazaron y comieron chimpancés infectados.

En 1981 se descubrieron los primeros casos de SIDA, y en 1983 se identificó el HIV como agente etiológico de dicha enfermedad. Aunque un estudio retrospectivo, realizado con sueros almacenados en distintas partes del mundo, mostró que el primer caso de infección por HIV fue en Zaire en 1959 [20].

En 1986, se identificó un segundo agente viral, parecido al HIV en casi el 50% de su genoma, que fue denominado HIV-2 [21].

El HIV, hoy conocido como HIV-1, es el tipo más extendido en el mundo, mientras HIV-2 es menos común y se encuentra localizado solo en determinadas zonas de África occidental. Las principales vías de transmisión del HIV-1 son la sexual, la parenteral y la vertical. Mientras que la mayoría de los países desarrollados la principal vía de contagio del virus es la homosexual [22]. En los países del tercer mundo predomina la transmisión heterosexual [23].

El diagnóstico de la infección por el HIV-1 se realiza habitualmente mediante la detección de anticuerpos contra el virus: en primer lugar se emplea un test comercial de ELISA, y si éste es positivo se efectúa un test confirmatorio, generalmente un Western Blot.

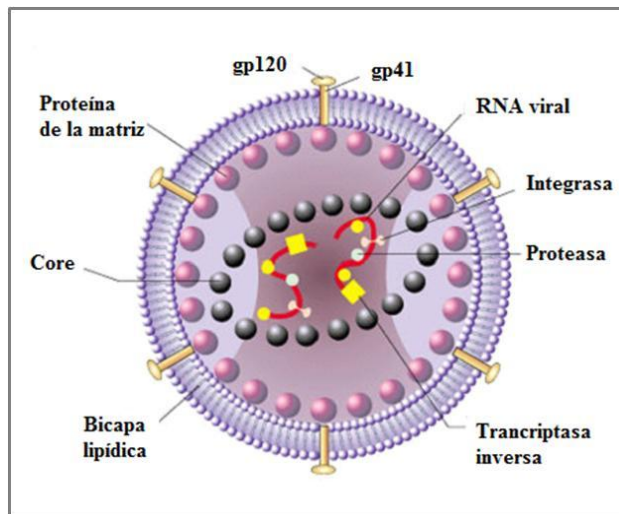
La infección por el HIV-1 empieza a manifestarse con síntoma de mononucleosis, que coincide con la aparición de anticuerpos contra el virus pocas semanas después del contagio, aunque en muchos casos este cuadro pasa totalmente inadvertido. Los sujetos infectados quedan completamente asintomáticos durante unos años, hasta que la progresiva deplección de linfocitos T CD4 y el deterioro inmunológico que se produce facilita el desarrollo de infecciones oportunistas, neoplasias y otras enfermedades características del SIDA, que finalmente pueden conducir a la muerte prematura.

## **2.1 Composición y estructura de los viriones maduros de HIV-1 y su ciclo de vida**

El HIV-1 es un virus RNA clasificado dentro de la familia de los retrovirus humanos (*Retroviridae*) y que pertenece al género *Lentivirus* [24, 25].

El HIV-1 (Figura 2) está formado por una membrana lipídica en la que se insertan las glicoproteínas de envoltura gp120 y gp41. El material genético, formado por dos copias de RNA con polaridad positiva, se localiza dentro de la cápside viral y se encuentra estabilizado a través de complejos con la proteína de la nucleocápside, p7, (NU). Las enzimas esenciales para la replicación viral, transcriptasa inversa (TI), proteasa (PR) e integrasa (IN), además de las proteínas reguladoras (Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr, Vpu) se encuentran situadas en el interior de la cápside [26-28].

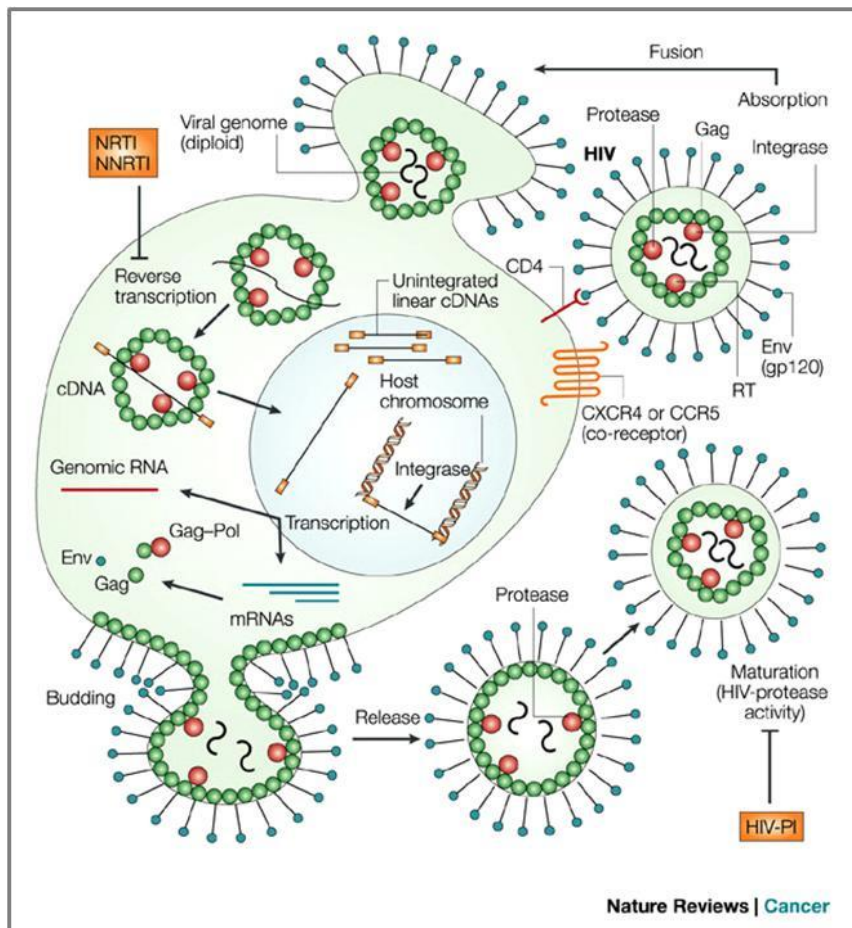
El HIV-1 infecta principalmente los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, pero también en menor medida a los monocitos/macrófagos, las células dendríticas, las células de Langerhans y las células microgliales.



**Figura 2:** Esquema corte transversal del virus del HIV-1. Fuente: <http://www.cobach-elr.com>.

La replicación del HIV-1 se puede dividir en dos fases: una fase temprana y una fase tardía (Figura 3):

- ✓ La fase temprana comienza con la entrada del virus en la célula huésped tras la unión de la glicoproteína de la envoltura gp120 del HIV-1 al receptor celular CD4<sup>+</sup> y finaliza con la integración del DNA viral dentro del genoma del huésped. Esta fase tiene lugar en ausencia de la expresión de genes virales, constituyendo así un período de latencia que se mantiene hasta que un estímulo externo activa la expresión y la replicación viral.
- ✓ La fase tardía comienza con la transcripción y procesamiento del RNA a partir del DNA viral integrado y acaba con la liberación de los viriones al medio extracelular, donde sufren un proceso de maduración que da lugar a la formación de viriones maduros infectivos.



**Figura 3:** Esquema de replicación del HIV-1 [29].

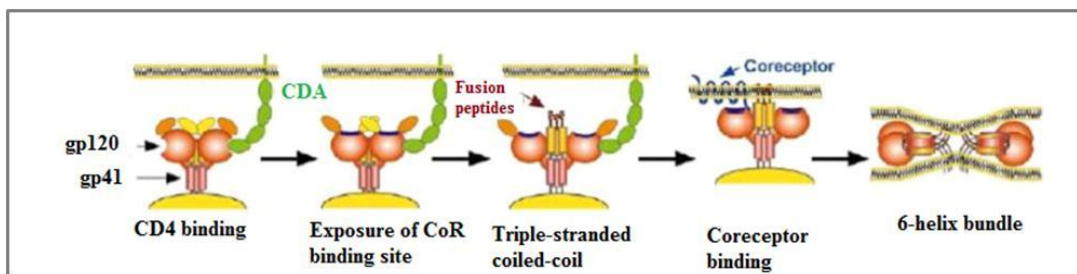
## 2.2 Reconocimiento y fusión celular del HIV-1

El primer paso de infección por el HIV-1 es el reconocimiento de la glicoproteína de envoltura gp120 por el receptor CD4 [30] expresado principalmente en los linfocitos T, macrófagos y células dendríticas. Después, el complejo CD4-gp120 interacciona con los correceptores de quimiocinas, principalmente, CCR5 y/o CXCR4 [31]. La unión al correceptor promueve un cambio conformacional en gp120 lo que permite que esta se

despliegue promoviendo así un cambio conformacional de otra glicoproteína presente en la envoltura vírica, la gp41 [32].

La glicoproteína gp41 es la principal responsable del proceso de fusión de la membrana del HIV-1 con la célula diana. Si se analiza de forma lineal la estructura de gp41, en su extremo N-terminal se encuentra el dominio correspondiente al péptido de fusión, cuyo carácter hidrofóbico permite su inserción en la membrana celular. A continuación se encuentran las regiones repetidas HR1 (“*heptad-repeat 1*”) y HR2 (“*heptad-repeat 2*”), que presentan aminoácidos con un patrón de repetición característico de 7 residuos (abcdefg), de los cuales los correspondientes a las posiciones “a” y “d” son aminoácidos hidrofóbicos.

En el virión libre, la glicoproteína gp41 tiene una conformación no fusogénica, pero cuando la gp120 se une a su receptor, la glicoproteína gp41 sufre un cambio conformacional (prehorquilla intermedia) de manera que queda expuesto el péptido de fusión insertándose éste en la membrana de la célula diana. Tras la inserción, la HR-2 se pliega en tres helicoides sobre las tres HR-1 formando una estructura de seis hélices (horquilla trimérica, 6HB) cuyo objetivo es acortar más la distancia entre el virus y la célula hasta poner en contacto ambas membranas que acaban fusionándose (Figura 4).



**Figura 4:** Esquema del reconocimiento y fusión celular del virus HIV-1 [33].

La estructura cristalográfica de la glicoproteína gp41 del HIV-1 revela que se asocia formando trímeros simétricos y que cada monómero está formado por dos hélices  $\alpha$  unidas mediante un lazo. Las hélices  $\alpha$ -amino terminal de cada monómero forman el núcleo central de una hélice superenrollada (*coiled coil*) paralela y las tres hélices  $\alpha$ -carboxi terminal se

empaquetan alrededor del núcleo de manera antiparalela. El núcleo presenta una cavidad hidrofóbica en la región c-terminal de la HR-1 que interacciona con tres residuos hidrofóbicos conservados (Trp-628, Trp-631 y Ile-635) de HR-2, que forman un dominio llamado PBD (*pocket-binding domain*). Esta interacción parece ser crucial para la estabilidad de la horquilla trimérica y por eso un posible candidato para el desarrollo de terapias anti-HIV-1 [34, 35]. Estudios recientes sugieren que también el motivo QIWNMT (621-627), localizado en la región terminal del HR-1, adyacente al PBD, está implicado en la formación y estabilización de la 6HB [36]. Estudios de cristalografía [37] del complejo peptídico formado por la secuencia (621-652) de la HR-2 y el péptido T-21 de la región HR-1 han demostrado que los residuos Met-626 y Thr-627 forman una estructura inusual de gancho (definida también M-T *hook*), que resulta ser crucial en la estabilización de la interacción entre el PBD de la HR-2 y la cavidad hidrofóbica de la HR-1. Mediante estudios de mutagénesis se ha demostrado que estos residuos (Met-626 y Thr-627) son esenciales para la fusión celular mediada por el HIV-1 y la entrada del virus en la célula. Así, la estructura de gancho M-T se ha propuesto como un elemento crítico en el diseño de inhibidores de la fusión del HIV-1 [38].

### **3 Interacción de GBV-C con HIV-1**

#### **3.1 Estudios clínicos**

Tras el descubrimiento del GBV-C, se han publicado numerosos trabajos en los que se asocia la co-infección de este virus y el HIV-1 con una menor progresión de dicha enfermedad y una mayor supervivencia de los pacientes que ya han desarrollado el SIDA [4, 6, 11, 39-42]. Estudios realizados en un estadio avanzado (> 5 años) de la infección por HIV-1 (n = 1294 pacientes), asocian el GBV-C con una reducción de aproximadamente 2,5 veces la mortalidad causada por HIV-1 [43]. En otros trabajos, el GBV-C se ha relacionado con un aumento de la respuesta inmunitaria, una menor carga viral del HIV-1, y un retraso en la progresión del SIDA [11, 39-41]. La infección por GBV-C se relacionó con una mejor



respuesta a la terapia de antirretrovirales en los individuos infectados por el HIV-1 [20, 24, 25]. La viremia del GBV-C se asoció también con una reducción de la transmisión vertical de madres a hijos del HIV-1 en las mujeres embarazadas, sobre todo cuando el recién nacido se infectaba por el GBV-C durante el parto [44]. Por otra parte, otros estudios no observaron este efecto beneficioso [45, 46]; aunque cabe destacar que éstos estudios se llevaron a cabo durante los primeros estadios del HIV-1, o se realizaron después de tratamientos eficaces contra este virus.

A pesar de que en numerosos estudios se ha observado un efecto protector de la infección por el GBV-C en los individuos con HIV-1, el mecanismo por el cual el GBV-C produce esta inhibición todavía no está del todo establecido. Varios estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que la infección por GBV-C puede interferir tanto en la replicación del virus, como en los factores de la célula huésped que sostienen el ciclo de replicación del virus.

### **3.2 Interacción del GBV-C con los receptores de entrada del HIV-1**

Estudios han relacionado una progresión más lenta de la enfermedad causada por HIV-1 con una expresión menor de los dos principales correceptores de la entrada del virus del HIV-1 en las células (CCR5 y CXCR4) y a su vez con niveles más elevados de los ligandos de estos correceptores [MIP-1 $\alpha$  (CCL3), MIP-1 $\beta$  (CC14), RANTES (CCL5) y SDF-1 (CXCL12)] [47, 48]. En personas coinfectadas por GBV-C y HIV-1 se ha observado una menor expresión de CCR5 y CXCR4 [49]. Estudios *in vitro* confirmaron esta observación clínica, el GBV-C disminuía la expresión de CCR5 y CXCR, inducía ligandos de los correceptores e inhibía la replicación de aislados de HIV-1 con tropismo X4 y R5, respectivamente [50].

### **3.3 Interacción del GBV-C con la respuesta inmunitaria**

Otros posibles mecanismos que relacionan el virus GBV-C con una menor progresión del virus del HIV-1 incluyen:

1. Potenciación de los mecanismos inmunes innatos. La respuesta inmune innata juega un papel importante en el control de la infección causada por el HIV-1 [51]. Las células dendríticas (pDC), que son los principales productores de interferones  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) durante la infección viral, suprimen la replicación de éste virus [52]. La pDC se reducen con frecuencia durante la infección por el HIV-1 y la disminución del IFN- $\alpha$  se cree contribuye a la patogénesis del virus [53, 54]. Estudios *in vitro* demuestran un aumento de la frecuencia de pDC activadas [55] y de la expresión de IFN [56] durante la infección por el GBV-C, lo que sugiere que éste virus altera la inmunidad innata. Aunque el mecanismo por el cual el virus mejora la respuesta inmune innata está aun sin explorar.
2. Reducción de la activación de los linfocitos por el GBV-C. La disfunción inmune y la activación de la respuesta inmune crónica son los rasgos característicos de la infección causada por el virus del HIV-1 y la progresión del SIDA. La activación de la respuesta inmunitaria involucra a los linfocitos T y B y concretamente a las células con los receptores CD4<sup>+</sup> infectadas por el HIV-1. Estudios recientes revelan que la co-infección HIV-1/GBV-C amortigua la activación de células T [30, 31, 64]. El mecanismo por el cual el GBV-C reduce la activación inmune no está todavía caracterizado. Estudios realizados sugieren que el virus GBV-C altera las vías de señalización y la proliferación de la Intrleucina-2, la citoquina, que promueve la activación de células T, la proliferación y está implicada en la replicación del virus del HIV-1 [57, 58].
3. Interacción con las citoquinas de los linfocitos T colaboradores. La respuesta inmune mediada por los linfocitos T colaboradores (Th1) está afectada por la presencia del HIV-1. Los niveles de citoquinas de las células Th1 se reducen en individuos seropositivos, mientras que las citoquinas de las Th2 aumentan [59]. Se ha demostrado que la co-infección GVB-C con HIV-1 está relacionada con niveles estables de Th1, y una disminución de Th2 en comparación con individuos

monoinfectados por el HIV-1 [60, 61]. Además, estos estudios sugieren que el GBV-C puede promover la diferenciación de Th1 e inducir citoquinas Th1 específicas, que son protectoras contra la infección del HIV-1, y que la proteína NS5A está implicada en este efecto.

4. Inhibición de la apoptosis de los linfocitos CD4<sup>+</sup> por el GBV-C. La proteína Fas es una citoquina que se expresa en linfocitos T activados, en células NK (*natural killer*), en neuronas y en astrocitos e induce a la apoptosis de éstas.

Los pacientes seropositivos tienen un más alto nivel de linfocitos que expresan Fas en comparación con las personas no infectadas [62], causando una disminución de células T CD4<sup>+</sup> [63]. Estudios demuestran que la frecuencia de los linfocitos que expresan Fas es significativamente menor en los pacientes seropositivos co-infectados con GBV-C [62], lo que sugiere que el GBV-C puede proteger contra la muerte celular a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> durante la infección por el HIV

### **3.4 Inhibición de la replicación del HIV-1 por el GBV-C**

Varios estudios *in vitro* han demostrado que la expresión de la glicoproteína estructural E2 y la fosfoproteína NS5A del GBV-C en células T CD4<sup>+</sup> inhiben la replicación del HIV-1 [64-68]. Por otra parte, se ha determinado que ciertos péptidos derivados de la proteína E2 interfieren con la unión y la fusión celular del virus [69]. Además, se han publicado estudios biofísicos que han definido que determinados péptidos sintéticos derivados de la proteína E1 GBV-C, que interactúan con el péptido de fusión del virus [70], podrían inhibir la entrada del HIV-1 en la célula huésped. Otros estudios demuestran que la proteína NS5A del GBV-C disminuye la expresión de los receptores CD4 [71].

Recientemente, se han utilizado anticuerpos anti-proteína de envoltura E2 del GBV-C para inmunoprecipitar partículas de HIV-1 y neutralizar aislados del HIV-1 con tropismo X4 y R5 [72], lo que sugiere que ésta proteína puede contener algún motivo inmunógeno similar

a alguno del HIV-1 causando así una reactividad cruzada. Esto explicaría la unión de los anticuerpos anti-E2 al HIV-1 y su inhibición.

#### **4 Terapias actuales contra el HIV-1**

Los fármacos antirretrovirales disponibles en la actualidad actúan en varias etapas del ciclo vital del HIV-1 y pertenecen a cinco grupos principales:

- ✓ Los **Inhibidores Nucleósidos/Nucleótidos de Transcriptasa Inversa (INTI o INTR)** constituyeron el primer tipo de medicamento disponible para tratar la infección del HIV-1 en 1987. Los INTI interfieren con la acción de la transcriptasa inversa viral.
- ✓ Los **Inhibidores No Nucleósidos/Nucleótidos de Transcriptasa Inversa (INNTI o INNTR)** aparecieron en 1996, cuando la monoterapia con INTI dejó de ser eficaz por la aparición de resistencias. Al igual que los INTI, los INNTI inhiben la replicación del HIV-1 interaccionando con la transcriptasa inversa.
- ✓ Los **Inhibidores de la proteasa** aprobados en 1995, inhiben la replicación del HIV-1 interaccionando con la proteasa viral.
- ✓ Los **Inhibidores de la Fusión e Inhibidores de la entrada** que inhiben la fusión del HIV-1 en las células. Un inhibidor de fusión es el T20 que fue autorizado en 2003 sólo para ser utilizado por personas que ya han probado otros tratamientos. El T20 difiere de otros antirretrovirales en que necesita ser inyectado (de lo contrario es digerido en el estómago). En 2007, un nuevo inhibidor de la entrada conocido como Maraviroc<sup>®</sup> fue autorizado en los Estados Unidos. Este nuevo antirretroviral bloquea al correceptor CCR5 en las células inmunológicas humanas, previniendo que el HIV-1 se adhiera a la superficie de las células.
- ✓ Los **Inhibidores de la integrasa**. El medicamento, que se integraría en este grupo es el Raltegravir<sup>®</sup>, que fue aprobado en 2007 e inhibe la integrasa, impidiendo que el HIV-1 inserte su material genético en las células humanas.

Para que sean realmente eficaces, estos medicamentos deben emplearse en combinaciones, lo que se conocen como “tratamiento antirretroviral de gran actividad” (TARGA).

## **5 Péptidos inhibidores del HIV-1**

En los últimos años, se han dedicado numerosos esfuerzos al desarrollo de péptidos sintéticos como inhibidores del virus del HIV-1.

La principal ventaja de los péptidos sintéticos como agentes terapéuticos es su baja toxicidad y la versatilidad que presentan las secuencias peptídicas a ser modificadas, pudiendo mejorar así su distribución en el organismo y, por tanto, su eficacia.

Se han estudiado y se siguen estudiando en la actualidad un gran número de péptidos como inhibidores del virus del HIV-1 que actúan impidiendo la entrada del virus a las células (Tabla 1). El principal beneficio de este tipo de inhibidores es que pueden actuar como profilácticos, es decir pueden evitar la infección primaria y la integración del genoma viral en el genoma de la célula huésped. Esto implicaría una reducción del riesgo de sufrir efectos secundarios y, además, se evita el establecimiento y el mantenimiento de reservorios virales latentes.

La mayoría de los péptidos que inhiben la entrada del HIV-1 a la célula huésped son derivados de las regiones HR-1 y HR-2 de la glicoproteína de envoltura gp41 del HIV-1. Los péptidos más activos poseen secuencias derivadas de la región HR-2 [73]. El T-20 o Enfuvirtide<sup>®</sup>, inhibidor del virus del HIV-1 aprobado en el 2003 para uso clínico [74], es un péptido sintético de 36 aminoácidos, derivado del epítipo conservado de la región HR-2 de la glicoproteína gp41, que mediante su unión competitiva a la región HR-1 del gp41 evita que ésta se una a la región HR-2 viral y, por tanto, favorece que no se forme la estructura en horquilla trimérica que precede la fusión del virus a la célula [73, 75, 76].

**Tabla 1:** Estructura primaria de péptidos inhibidores de la entrada del HIV-1 a la célula.

<b>Péptidos inhibidores derivados de la región HR-2 de la gp41 del HIV-1</b>	
T20	YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF
C34	WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL
MT-C34	MTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL
T1249	WQEWQKITALLEQAQIQEKNEYELQKLDKWASLWEWF
SFT	SWETWEREIEENYTKQIYKILEESQEQQDRNEKDLLL
CP621-652	QIWNNMTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQ
CP32M	VEWNEMTWMEWEREIEENYTKLIYKILEESQEQ
SC22EK	WEEWWDKKIEEYTKKIEELIKKS
MT-SC22EK	MTWEEWWDKKIEEYTKKIEELIKKS
<b>Péptidos inhibidores no derivados de la gp41 del HIV-1</b>	
(PIE7) <sub>3</sub>	(KGACDYPEWQWLCAA) <sub>3</sub>
(PIE12) <sub>3</sub>	(HPCDYPEWQWLCELGK) <sub>3</sub>
VIRIP	LEAIPMSIPPEVKFNKPFVF
VIR-567	(LEAIPCSIPPEFLFGKPFVF) <sub>2</sub>
VIR-353	LEAIPCSIPPCFLFNKPFVF

Desde la aparición del T-20, han surgido nuevos péptidos inhibidores de la glicoproteína gp41, el T-1249 o Tifuvirtide® y el T-649 [77, 78], análogos al T-20 y el C34, que incorpora más aminoácidos de la región N-terminal que el T20. Aunque el C34 presenta mayor actividad anti-HIV-1, así como una susceptibilidad reducida a desarrollar resistencias en comparación con el T-20, éste ha sido excluido como posible fármaco anti-HIV-1 debido a su poca solubilidad en medios acuosos [79]. A diferencia del T-20, el C34 posee en su secuencia un fragmento que se une al HR-1, e incluye el dominio hidrofóbico PBD, por lo tanto, inhibe la formación de la horquilla trimérica, que es, como se ha descrito en los

anteriores apartados, la estructura que la glicoproteína gp41 asume para fusionarse con las membranas celulares [34].

El T-20, debido a su carácter peptídico, presenta una baja biodisponibilidad por vía oral y una rápida degradación por parte de las proteasas. Por lo tanto, se administra por vía subcutánea. Además, a pesar de derivar de una región conservada del virus, ya han aparecido mutantes resistentes. Para evitar esta desventaja, se han desarrollado la segunda y tercera generación de péptidos inhibidores del HIV-1 con la finalidad de aumentar la estabilidad y la potencia del T-20. Entre ellos, hay que mencionar el T-1249 o Tifuvirtide<sup>®</sup> y el Sifurtide (SFT). El T-1249, desarrollado por la empresa Trimeris, ha mostrado una mejor actividad anti-HIV-1 contra las resistencias en comparación con el T20 [80, 81]. Aunque el péptido alcanzó la fase clínica II, su desarrollo clínico se detuvo en el 2004 debido a la difícil formulación del fármaco [82]. Además, han aparecido mutantes resistentes a este inhibidor [83].

El SFT, desarrollado por la empresa Fusogen, recientemente ha completado la fase clínica II en China, y se ha demostrado que presenta una excelente eficacia en reducir la carga viral y aumentar el número de células T CD4 [84, 85]. Se ha demostrado, también, su potente actividad anti-viral contra un amplio rango de aislados con tropismo R5 y X4, y sobre todo contra mutantes resistentes al T-20 y al T-1249 [86]. Además, se ha determinado la estructura cristalográfica del SFT en el complejo que forma con la región HR-1 y se han determinado los residuos responsables de su actividad [86]. Debido a su potente actividad antiviral así como la seguridad y la tolerancia demostrada en ensayos clínicos, recientemente se ha evaluado la eficacia anti-HIV-1 del SFT formulado como gel para su administración por vía tópica [87]. Los resultados han demostrado que el gel SFT es un producto eficaz, seguro y estable, y que podría ser probado como microbicida vaginal o rectal en ensayos clínicos, para prevenir así la transmisión sexual del HIV-1.

Otro péptido inhibidor de la fusión del virus en la célula es el péptido CP621-652, que posee en su secuencia el motivo QIWNNMT que, como se ha descrito previamente, es una secuencia de aminoácidos localizada en la región terminal del HR-1, adyacente al PBD [36]. Se ha demostrado que el péptido CP621-652 es un potente inhibidor de la fusión del HIV-1, capaz de inhibir la formación de la 6HB de manera dosis-dependiente [88].

Otros estudios recientes han determinado que algunos aminoácidos de la secuencia primaria del CP32 no son importantes para la actividad y estabilidad del péptido, y por eso se han sustituido para mejorar de este modo la solubilidad y la interacción del péptido con la región HR-1. Como resultado, se ha diseñado el péptido CP32M que muestra una potente actividad anti-viral contra aislados virales con tropismo R5 y doble tropismo R5X4, así como contra mutantes del virus resistentes a los inhibidores peptídicos T-20 y C34 [89].

El CP621-652 y el CP32M contienen los residuos Met-626 y Thr-627 en su estructura primaria, adoptando la estructura de gancho M-T, que mejora sustancialmente la estabilidad de la unión de estos inhibidores a la cavidad hidrofóbica de la gp41 [37, 38]. Para comprobar la función estructural de este determinante crítico, se adicionaron los residuos Met-626 y Thr-627 al extremo amino-terminal del péptido C34 [38]. El péptido resultante, MT-C34, mostraba un incremento significativo de la actividad anti-viral así como de la estabilidad. Teniendo en cuenta estos resultados, que parecen demostrar que la estructura M-T es un elemento estructural fundamental para aumentar la eficacia de un péptido inhibidor, se ha planteado el diseño de una nueva generación de péptidos HR-2 inhibidores de la fusión. De este modo, en un intento de diseñar péptidos inhibidores de la fusión de longitud corta, con elevada afinidad para la cavidad hidrofóbica de la gp41, se han incorporado los dos residuos del gancho M-T en el extremo amino-terminal de una pequeña secuencia peptídica de la región HR-2, SC22EK [37]. Aunque SC22EK mostraba una menor actividad anti-viral comparada con la secuencia SC34EK, derivada del C34 [90, 91], la adición de



Met-626 y Thr-627 a la secuencia SC22EK inhibía la fusión celular del HIV-1 y la infección a un nivel comparable a péptidos más largos, como C34, T-1249 y SFT.

Por otra parte, se han diseñado también péptidos inhibidores de fusión que no derivan de dominios de la gp41. Concretamente, se han diseñado D-péptidos, secuencias formadas por D-aminoácidos, que se unen específicamente al bolsillo HR-1 de la gp41 con elevada afinidad [92]. Estos D-péptidos presentan una mayor vida-media, biodisponibilidad por vía oral y resistencia a la degradación de proteasas respecto a otros inhibidores de fusión. Se ha descrito que el D-péptido trimérico, llamado PIE7 (*pocket-specific inhibitor of entry 7*) es un potente inhibidor de la entrada de aislados virales con tropismo X4 y R5 a concentraciones nanomolares [93]. Recientemente, el mismo grupo ha reportado el diseño y la caracterización de un nuevo D-péptido inhibidor de la entrada del virus, el trímero-PIE12, con una potencia inhibitoria significativamente incrementada [94].

También se ha demostrado que un péptido aislado de hemofiltrados humanos, denominado VIRIP [95], interacciona con el péptido de fusión del gp41, que como se ha descrito previamente, es una región altamente conservada del extremo amino-terminal de la glicoproteína gp41 [95]. El VIRIP es un péptido de 20 aminoácidos, derivado de la  $\alpha$ -1 antitripsina, que inhibe la replicación del HIV-1 a concentraciones inferiores a las del T-20, lo que lo convierte en un agente terapéutico muy atractivo. La modificación de la secuencia peptídica mediante la formación de un puente disulfuro intermolecular aumenta considerablemente la actividad anti-HIV-1 del péptido [96]. Este péptido derivado del VIRIP, llamado Vir-567, ha entrado en la fase clínica I/II. Con el propósito de confirmar la especificidad y el mecanismo de acción del VIRIP, se han seleccionado *in vitro* y caracterizado virus resistentes al análogo VIR-353 [97, 98]. Estos estudios han permitido identificar cuáles eran las mutaciones responsables de la reducción de la susceptibilidad al VIR-353 y al VIRIP, y ningunas de estas mutaciones se encontraba en la secuencia del

péptido de fusión del gp41, sugiriendo que el péptido de fusión no es la diana directa del VIRIP [97, 99].

Otros péptidos, que no se basan en la secuencia de aminoácidos de la glicoproteína gp41, derivan de proteínas del virus GBV-C y se han descrito como posibles inhibidores de la infección por el HIV-1. Se ha demostrado que la proteína E2 y la fosfoproteína NS5A del GBV-C inhiben la replicación *in vitro* del HIV-1 [100], y podrían intervenir en la entrada del virus a la célula. Concretamente, la proteína E2 del GBV-C inhibe la entrada del pseudovirus HIV [64, 69].

Estudios de diferentes grupos de investigación han demostrado que varios dominios de la proteína E2 interfieren con la entrada del virus en las células mediante diferentes mecanismos. En nuestro grupo, la Unidad de Síntesis y Aplicaciones Biomédica de Péptidos (USIBAP) del IQAC-CSIC en Barcelona, se ha demostrado que existen varios dominios peptídicos de la E2 que interaccionan con el péptido de fusión del HIV-1 [69, 101]. Por otro lado, Eissmann y cols, han demostrado que ciertas secuencias derivadas del extremo amino-terminal de la glicoproteína E2 se unen a la región del loop de la gp41 [102]. Además, el grupo de investigación del Prof. Stapleton, recientemente ha identificado una región de la proteína E2 del GVB-C la cual estaría implicada en la inhibición del HIV-1 [68, 103]. Concretamente, este grupo ha demostrado que esta región, el péptido E2(276-292), no inhibe la replicación del HIV-1 a no ser que esté fusionada con el dominio de trasducción de la proteína TAT. Otros estudios biofísicos anteriores realizados en nuestro grupo USIBAP demostraron que la región E2(279-298), que incluye la región que inhibe el HIV-1, está implicada en la fusión del GBV-C a membranas [104-106]. Por lo tanto, parece ser que esta región afecta la fusión celular del HIV-1 a través de mecanismos de fusión de membranas compartidos entre los dos virus [68]. Estos estudios confirman la hipótesis de que la proteína E2 del GBV-C interfiere con la entrada del HIV-1, pero faltan todavía muchos

estudios para caracterizar el mecanismo mediante el cual los péptidos E2 del GBV-C inhiben la entrada del virus del HIV-1.

En nuestro grupo, además de trabajar con los dominios peptídicos de la proteína E2, se realizaron ensayos biofísicos para analizar el papel de varias secuencias peptídicas correspondientes a la proteína de envoltura E1 del virus GBV-C como potenciales inhibidores del péptido de fusión del HIV-1. Se ha podido demostrar que algunos péptidos interactúan con el péptido de fusión inhibiendo su actividad [70, 107-109], demostrando así su utilidad como punto de partida para el diseño de nuevos péptidos inhibidores de la entrada del HIV-1.

## **6 Interacción virus-célula**

El primer paso para que se produzca una infección de un virus a una célula consiste en la unión de las proteínas estructurales del virus con los receptores de membrana específicos de la célula, que pueden ser proteínas, lípidos o carbohidratos. Una vez que se ha producido esta unión, la entrada del virus a la célula puede realizarse mediante endocitosis o bien, por fusión de la envoltura viral con la membrana celular [110]. Si se produce la entrada por el segundo mecanismo, la fusión se produce debido a unas glicoproteínas específicas del virus. Al unirse a la membrana celular se produce un cambio conformacional, convirtiendo la proteína en fusogénica. La región de la proteína que directamente interactúa con la membrana se ha denominado “péptido de fusión” y es esta región la que desencadena el proceso de entrada en la célula [111]. Los péptidos de fusión de los diferentes virus, aunque son distintos, comparten características comunes [112]. Además de los péptidos de fusión, existen otras regiones en las glicoproteínas que también intervienen en el proceso de fusión [113-115].

## 6.1 Péptido de fusión

Los péptidos de fusión suelen estar formados por una secuencia de unos 20 aminoácidos. Contienen aminoácidos de pequeño tamaño como la alanina y la glicina en elevada proporción, lo que les confiere una mayor plasticidad y una mayor interacción con las membranas biológicas, y una proporción de aminoácidos hidrofóbicos elevada [116, 117]. Los péptidos de fusión se unen a la membrana celular y deshidratan la bicapa externa, consiguiendo reducir la barrera energética al formar un intermediario lipídico más curvado (stalk) y, así finalmente conseguir la fusión de las dos membranas. Se han definido dos tipos de péptidos de fusión, que se encuentran en dos regiones distintas dentro de la glicoproteína de fusión:

- Clase I o péptidos de fusión amino terminales: las glicoproteínas de envoltura del virus se sintetizan como precursores inactivos que, una vez escindidos por proteasas de la célula huésped, son activos. La nueva región N-terminal que se forma contiene el péptido de fusión. Las proteínas de la envoltura que contienen los péptidos de fusión amino terminales, generalmente presentan estructuras de tipo  $\alpha$ -hélice. Se ha descrito que la forma activa de los péptidos de fusión es un “trímero de horquillas” [118] el cual se coloca perpendicularmente a la membrana celular. La proteína de fusión más estudiada dentro de este grupo es la hemaglutinina del virus de la gripe [119]. Dentro de este grupo también encontramos virus de los géneros retrovirus [34, 120], paramixovirus [121] y filovirus [120].

- Clase II o péptidos de fusión internos (PFI): las proteínas de fusión de clase II, se encuentran normalmente en una región interna de la proteína. En general, las proteínas de fusión de la clase II no presentan una estructura de alfa-hélice teniendo, normalmente, una conformación de tipo lámina beta [122]. Los PFI suelen presentar, en medio de la secuencia, un residuo de prolina cuya función es importante para que se produzca la fusión [123]. Dentro de este grupo, encontramos varios géneros como el rhabdovirus [124], el flavivirus [125] y el alfavirus [126].

Los mecanismos de fusión de los dos tipos de proteínas (I y II) son similares a pesar de encontrarse en zonas distintas, ya que en ambos casos la forma activa de la proteína es un trímero dispuesto perpendicularmente a la membrana lipídica [112].

Debido a la gran importancia de los péptidos de fusión en la penetración celular, se han realizado muchos estudios con péptidos sintéticos, que corresponden al segmento de fusión del virus. Estos estudios con péptidos sintéticos se realizan con membranas celulares [127] o bien con modelos de membrana como son los liposomas [128].

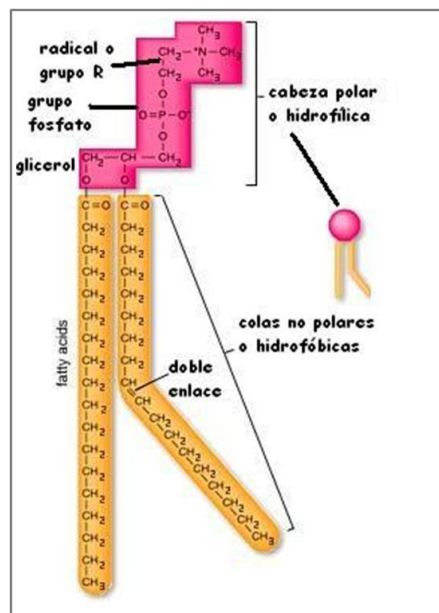
## **7 Modelos de membrana**

Gran parte de los procesos fundamentales de los organismos vivos que ocurren a nivel celular tienen lugar a través de la membrana, como por ejemplo el proceso de infección viral, la neurotransmisión, la fertilización o el tráfico de proteínas intracelulares.

Las membranas biológicas están compuestas por proteínas y lípidos unidos por interacciones no covalentes, y por carbohidratos, aunque éstos siempre están presentes en forma de glicolípidos o glicoproteínas. La composición, presencia y proporción de cada uno de estos elementos varía según el tipo de membrana. Sin embargo, presentan una unidad estructural básica que es la bicapa lipídica [129].

Una aproximación para entender procesos biológicos que ocurren a nivel de la membrana, como la interacción virus-célula, consiste en la utilización de modelos de membrana. A pesar de que los modelos de membrana no son siempre representativos de los acontecimientos que ocurren en la realidad biológica, se han utilizado extensamente como modelo para obtener información del mecanismo de infección y proliferación de los virus (HIV-1, virus Ébola), de la actividad de péptidos antimicrobianos, de los péptidos capaces de generar respuesta inmune (vacunas sintéticas), y de la actividad de péptidos como neurotransmisores.

Los modelos de membrana utilizan principalmente fosfolípidos, ya que son los lípidos más abundantes en las membranas y presentan capacidad para formar bicapas espontáneamente cuando son dispersados en agua. Este comportamiento se debe a su estructura anfifílica, ya que su molécula consiste en una cabeza polar con un grupo fosfato y una región no polar hidrocarbonada (Figura 5). En contacto con el agua se produce el efecto hidrofóbico, generándose agregados de lípidos con las cabezas polares en contacto con el agua y las colas hidrocarbonadas en el interior.



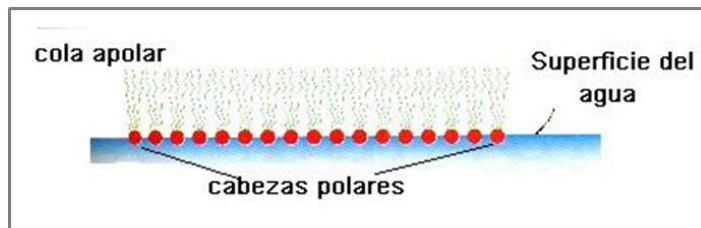
**Figura 5:** Estructura de un fosfolípido. Fuente <http://www.anatomiahumana.ucv.cl>.

Los fosfolípidos se clasifican en dos grupos, los glicerolípidos y los esfingolípidos. Los más abundantes en las membranas biológicas son los glicerolípidos cuya molécula se basa en el grupo glicerol. Dependiendo de los ácidos grasos que se esterifiquen obtendremos los diferentes derivados del ácido sn-glicero-3-fosfatídico [130]. El fosfolípido más utilizado en los estudios de interacciones de membranas es la fosfatidilcolina (*phosphatidylcholine*, PC), que tiene carácter zwitteriónico y se encuentra presente en elevada proporción en las

membranas biológicas. Otros fosfolípidos ampliamente estudiados con carga negativa son el fosfatidilglicerol (PG) y la fosfatidilserina (PS), que también se encuentran presentes en la cara interna de las membranas celulares, estando la PS presente en mayor porcentaje.

## 7.1 Capas lipídicas monomoleculares

Los modelos de membrana más sencillos para estudiar las interacciones específicas que se producen entre lípidos y péptidos y/u otras moléculas biológicamente activas, son seguramente las películas monomoleculares de fosfolípidos extendidas en la interfase aire/agua. El espesor de las monocapas corresponde al de una molécula, y representaría la mitad de la membrana celular [131-133] (Figura 6).



**Figura 6:** Modelo de una monocapa fosfolípica extendida en la interfase aire/agua. Fuente: <http://www.uib.es>

La principal ventaja de este modelo frente a otros sistemas más complejos, como son las bicapas lipídicas, radica en la posibilidad de controlar de forma sencilla la ordenación de las moléculas, cambiando el área molecular y la presión superficial de la monocapa. Los datos obtenidos a partir de la variación de estos parámetros ofrecen una información básica sobre las interacciones lípido-lípido, lípido-subfase o lípido-molécula activa, e incluso sobre la conformación de las moléculas estudiadas [131].

Además, los experimentos de penetración en monocapas permiten determinar las interacciones existentes entre monocapas lipídicas y péptidos y/o proteínas, proporcionando

informaciones extrapolables a las bicapas lipídicas, como son los liposomas y las membranas celulares [134].

### **7.1.1 Monocapas de adsorción**

Este tipo de monocapas se observan en moléculas anfifílicas, que debido a su relativa polaridad, cuando se depositan en una subfase acuosa, se introducen sólo parcialmente en el agua quedando con la parte apolar hacia el aire, es decir, quedan adsorbidas en la interfase aire/agua.

Esto da lugar a una disminución en la tensión superficial que proporciona la medida de la actividad superficial de la sustancia. Las moléculas que se encuentran en la interfase van estableciendo un equilibrio dinámico con las moléculas que se encuentran en la subfase y se intercambian continuamente entre ellas. En condiciones de equilibrio hay una relación entre la cantidad de soluto adsorbido en la interfase y la variación de la tensión superficial producida en el disolvente. Según Langmuir [135], las moléculas adsorbidas en la interfase aire/agua se comportan de alguna manera como las moléculas de los gases perfectos pudiendo adquirir, al ser comprimidas, un cierto grado de ordenación.

### **7.1.2 Monocapas de extensión**

Este tipo de monocapas está formado por sustancias no volátiles e insolubles en agua, denominándose “extensión” al proceso de formación de las mismas.

Algunas sustancias puras, ya sean en estado sólido o líquido, pueden extenderse espontáneamente a temperatura ambiente sobre la superficie del agua, pero la mayoría de las sustancias necesitan disolventes volátiles para extenderse (cloroformo, etanol, etc.). Interesa que el disolvente facilite la extensión de la sustancia y que desaparezca por evaporación.

Para poderse extender tienen que tener grupos polares y hidrófobos. Los grupos polares son los responsables de la extensión y permanecen en contacto con el agua, mientras que los



grupos apolares actúan impidiendo la difusión de las moléculas en la superficie de la misma. No obstante, si las cadenas hidrofóbicas son excesivamente largas, la adhesión entre ellas impide la extensión.

La disposición de una monocapa lipídica es similar a la de las membranas fosfolípicas, por lo que se utilizan como modelos de membrana. En particular, las monocapas mixtas, constituidas por dos o más componentes, representan un modelo muy válido para el estudio de las interacciones moleculares en un sistema bidimensional orientado, debido a su gran analogía con las membranas biológicas.

### **7.1.3 Presión superficial**

Las monocapas tienden de manera espontánea a ocupar la mayor superficie posible, razón por la cual ejercen una fuerza determinada sobre cualquier obstáculo que se oponga a su expansión. En principio, a esta fuerza se le asignó un valor similar al que ocasiona la presión gaseosa, considerándose como el resultado de la agitación térmica de las moléculas que forman la monocapa. Al chocar con una barrera que se opone a su expansión, estas moléculas ejercen una determinada presión sobre la misma. De aquí se deriva el concepto de presión superficial, que se puede interpretar como la fuerza por unidad de longitud que ejercen las moléculas de la monocapa contra las paredes del recipiente que contiene la solución, similar a las moléculas de un gas, puesto que se mueven a lo largo y ancho de la interfase con un movimiento de tipo browniano como si flotaran sobre el líquido [136].

La presión superficial es un parámetro relacionado en gran medida con la tensión superficial, en particular se puede considerar como la variación de la tensión superficial que se produce en el líquido soporte al extender una capa monomolecular sobre el mismo:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma_m$$

(1)

Siendo  $\gamma_0$  la tensión superficial del líquido soporte y  $\gamma_m$  la tensión superficial cuando se extiende una monocapa sobre el mismo.

#### **7.1.4 Estados de las capas monomoleculares**

Una capa monomolecular, en la interfase líquido/gas, puede presentar varios estados de condensación, análogos a los estados de la materia: sólido, líquido y gaseoso. Estos estados presentan diferentes grados de libertad u ordenación molecular, dependientes de las fuerzas que actúan en la propia película, entre ésta y la subfase. Al comprimir una monocapa se van mostrando las diferentes fases de ordenación: primero aparece la fase gaseosa, donde las moléculas están suficientemente alejadas como para que las fuerzas de adhesión (fuerzas de Van der Waals) que actúan entre ellas se puedan considerar despreciables. Aun así, las interacciones entre los grupos polares de las moléculas de la subfase y los de las que forman la monocapa, son suficientemente importantes para que estas últimas no se pierdan fácilmente dentro de la fase gaseosa (aire), además al presentar una solubilidad en la subfase prácticamente nula, hace que las moléculas anfifílicas de las monocapas no pasen a formar parte de esta.

Al comprimir más las monocapas, las moléculas pasan a una fase de líquido, donde aumentan las fuerzas de Van der Waals, hecho que cohesiona las moléculas formando dominios, en los cuales los movimientos térmicos se encuentran restringidos. Las monocapas líquidas se pueden encontrar en dos tipos de estados líquidos.

La fase líquida expandida (LE) es el primer estado en que se disponen las moléculas después de someter la monocapa en fase gaseosa a una ligera presión lateral. Este estado se caracteriza por la gran elasticidad que presentan las monocapas.

Si continuamos disminuyendo el área por molécula (o la distancia entre estas), se observa una nueva transición hacia una nueva fase que se denomina líquido condensado (LC), o también sólido expandido. Las moléculas se encuentran alineadas y fuertemente

empaquetadas de manera que las fuerzas de atracción entre ellas son considerables; paralelamente también aparecen fuertes interacciones entre los grupos hidrófobos de las moléculas.

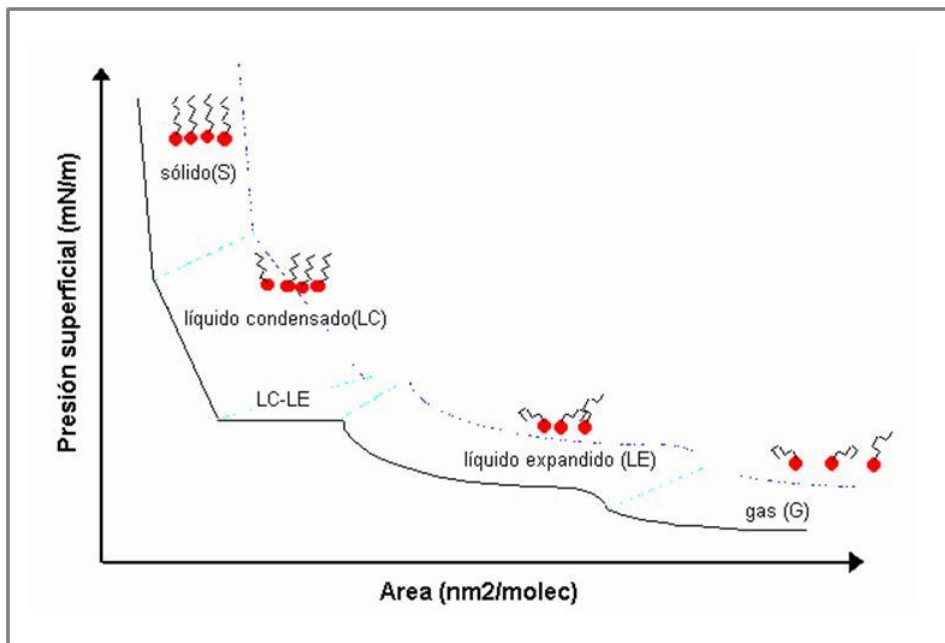
Finalmente se llega al estado sólido, que representa el estado máximo de compresión de las moléculas en una monocapa. Estas no se pueden mover libremente y, por lo tanto, podemos considerar que se asemejan a un sólido en dos dimensiones. El área molecular casi no varía al aumentar la presión. Aun así, es habitual que muchas moléculas no presenten fuerzas de adhesión tan grandes como para llegar al estado sólido, hecho que determina que el resultado de la máxima compresión de monocapas formadas por estas moléculas sea el de sólido expandido [135].

La estabilidad de una capa monomolecular viene condicionada por la presión de colapso [137] y por la disolución de las moléculas que la constituyen.

A medida que se comprime, se llega a un momento en el cual se produce una expulsión de moléculas de la misma. Se define la presión de colapso como la mayor presión a la que se puede comprimir una monocapa sin que se produzca una expulsión manifiesta de las moléculas que la componen. El colapso de la monocapa se produce cuando se alcanzan valores de área por molécula muy pequeños, menores al área física mínima real que ocupa la molécula. Durante el colapso, las capas monomoleculares se colocan unas encima de otras, lo que provoca la formación de multicapas desordenadas.

A partir de los cambios en la presión superficial que se producen durante la compresión, se pueden estudiar las características fisicoquímicas de una monocapa extendida en la superficie del agua. De hecho, para una temperatura constante, si representamos el cambio de la presión superficial ( $\text{mN m}^{-1}$ ) respecto al área molecular ( $\text{nm}^2 \text{molécula}^{-1}$ ), obtendremos la isoterma  $\pi$ -A. En la Figura 7 se muestra una isoterma de compresión con los diferentes estados de ordenación posibles. La forma de la isoterma es una característica de las

moléculas que forman la monocapa, hecho que nos proporciona una valiosa información sobre la organización y las interacciones entre éstas.



**Figura 7:** Isoterma de compresión donde se muestran todos los estados que se pueden presentar en una monocapa: estado gaseoso, estado de líquido expandido, estado de líquido condensado y estado sólido. Fuente: <http://diposit.ub.edu>

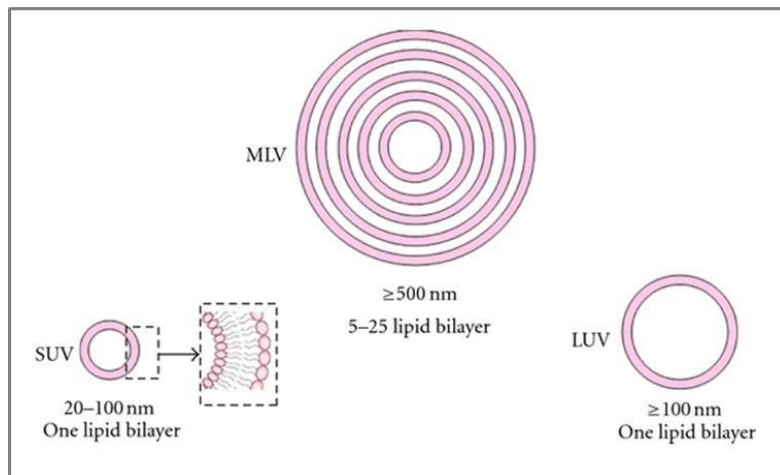
Esta clasificación es general, no todas las isotermas muestran todas las fases indicadas, ya que la forma de la isoterma, las fases que se observan y la estabilidad de la monocapa dependen de las condiciones experimentales, tales como la temperatura, tipo de subfase, velocidad de compresión, entre otros [136, 138-140].

## 7.2 Liposomas

Los liposomas son los modelos de membrana, basados en fosfolípidos, más utilizados ya que la estructura en forma de bicapa lipídica es idéntica a la porción lipídica de las membranas celulares.

Los liposomas son microesferas huecas, cuya membrana está compuesta por una o varias bicapas lipídicas. Fueron descritos por primera vez por Bengham y Horne [129] al observar por microscopia electrónica que una suspensión de fosfolípidos de origen celular, aislados y purificados, al ser dispersados en agua, formaban vesículas con las cadenas hidrocarbonadas organizadas de manera que se encontraban protegidas del agua. Las bicapas se unen de manera que dejan en su interior el contenido acuoso. Dependiendo del número de bicapas y del tamaño de los liposomas se pueden clasificar de la siguiente manera (Figura 8):

- ✓ **Liposomas multilamelares** (*multilamellar vesicles*, MLV): están formados por varias lamelas concéntricas (entre 5 y 20), si tienen menos de cinco se denominan liposomas oligolamelares. Son de tamaño muy variable, entre 100 y 1000 nm. La obtención es muy rápida y permite estudiar las interacciones entre los fosfolípidos y los péptidos en estudio con técnicas como la calorimetría diferencial de barrido (DSC), la espectroscopia visible o de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR).
- ✓ **Liposomas unilamelares grandes** (*large unilamellar vesicles*, LUV): están formadas por una bicapa lipídica. Su tamaño oscila entre 100 y 500 nm. Se ha visto que en estas vesículas la superficie de ambos lados de la bicapa se aproxima a una geometría plana, facilitando un reparto homogéneo de los lípidos de cada monocapa (51% en la externa y 49% en la interna). Estos liposomas se caracterizan por tener una tensión superficial muy similar a la de las membranas celulares ( $30\text{-}32\text{ mN m}^{-1}$ ), por eso son los modelos de membrana más estudiados para intentar comprender las propiedades físicas, químicas y mecánicas de las membranas biológicas.
- ✓ **Liposomas unilamelares pequeños** (*small unilamellar vesicles*, SUV): tal como su nombre indica son liposomas de tamaño pequeño, entre 20-100 nm. Estos liposomas tienen una mayor curvatura que los LUVs, lo que les confiere una menor estabilidad. Se obtienen por sonicación o extrusión a partir de liposomas MLVs, originados por procesos de dispersión mecánica del lípido.



**Figura 8:** Esquema de liposomas multilamelares (MLV), unilamelares grandes (LUV) y unilamelares pequeños (SUV). Fuente: <http://www.hindawi.com>.

La capacidad de los liposomas para reproducir la organización y las funciones principales de las membranas biológicas los han convertido en un modelo muy útil para el estudio de los mecanismos moleculares que tienen lugar *in vivo* y en el que intervienen dichas membranas [141-143].



# **OBJETIVOS**





El objetivo general de este trabajo es diseñar y sintetizar dominios peptídicos derivados de las proteínas de envoltura E1 y E2 del GBV-C y analizar su posible aplicación como agentes terapéuticos contra el virus del HIV-1.

Los objetivos concretos que se persiguen son los siguientes:

1. Profundizar en el estudio de la interacción del péptido de fusión del HIV-1 con secuencias peptídicas, derivadas de la proteína E2 del GBV-C, previamente seleccionadas como inhibidores de la actividad del péptido de fusión: E2(175-192), E2(289-306) y E2(313-330).
2. Diseñar y sintetizar derivados peptídicos de la región (22-39) de la proteína E1 del GBV-C con el objetivo de mejorar su actividad anti-HIV-1.
  - 2.1. Analizar la importancia de la estructura primaria y de la carga neta de la secuencia nativa en la actividad anti-HIV-1.
  - 2.2. Evaluar la actividad anti-HIV-1 de nuevas formas de presentación peptídicas: lipopéptidos y péptido cíclico.