

Capacidad funcional de péptidos sintéticos que imitan secuencias antigénicas del loop V3 de la gp120 de HIV-1 *

Lottersberger, Javier^{1,2}; Salvetti, Jorge Luis¹; Tonarelli, Georgina¹

¹ Departamento de Química Orgánica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, CC 530 - CP 3000 - Santa Fe - Argentina. Fax: 042-571153. e-mail: tonarelli@fbcb.unl.edu.ar

² Laboratorio GEN CELL SRL, San Jerónimo 3927, CP 3000- Santa Fe, Tel/fax: 042-555321

Palabras claves: HIV, GP120, LOOP V3, ELISA, PÉPTIDOS SINTÉTICOS.

RESUMEN: Dentro de la tercera región hipervariable (loop V3) de la glicoproteína de superficie gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), se encuentra localizado el principal dominio neutralizante del virus (PDN).

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en un ensayo ELISA con péptidos lineales y cíclicos que representan: - la secuencia completa del loop V3; -secuencias parciales nativas y modificadas conteniendo todas ellas el tetrapéptido altamente conservado GPGR.

Los péptidos fueron sintetizados en fase sólida utilizando la química del 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc).

El péptido que representa la secuencia completa del loop V3, mostró la mayor inmunoreactividad (sensibilidad 97,4%; especificidad 96,43%), solamente en su forma cíclica, sugiriendo que su funcionalidad depende significativamente de la conformación, al no observarse reactividad en su forma lineal. Los resultados obtenidos con este antígeno frente a los diferentes paneles estudiados, señalan su relevancia para el diagnóstico de la infección por HIV.

SUMMARY: Within the third hypervariable region (loop V3) of the surface glycoprotein gp120 of the Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1), the principal neutralizing domain (PND) of the virus is located.

In this work we report the results obtained using an ELISA Test with linear and cyclic peptides that represent: -the complete sequence of the loop V3; -modified, native and partial sequences all of them containing the highly preserved tetrapeptide GPGR.

The peptides were synthesized in solid phase using the chemistry of the 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc).

The cyclic peptide that represents the complete sequence of the loop V3, showed the greatest immunoreactivity (sensitivity 97.4%; specificity 96.43%), suggesting that its functionality depends significantly on the conformation, since no reactivity was observed in the linear form.

The results obtained with the different panels studied using this antigen, indicate its relevancy for the diagnosis of HIV infection.

Introducción

Las nuevas tecnologías sobre diseño de sistemas de diagnóstico inmunológico de enfermedades infecciosas se orientan hacia el desarrollo de métodos cada vez más sensibles y específicos, altamente reproducibles y de bajo costo.

Las técnicas inmunoenzimáticas (EIA), son en este momento muy utilizadas en los ensayos de screening de infecciones (1). Los métodos de última generación utilizan antígenos obtenidos por me-

dio de tecnología recombinante o por síntesis química, para la detección de anticuerpos (1-7).

La capacidad de los péptidos sintéticos para imitar sitios de reconocimiento específico de proteínas antigénicas depende de factores secuenciales y conformacionales. En general, el número de residuos aminoácidos involucrados en la unión específica es reducido (no más de 7 aminoácidos); no obstante trabajando con péptidos cortos en muchos casos no se logra observar inmunoreactividad. Aumentando la longitud de la secuencia o bien incorporando elementos estructurales que limiten la flexibilidad de la cadena peptídica, se logra generalmente aumentar la sensibilidad del ensayo (6,8).

Los antígenos obtenidos por síntesis química consisten en secuencias cortas, entre 10 y 30 residuos. Son particularmente útiles para imitar epítopos de tipo continuo de una proteína antigénica, y

* Resultados parciales de este trabajo fueron presentados en la XXXI Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, 15-18 de noviembre de 1995. Villa Giardino, Córdoba.

en este caso las reacciones son muy sensibles y específicas. Las técnicas de ADN recombinante permiten diseñar epítopos discontinuos o conformacionales (8).

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) presenta en su envoltura una proteína glicosilada codificada por el gen *env*: la gp160, que está constituida por dos subunidades: la glicoproteína de membrana gp120 y de transmembrana gp41. La gp120, es la proteína utilizada por el virus para unirse al receptor de la célula huésped.

En respuesta a la infección por el VIH, entre los 30 y 180 días posteriores a la misma comienzan a detectarse anticuerpos dirigidos contra las distintas proteínas virales, empleando técnicas inmunológicas clásicas (2,3).

Los primeros anticuerpos que aparecen, están dirigidos contra las proteínas de la nucleocápside (p24 y p17 principalmente), y posteriormente aparecen anticuerpos contra las proteínas de la envoltura. Estos últimos permanecen detectables con títulos importantes durante toda la evolución de la enfermedad y sólo se negativizan en la fase terminal de la misma, por lo cual son los marcadores de elección para un infectado crónico (2,3).

Dentro de la tercera región hipervariable de la gp120, se encuentra un determinante antigénico (PND: principal neutralizing determinant) con capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes. Esta región, conocida como loop V3, presenta un puente disulfuro entre los residuos de cisteína (Cys303 y Cys338).

El PND contiene 24 aminoácidos y se extiende entre los residuos 308 - 331. La secuencia es: NNTRKSIRIQRGPGRAFVTIGKIG (virus VIH-1_{IIIIB}) (9-11).

Regiones hipervariables flanquean una estructura β turn ubicada en la parte superior del loop, la cual contiene la secuencia altamente conservada GPGR (12). La importancia de las estructuras tipo turns como sitios de reconocimiento en proteínas, y la localización de epítopos continuos dentro de ellas, ha sido reportada por varios autores (13).

Los avances para el desarrollo de una vacuna han estado limitados por la variabilidad encontrada en las secuencias de aminoácidos de diferentes aislados del HIV1. Recientes trabajos han demostrado que tanto el extremo N-terminal como la región central del loop V3 son altamente inmunogénicos (14).

El loop V3 es importante para el diagnóstico de la infección ya que los anticuerpos dirigidos contra la región conservada muchas veces pueden

ser detectados antes que los correspondientes a gp41. Por otra parte, estos anticuerpos son marcadores para el seguimiento de la evolución de la infección, ya que una disminución en su título es un signo de mal pronóstico (15).

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en un ensayo ELISA con péptidos lineales y cíclicos que representan: - la secuencia completa del loop V3; -secuencias parciales nativas y modificadas conteniendo todas ellas el tetrapéptido altamente conservado GPGR. Conjuntamente con el estudio sobre reconocimiento de epítopos continuos se analiza la posible contribución de la conformación al reconocimiento molecular.

Materiales y métodos

Síntesis de péptidos

Los péptidos fueron sintetizados manualmente empleando la química del 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) en fase sólida, utilizando la resina Rink (4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil) fenoxiresina), para preparación de péptidos tipo amida.

Se emplearon los siguientes derivados para los aminoácidos trifuncionales: Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Tyr(tBut)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBut)-OH, Fmoc-Thr(tBut)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH. La resina y los aminoácidos protegidos fueron adquiridos a Calbiochem-Novabiochem Corp (California, USA).

Los acoplamientos fueron realizados con el hexafluorofosfato de benzotriazolil-1-oxi-tris-pirrolidino fosfonio (PyBOP) en presencia de N-metilmorfolina (NMM) como catalizador. El grupo Fmoc fue eliminado en las etapas de desprotección empleando piperidina al 20% en dimetilformamida (DMF) (v/v).

El monitoreo de la síntesis se realizó utilizando el Método de Kaiser y la medición espectrofotométrica del aducto Fmoc-piperidina formado durante la desprotección.

Los péptidos fueron separados de la resina y simultáneamente desprotegidos en una única etapa con la mezcla H₂O / ácido trifluoroacético (TFA) / Etanodiol (5:90:5), precipitados con éter etílico, centrifugados y liofilizados (16,17).

La ciclización por formación de puentes disulfuros se realizó mediante oxidación con solución de I₂. La reacción fue controlada titulando los grupos

tioles libres con el reactivo de Ellman. Los productos de naturaleza polimérica formados durante la oxidación fueron separados por cromatografía líquida en fase reversa (C18) y de exclusión molecular empleando Sephadex G-25.

Purificación y caracterización de los productos de síntesis

La purificación del crudo de síntesis se realizó empleando sistemas para extracción en fase sólida, con columnas de fase reversa (C18), marca Waters.

El análisis de pureza se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) Analítica empleando una columna de C18 de 0,4 x 25 cm marca Beckman, trabajando a una velocidad de flujo de 0,9 ml/min con gradiente de elución. Solvente A: 0,1% TFA en agua; Solvente B: 0,1% TFA en acetonitrilo. La detección se realizó a 220 y 280 nm.

Enzimoimmunoensayos

Se emplearon policubetas de poliestireno (Costar) que fueron sensibilizadas por adsorción del antígeno sobre la fase sólida. Se utilizaron 100 µl/pocillo de una solución conteniendo 10 µg de péptido disuelto en buffer carbonato/bicarbonato 0,1M pH 9,5. Las placas se incubaron 2h a 37°C y luego se mantuvieron toda la noche a 4°C. Luego se lavaron 4 veces con PBS pH 7,4-Tween 20 0,05 % y dos veces con agua destilada.

Las muestras utilizadas se diluyeron al 3% en Buffer proteico (PBS con 0,5% de BSA) y se incubaron 100 µl de esa solución por 30 min. a 37°C. Luego se lavaron 6 veces con buffer de lavado (PBS con 0,05% Tween 20, pH 7,4).

Como conjugado se utilizó Anti-IgG humana-peroxidasa (Sigma), diluido 1:1000 con PBS pH 7,4 y se incubaron 100 µl por 30 min. a 37°C. Luego se lavó 6 veces con buffer correspondiente.

El revelado de la reacción se realizó con 100 µl de TMB (tetrametilbenzidina 10mg y 1 ml de dimetilsulfóxido, en 100 ml de buffer ácido cítrico/acetato 0,1M pH 6 y 20 µl de H₂O₂ 30 Vol) incubando 30 min. a 37°C. La reacción se detuvo con 100 µl de H₂SO₄ N y se leyó a 450 nm en lector para microplacas de ELISA. (18).

Los sueros fueron previamente evaluados por técnicas comerciales para el diagnóstico de anticuerpos específicos anti-HIV (técnica ELISA: marcas Abbott y Organon) y confirmados luego por

Western Blot (WB). Las muestras fueron conservadas a -20°C.

Tratamiento estadístico de los datos obtenidos en los inmunoensayos (18)

Cálculo del título de corte (cut off)

$$\text{Título de Corte} = X \text{ medio (sueros negativos)} + 2 \cdot S$$

Donde:

Título de corte: expresado en unidades de densidad óptica (DO).

X medio = Valor medio de las lecturas espectrofotométricas de los sueros negativos en DO.

S = Coeficiente de Desviación Estándar.

Cálculo de la sensibilidad

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de sueros reactivos}}{\text{N}^\circ \text{ total de sueros positivos}} \times 100$$

Donde:

Nº de sueros reactivos: sueros reactivos en el ELISA utilizando como antígeno cada péptido sintetizado.

Nº total de sueros positivos: Sueros positivos en el WB.

Cálculo de la especificidad

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de sueros no reactivos}}{\text{N}^\circ \text{ total de sueros negativos}} \times 100$$

Donde:

Nº de sueros no reactivos: sueros no reactivos en el ELISA utilizando como atígeno cada péptido sintetizado.

Nº total de sueros negativos: sueros negativos en el WB.

Cálculo del coeficiente de variación (CV):

$$CV = \frac{S}{X} \times 100$$

Donde:

S: Coeficiente de desviación estándar

X: media de los sueros negativos.

Resultados y discusión

Se sintetizaron tres péptidos correspondientes a secuencias del loop V3 de la glicoproteína de membrana gp120 del HIV1 IIIB: gp120-1, -2 y -3, todos ellos conteniendo la secuencia GPGR altamente conservada. (19-25).

Mientras que el péptido gp120-1 representa la secuencia completa del loop V3, los otros dos contienen secuencias parciales del principal determinante neutralizante localizado dentro del mismo.

Sobre el extremo N-terminal de la secuencia gp120-2 se incorporaron aminoácidos no presentes en la estructura nativa, con la finalidad de posibilitar

la formación de puentes disulfuro y mejorar la inmovilización de los antígenos sobre la superficie sólida. Los péptidos 120-1 y 120-2 fueron utilizados en los inmunoensayos en forma lineal y cíclica.

En la Tabla n°1 se presentan las secuencias sintetizadas, y la región de la proteína nativa en que están ubicados; en letras pequeñas se indican los residuos no pertenecientes a la secuencia nativa que fueron incorporados en gp120-2. En la Tabla n°2 se detallan las características fisicoquímicas de los péptidos sintetizados.

El grado de pureza, determinado por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) Analítica fue superior al 90%, para todas las muestras.

Tabla N°1. Secuencias sintetizadas

Péptido	región	Secuencia
120-1 ⁽¹⁾	303-338	CTRPNNNTRKSIRIQRGPGRAVFIGKIGNMRQAHC
120-2 ⁽¹⁾	308-327	AAAC NNTRKSIRIQRGPGRC AFVTI
120-3	308-323	NNTRKSIRIQRGPGRA

(1): péptido lineal y cíclico

Tabla N°2. Características de los péptidos sintetizados

Péptido	Tipo	Residuos	PM(g/mol)	carga	Hidrofilicidad ⁽¹⁾	Pureza ⁽²⁾
120-1	amida	36	4054,1	+9	8,3	91,5%
120-2	amida	25	2704,9	+6	1,7	95,2%
120-3	amida	16	1824,5	+6	11,4	93%

(1) según Hoop y Woods

(2) determinado por HPLC analítico

Evaluación Inmunoquímica

Los péptidos sintetizados fueron evaluados en una primera etapa frente a pools de sueros positivos y negativos. Los péptidos gp120-1 cíclico, 120-2 lineal y cíclico mostraron capacidad para diferenciar entre estos pools, mientras que con 120-1 lineal y 120-3 no se observó reactividad. Posteriores ensayos de estos péptidos con un panel de 6 sueros fuertemente positivos en el Western Blot y 6 sueros

negativos, permitió observar un comportamiento similar.

Sobre la base de estos ensayos preliminares, los péptidos inmunorreactivos fueron evaluados frente a un panel de 22 sueros positivos en el Western Blot para anticuerpos anti-gp120 y 22 sueros negativos, siguiendo el protocolo descrito en la sección materiales y métodos. Los resultados se muestran en la Tabla n°3.

Tabla N°3. Resultados de los ensayos inmunoquímicos con un panel de 44 sueros, empleando como antígenos los péptidos 120-1 y 120-2

	120-1 cíclico	120-2 lineal	120-2 cíclico
Sueros Western Blot positivos	22	22	22
Sueros reactivos*	22	17	15
Sueros Western Blot negativos	22	22	22
Sueros no reactivos	21	21	20
X medio no reactivos	0,221	0,238	0,256
S no reactivos	0,038	0,121	0,107
CV no reactivos	17,2%	50,8%	41,8%
Título de corte	0,297	0,480	0,470
X medio sueros reactivos	0,727	0,635	0,550
S sueros reactivos	0,305	0,234	0,156
Dif. Reactivos-no reactivos	0,506	0,397	0,294
Especificidad	95,5%	95,5%	90,9%
Sensibilidad	100%	77,2%	68,2%

* Reactivo o no reactivo para los antígenos en estudio.

El péptido 120-1c muestra parámetros de título de corte, desviación estándar, coeficiente de variación de los sueros negativos, que determinan una alta sensibilidad (100%) y especificidad (95,5%) para el diagnóstico de anticuerpos específicos.

Trabajando con el péptido 120-2 tanto lineal como cíclico se observó una buena respuesta frente a los sueros positivos (sensibilidad: 120-2 lineal 95,5% y 120-2 cíclico 90,8%) pero una menor especificidad (68,2% y 77,2% respectivamente) en comparación a 120-1cíclico, con gran dispersión en los datos, alto título de corte y pequeña separación entre positivos y negativos, dificultándose la interpretación de los resultados. El agregado de cadenas hidrofóbicas sobre el extremo N-terminal de la secuencia logra mejorar la presentación del sitio de reconocimiento inmovilizado sobre la superficie de inmunocaptura, observándose reactividad también con el péptido lineal.

La ausencia de inmunorreactividad de gp120-3 podría interpretarse considerando que la secuencia no representa al epitope en forma completa, si se tiene en cuenta lo observado por Schreiber M., et.al (26) en relación a la unión preferencial de anticuerpos anti-V3 a péptidos lineales conteniendo

la secuencia conservada GPGRF. No obstante, estimamos que a este factor secuencial se está sumando una conformación poco eficiente del péptido inmovilizado sobre la superficie de inmunocaptura.

El péptido 120-1c posteriormente fue estudiado frente a dos paneles de sueros: uno de 93 sueros positivos y negativos (54 positivos y 39 negativos) (tabla n° 4) y otro de 23 sueros indeterminados para el WB. Estos últimos no presentaban reactividad para la banda de gp120, pero sí para gp160.

Los resultados obtenidos en los ensayos ELISA muestran para 120-1c una sensibilidad del 97,43% y especificidad del 96,43%; separación positivos-negativos 0,554 Unidades de D.O. y una distribución muy homogénea de los resultados obtenidos con los sueros negativos: X medio= 0,217; S= 0,038 y CV= 17,5%. De los 23 sueros indeterminados ensayados, 21 (91%) fueron reactivos.

La gran dispersión de los resultados obtenidos con sueros positivos es debido a que estos provienen de pacientes en distintos estadios de la infección, por lo que la cantidad de anticuerpos circulantes es variable entre cada una de las muestras (16, 27)

Tabla Nº4. Resultados de los ensayos inmunoquímicos del péptido gp120-1cíclico frente a un panel de 93 sueros.

Sueros Western Blot positivos	54
Sueros reactivos	52
Sueros Western Blot negativos	39
Sueros no reactivos	38
X medio no reactivos	0,217
S sueros no reactivos	0,038
CV sueros no reactivos	17,5%
Título de corte	0,293
Xmedio sueros reactivos	0,554
S sueros reactivos	0,308
Sensibilidad	97,43%
Especificidad	96,43%

Conclusiones

El péptido que imita al loop V3 completo en su forma cíclica (120-1) es reconocido por los anticuerpos presentes en sueros de pacientes infectados con una adecuada sensibilidad y especificidad, sugiriendo que su funcionalidad depende significativamente de la conformación, dado que no se observó inmunoreactividad en su forma lineal. Los resultados obtenidos con este antígeno frente a los diferentes paneles estudiados, señalan su relevancia para el diagnóstico de la infección.

La incorporación de los residuos AFV (residuos 324-326 de la gp120 del HIV1) sobre el extremo C-terminal de la región flanqueada por los dos residuos de cisteína en gp120-2 permitiría mejorar los resultados, ya que es probable que estos tres aminoácidos estén formando parte del mismo epítopo continuo.

Agradecimiento

Al Centro de Tecnología en Salud Pública (CTSP), Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina, que nos proveyó los sueros utilizados en este trabajo.

Bibliografía

- 1- WHO scientific Group. 1989. "The use of synthetic antigens for diagnosis of infectious diseases". World Health Organization. Whashington.
- 2- Lindhart, B. 1991. "Serological investigations of Human immunodeficiency virus infection". Original thesis published in Danish Medical Bull.
- 3- Proffitt, M. 1993. "Acquired Immunodeficiency Syndrome". Anal. Applic. Reviews. Vol 65, N°12, 369R-400R.
- 4- M.H.V. Van Regenmortel. 1993. "Synthetic peptides versus natural antigens in immunoassays". Ann. Biol. Clin. 52, 39-51.
- 5- M.H.V. Van Regenmortel. 1987. "Antigenic cross-reactivity between proteins and peptides: new insights and applications". Trends in Biochemical Sci. Vol. 12, No 6. June.
- 6- M.H.V. Van Regenmortel. 1985. "Synthetic peptides in biology and medicine". Proc. of the Labs. Res. Sym. of Synthetic Peptides in Biol. and Medicine held in Hämeenlinna, Finland, June 6-8. Elsevier Sci. Publishers. Amsterdam.
- 7- Johnson, J. 1992. "Detection of human immunodeficiency virus type1 antibody by using commercially available whole-cell viral lysate, synthetic peptide, and recombinant protein enzyme immunoassay systems". J. Clin. Microbiol. January. p. 216-218.
- 8- M.H.V. Van Regenmortel. 1988. "Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Synthetic Peptides as Antigens". Elsevier. p74-84.
- 9- Javaherian, K., Langlois, A.J., McDanal, C., Ross, K.L., Eck-

- ler, L.I., Jellis, C.L., Profy, A.T., Rusche, J.R., Bolognesi, D.P., Putney, S.D. and Matthews, T.J. 1989. Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **86**, 6768-6772
- 10-** Matsushita, S., Robert-Guroff, M., Rusche, J., Koito, A., Hattori, T., Hoshino, H., Javaheerian, K., Takatsuki, K. and Putney, S. 1988. "Characterization of a human immunodeficiency virus neutralizing monoclonal antibody and mapping of the neutralizing epitope". *J. Virol.* **62**, 2107-2114.
- 11-** Zvi, A.; Kustanovich, I.; Feigelson, D.; Levy, R.; Eisenstein, M.; Matsushita, S.; Richalet-Sécorde, P.; Regenmortel, M.H.V.; Anglister, J. 1995. MNR mapping of the antigenic determinant recognized by an anti-gp120, human immunodeficiency virus neutralizing antibody. *Eur. J. Biochem.* **229**, 178-187.
- 12-** La Rosa, G.J.; Davide, J.P.; Weinhold, K.; Waterbury, J.A.; Profy, A.T.; Lewis, J.A.; Langlois, A.J.; Dreesman, G.R.; Boswell, R.N.; Shaddock, P.; Holley, L.H.; Karplus, M.; Bolognesi, D.P.; Matthews, T.J.; Emrini, E.J. and Putney, S.D. 1990. Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant. *Science* **249**, 932-935.
- 13-** Jean Luc Pellequer, Eric Westhof and Marc H.V. Van Regenmortel. 1993. Correlation between the location of antigenic sites and the prediction of turns in proteins. *Immunology Letters*, **36**, 83-100.
- 14-** Boudet, F.; Lasarte, J.J.; Sarobe, P.; Borrás-Cuesta, F.; Theze, J. 1996. Fine analysis of immunoreactivity of V3 peptides: antibodies specific for V3 domain of laboratory HIV type 1 strains recognize multiple V3 sequences synthesized from field HIV type 1 isolates. *Aids Res. Hum. Retroviruses*, **12:18**, 1671-9.
- 15-** Neurath, R.; Strick, N.; Taylor, P.; Rubinstein, P. and Stevens, C. 1990. "Search for Epitope-specific Antibody response to the Human Immunodeficiency virus (HIV-1) envelope glycoproteins signifying resistance to disease development". *AIDS Res. and Hum. Retroviruses* **6:10**, 1183-1192.
- 16-** Atherton E. & Sheppard R. "Solid Phase peptide synthesis. A practical Approach". 1989. In *Practical Approach Series*. Ed. by D. Richwood and B.D. Hames. IRL press.
- 17-** Fields G. & Noble R. 1990. "Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids". *Int. J. Peptide Protein Research*, **35**, 161-214.
- 18-** Tijssen J. 1987. "Practice and Theory of Enzyme Immunoassay. Laboratory techniques in biochemistry and Molecular Biology". Elsevier Science Publishers. Amsterdam, The Netherlands.
- 19-** Neurath A., Strick N. & Jiang S. 1992. "Synthetic peptides and anti-peptides antibodies as probes to study interdomain interactions involved in virus assembly: the envelope of HIV-1". *Virology* **188**: 1-13.
- 20-** Fung, M.; Sun, C.; Gordon, W.; Liou, R.; Chang, T.; Sun, W.; Daar, E.; Ho, D. 1992. "Identification and characterization of a Neutralization Site within the second variable region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120". *Journal of Virol.* **66**, 848-856.
- 21-** Neurath, N.; Strick, N.; Lee, Y. 1990. "B cell epitope mapping of human immunodeficiency virus envelope glycoproteins with long (19- to 36-residue) synthetic peptides". *Jour. of General Virology* **71**, 85-95.
- 22-** Neurath, R.; Strick, N.; Fields, R.; Jiang, S. 1991. "Peptide mimicking selected disulfide loops in HIV-1 gp120, other than V3, do not elicit virus-neutralizing antibodies". *AIDS Res. and Hum. Retroviruses*, **7:8**, 657-62.
- 23-** Niedrig M., Hinkula J., Weigelf W., et al. 1989. "Epitope mapping of monoclonal antibodies against HIV type 1 structural proteins by using peptides". *Journal of Virology*, Aug, **63:8**, 3525-3528.
- 24-** Mc. Keating J. and Willey R. 1989. "Structure and function of the HIV envelope". *AIDS*, **3** (supl. 1):S35-S41.
- 25-** Neurath A., Strick N. & Jiang S. 1992. "Synthetic peptides and anti-peptides antibodies as probes to study interdomain interactions involved in virus assembly: the envelope of HIV-1". *Virology* **188**: 1-13.
- 26-** Schreiber, M.; Wachsmuth, C.; Müller, H.; Odemuyiwa, S.; Schmitz, h.; Meyer, S.; Meyer, B.; Schneider-Mergener, J. 1997. The V3-direct immune response in natural human immunodeficiency virus type 1 infection is predominantly directed against a variable, discontinuous epitope presented by the gp120 V3 domain. *J. Virol. Dec.* **71:12** 9198-205.
- 27-** Lottersberger, J.; Tonarelli, G.; Salvetti, Farroni, A.; Pagani, D.; Pradó, Y.; Taborda, M.; Marcipar, E.; Fay, O. "Evolution of specific antibodies level in Argentinian HIV-infected patients". XI International Conference in AIDS. Vancouver. July 7-12, 1996.